ผลของ 6- เบนซิลอะมิโนพิวรีนที่มีต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดของเมล็ดมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(The Effect of 6-Benzylaminopurine on Multiple Shoot Induction of Kaffir Lime Seeds (*Citrus Hystrix* DC.) by Tissue Culture)

พรทิพย์ เทิดบารมี*

*สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม 39/1 ถนนรัชดาภิเษก แขวงจันทรเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ในสภาพปลอดเชื้อมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-BAP) ที่มีต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดครบ 3 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 3.30±1.70 ยอดต่อเมล็ด แต่มีใบและความสูงของยอดเฉลี่ยต่ำสุด คือ 3.54±0.93 ใบต่อยอด และ 2.73±1.17 เซนติเมตร ตามลำดับ และทุกระดับความเข้มข้นของ 6-BAP สามารถทำให้มะกรูดเกิดรากร้อยละ 100 โดยความเข้มข้น 6-BAP ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้เกิดรากจำนวนต่ำสุด คือ 0.39 ± 0.24 รากต่อยอด

คำสำคัญ: มะกรูด/ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช/ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน

Abstract

Tissue culture of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) seeds was used to study the effect of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) on multiple shoot induction from cultivation on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 6-BAP at various concentrations of 0, 1, 2 and 3 mg/L. after 3 weeks cultivation of the Kaffir lime seeds, MS medium supplemented with concentration of 2 mg/L of 6-BAP produced the highest average number of induced shoot with 3.30±1.70 shoots/seed that given the lowest of average leaf and minimum height of shoot were 3.54±0.93 leaves/shoot and 2.73±1.17 cm., respectively. For root regeneration, all concentrations of 6-BAP were able to induce 100% of root growth. However, the concentration of 2 mg/L of 6-BAP had the lowest ability to stimulate root regeneration with average root of 0.39 ± 0.24 root/shoot.

Keywords: *Citrus hystrix* DC./ Plant tissue culture/ 6-Benzylaminopurine

บทนำ

มะกรูดเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ (family) Rutaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กสกุลส้ม (genus *Citrus*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus hystrix* DC. (Jirapakkul *et al.*, 2013) มะกรูดเป็นสมุนไพรที่นำมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวัน โดยนำผลมะกรูดมาทำเป็นยาสระผม ส่วนใบและผลนิยมนำมาประกอบอาหาร ซึ่งใบและผลมะกรูดมีน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยสารต่างๆ หลายชนิด สามารถยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะสารประเภท coumarins ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, 2548) และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กำจัดพิษที่เกี่ยวข้องในการป้องกันโรคมะเร็ง (Chen and Kong, 2004) นอกจากนี้เมื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบแยกส่วนจากใบมะกรูดที่ถูกสกัดด้วยเอทิลแอซีเทต (ethyl acetate) มีฤทธิ์ดีที่สุดในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60, K562, Molt4, และ U937 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.0±0.6, 35.3±1.4, 21.8±0.4 และ 19.8±1.0 µg/ml ตามลำดับ ใบมะกรูดจึงเป็นสมุนไพรจากธรรมชาติที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์สำหรับรักษาผู้ที่ป่วยเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งคาดว่าน่าจะก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยกว่าการรักษาโดยวิธีใช้ยาเคมีบำบัด (Chueahongthong *et al.*, 2011) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดในสภาพปลอดเชื้อสามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนพืชให้มีปริมาณสูงในระยะเวลาสั้น จึงเป็นแนวทางในการผลิตสารที่เป็นประโยชน์สำคัญทางการแพทย์ การอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตลอดจนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีผลผลิตสูงเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-BAP) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดมะกรูดในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดมะกรูดในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดมะกรูดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 นาที ย้ายลงแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 ที่เติมสารจับใบ (tween-20) จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 โดยปรับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.6 และเติมวุ้น 7 กรัมต่อลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงโดยตั้งทิ้งไว้ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ .01 ยกเว้นการศึกษาจำนวนใบซึ่งวิเคราะห์ที่ระดับนัยสำคัญ .05 การทดลองแบ่งออกเป็น 4 สิ่งทดลอง โดยแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 10 ซ้ำ ดังนี้ สิ่งทดลองที่ 1 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กลุ่มควบคุม), สิ่งทดลองที่ 2 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, สิ่งทดลองที่ 3 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสิ่งทดลองที่ 4 สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ ความสูงของยอด ร้อยละการเกิดรากและจำนวนรากของต้นกล้ามะกรูด

ผลการวิจัย

จากการศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดในสภาพปลอดเชื้อโดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นจากมากไปน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 3.30±1.70 ยอดต่อเมล็ด รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ย 1.70±0.67 ยอดต่อเมล็ด สำหรับสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนยอดเท่ากัน คือ 1.00±0.00 ยอดต่อเมล็ด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเมล็ดมะกรูดที่เพาะเลี้ยงใน

สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .01$) (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

จากการศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ระดับต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเกิดจำนวนใบมะกรูดเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ โดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจำนวนใบที่เกิดขึ้นจากมากไปน้อย ดังนี้ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.10±0.32 ใบต่อยอด รองลงมา คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดใบเฉลี่ย 4.00±0.00 และ 3.70±0.67 ใบต่อยอด ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดใบเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 3.54±0.93 ใบต่อยอด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ามะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ มีจำนวนใบเกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

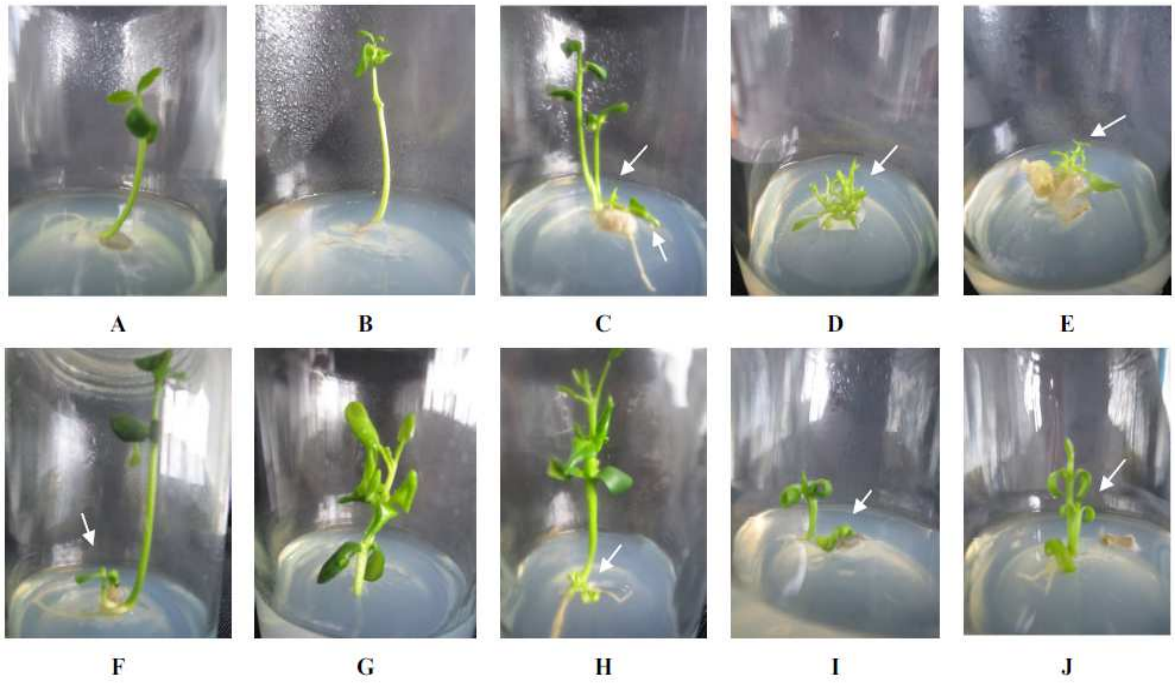
จากการศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ระดับต่าง ๆ มีผลต่อความสูงของยอดมะกรูดโดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยความสูงที่เกิดขึ้นจากมากไปน้อย ดังนี้ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด คือ 4.17±0.16 เซนติเมตร รองลงคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ย 3.63±0.25 และ 2.95±0.64 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ยต่ำสุด คือ 2.73±1.17 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ามะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ มีความสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.01$) (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้น 6-BAP ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอด จำนวนใบ และความสูงเฉลี่ยของยอดมะกรูดเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดครบ 3 สัปดาห์

ความเข้มข้น 6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อเมล็ด)	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบต่อยอด)	ความสูงเฉลี่ยของยอด (เซนติเมตร)
0	1.00±0.00^{a}	4.10±0.32^{ns}	4.17±0.16^{a}
1	1.00±0.00^{a}	4.00±0.00^{ns}	3.63±0.25^{ab}
2	3.30±1.70^{b}	3.54±0.93^{ns}	2.73±1.17^{c}
3	1.70±0.67^{a}	3.70±0.67^{ns}	2.95±0.64^{bc}

หมายเหตุ: ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรที่กำกับอยู่บนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .01$)



ภาพที่ 1 จำนวนยอดมะกรูดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 6-BAP ที่ระดับ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A), 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B), 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (D, E, F และG) และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (H, I และJ), ลักษณะการเกิดยอดใหม่เล็ก ๆ (ลูกศรชี้)

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดโดยชักนำให้เกิดยอดด้วย 6-BAP ที่ระดับต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ามะกรูดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนสูตรอาหารที่เติม 6-BAP ทุกระดับความเข้มข้นสามารถเกิดรากร้อยละ 100 แต่เมื่อศึกษาจำนวนรากที่เกิดขึ้นโดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจากมากไปน้อย พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.20±0.42 รากต่อยอด รองลง คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 1.10±0.32 และ 0.95±0.28 รากต่อยอด ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยต่ำสุด คือ 0.39±0.24 รากต่อยอด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ามะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ทำให้เกิดจำนวนรากแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .01$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้น 6-BAP ในการชักนำให้เกิดยอดที่มีต่อร้อยละการเกิดราก และจำนวนรากมะกรูดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดครบ 3 สัปดาห์

ความเข้มข้น 6-BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดราก (ร้อยละ)	จำนวนรากเฉลี่ย (รากต่อยอด)
0	100	1.20±0.42[a]
1	100	1.10±0.32[a]
2	100	0.39±0.24[b]
3	100	0.95±0.28[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่กำกับอยู่บนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .01$)

อภิปรายผล

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ เติม 6-BAP เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.30±1.70 ยอดต่อเมล็ด ดังนั้นการเติม 6-BAP ปริมาณที่เหมาะสมในพืชแต่ละชนิดและแต่ละชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Azim *et al*. (2011) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มเกลี้ยง (*Citrus sinesis*) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดทั้งเปลือกและเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดยอด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มเกลี้ยงที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกสามารถเจริญพัฒนาเป็นยอดได้ดีกว่าไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ด นอกจากนี้การนำเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด คือ ร้อยละ 70 และสอดคล้องกับ นาตยา มนตรี (2540) รายงานการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) ของต้นกล้ามะกรูดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 12-15 วัน จากนั้นจึงย้ายลงเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก ๆ 15 วัน จำนวน 4 ครั้ง สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด คือ 20.1 ยอด เนื่องจาก 6-BAP จัดเป็นสารกลุ่มไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญ

ต่อการแบ่งเซลล์ การเจริญและพัฒนาเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถดึงสารอาหารจากส่วนที่ไม่มีไซโตไคนินของพืชมาให้ส่วนของพืชที่มีไซโตไคนินใช้สารอาหารเหล่านั้นได้ รวมทั้งยับยั้งการแก่ของพืช และกระตุ้นการเจริญของตาข้าง (Higuchi *et al.*, 2009) และสอดคล้องกับ อุบล สมทรง (2556) รายงานการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า (*Citrus medica* L. var. *linetta* Risso) จากต้นกล้าที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ คือ ปลายยอด ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยง รวมทั้งเพาะเลี้ยงปลายยอดจากสภาพแปลง พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้การเพาะเลี้ยงปลายยอดและใบเลี้ยงเพิ่มจำนวนยอดสูงสุด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จำนวนยอดเฉลี่ย 3.70 ยอด) และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จำนวนยอดเฉลี่ย 2.40 ยอด) ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงส้มซ่าให้เพิ่มจำนวนยอดสูงสุด (จำนวนยอดเฉลี่ย 6.40 ยอด) สำหรับการเพาะเลี้ยงปลายยอดส้มซ่าจากสภาพแปลงในสูตรอาหาร 1/2 MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดสูงสุด (จำนวนยอดเฉลี่ย 2.90 ยอด) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สำหรับจำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดในสภาพปลอดเชื้อคือ เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เกิดจำนวนใบเฉลี่ยต่ำกว่าทุกความเข้มข้นเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ เนื่องจากยอดที่เกิดขึ้นใหม่มักเกิดตรงโคนต้นและเกิดการเจริญพัฒนาช้า มีใบเพียง 2 ใบต่อยอด ดังนั้นจึงมีผลให้เกิดจำนวนใบเฉลี่ยต่ำกว่าความเข้มข้น 6-BAP ระดับอื่น ๆ แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าจำนวนใบเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจากการเติม 6-BAP ทุกความเข้มข้นลงในอาหารไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นหากมีขนาดเล็กจะเกิดใบที่มีขนาดเล็กด้วย แต่ในขณะที่พืชมีการเพิ่มจำนวนยอดขึ้นกลับส่งผลให้ต้นพืชมีแนวโน้มการเจริญด้านความสูงของยอดลดลง เนื่องจากไซโตไคนินที่เติมลงในอาหารเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้เกิดการเจริญพัฒนาของตาทำให้เพิ่มจำนวนยอด แต่ในทางกลับกันไซโตไคนินสามารถขัดขวางการยืดตัวของอวัยวะและความยาวของต้นพืช หากมีความเข้มข้นที่สูงเกินไป (มานี เตื้อสกุล, 2550) นอกจากนี้หากเพิ่มระดับความเข้มข้น 6-BAP เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชักนำให้เกิดจำนวนยอดมะกรูดลดลง เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินความเหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด ประกอบกับพืชมีไซโตไคนินอยู่ภายในที่สังเคราะห์ขึ้นเองตามธรรมชาติอยู่แล้ว แต่อย่างไรก็ตามที่ 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีความสูงของยอดมะกรูดมากกว่า 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากลักษณะการเกิดยอดมีความแตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้น 6-BAP

ที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีบางเมล็ดที่เจริญเป็นต้นเล็ก ๆ ขึ้นพร้อมกันจะมีความสูงน้อย (ภาพที่ 1 D และ E) จึงได้ค่าเฉลี่ยน้อย ส่วน 6-BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่มีการเจริญของยอดแรกสูงขึ้นก่อนจึงเกิดยอดใหม่ตรงโคนภายหลัง (ภาพที่ 1 H) หรือหากมีการเพิ่มจำนวนยอดแต่ละยอดที่มีขนาดเล็กไม่มากและขนาดของแต่ละยอดไม่แตกต่างกันมากจะค่อนข้างมีการยืดตัวขึ้นเรื่อย ๆ พร้อมกันได้อย่างปกติ (ภาพที่ 1 I และJ) จึงมีค่าเฉลี่ยความสูงมากกว่า 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าเมล็ดมะกรูดแต่ละเมล็ดมีการตอบสนองต่อไซโตไคนินที่แตกต่างกันได้ เนื่องจากเมล็ดเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจึงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง จึงทำให้มีลักษณะในการเจริญและเพิ่มจำนวนยอดแตกต่างกันแม้ว่าจะได้รับปริมาณไซโตไคนินเท่ากันก็ตาม

จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ทุกระดับความเข้มข้นสามารถทำให้ต้นกล้ามะกรูดที่งอกจากเมล็ดเกิดรากได้ร้อยละ 100 เท่ากัน โดยทุกต้นมีการเจริญและพัฒนาของรากแก้วก่อน และมีบางต้นเกิดการแตกรากแขนงออกมาจากรากแก้ว และเมื่อศึกษาจำนวนรากพบว่า 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มะกรูดเกิดรากต่ำสุด เนื่องจากมะกรูดบางเมล็ดมีการเจริญพัฒนาเกิดยอดที่มีขนาดเล็กหลาย ๆ ยอดพร้อมกัน (ภาพที่ 1 D และ E) แต่ก็พบว่าหลายยอดรวมกันแต่เกิดเพียง 1 ราก ทำให้สัดส่วนจำนวนยอดที่เกิดขึ้นมากกว่าจำนวนราก จึงทำให้การเกิดจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดต่ำ การเติมไซโตไคนินลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงมะกรูดเป็นสารที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดราก ดังนั้นการชักนำให้เกิดรากทำได้โดยการย้ายเลี้ยงลงบนสูตรอาหารที่มีการเติมออกซินให้มีการออกฤทธิ์เหนือไซโตไคนินจึงสามารถชักนำให้พืชเกิดรากได้สำเร็จ (Gaba, 2005)

สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเมล็ดมะกรูดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3.30±1.70 ยอดต่อเมล็ด โดยเกิดใบเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 3.54±0.93 ใบต่อยอด และมีความสูงยอดเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 2.73±1.17 เซนติเมตร นอกจากนี้พบว่าเมล็ดมะกรูดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ทุกความเข้มข้นสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นที่เกิดรากร้อยละ 100 ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม 6-BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากต่ำสุด คือ 0.39 ± 0.24 รากต่อยอด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษมที่ให้เอื้อเฟื้อสถานที่และสนับสนุนการ

วิจัย ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกลด แทนออมทอง ดร.อาภาภรณ์ เมนะคงคา อาจารย์ กนิษฐา อ่อนศิริ อาจารย์จันทรวรรณ สำราญสำรวจกิจ และอาจารย์วราภรณ์ นันทิยกุล ที่ช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นาตยา มนตรี. (2540). Tissue culture of *Citrus hystrix* DC., *C. aurantifolia* Swingle and *C. reticulata* Blanco **บทคัดย่อผลงานวิจัยของคนไทยในญี่ปุ่น**. ใน: การประชุมนักวิจัยไทยในญี่ปุ่น ครั้งที่ 4 คุยกันวันวิชาการ ปีการศึกษา 2539. ญี่ปุ่น. หน้า 46.

มานี เตื้อสกุล. (2550). **เอกสารคำสอนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลา. หน้า 107-120.

วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์. (2548). เคมีป้องกันมะเร็ง: กลไกการป้องกันของยาและสารจากธรรมชาติ. **ศรีนครินทร์เวชศาสตร์สาร**, 20(3): 164-173.

อุบล สมทรง. (2556). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มซ่า (*Citrus medica* L. var. *linetta* Risso). **วารสารเกษตรพระวรุณ**, 10(1): 33-42.

Azim, F., Rahman M.M., Prodhan, S.H., Sikdar S.U., Zobayer, N. and Ashrafuzzaman, M. (2011). Development of Efficient Callus initiation of Malta (*Citrus sinensis*) through tissue culture. **Int. J. Agril. Res. Innov. & Tech**, 1 (1&2): 64-68

Chen, C. and Kong, A. N. (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radic Biol Med**, 36: 1505-1516.

Chueahongthong, F., Ampasavate, C., Okonogi, S., Tima, S. and Anuchapreeda, S. (2011). Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix*, DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(14): 3097-3105.

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

Higuchi, M., Kakimoto, T. and Mizuno, T. (2009). Cytokinin sensing systems using microorganisms. **Plant Hormones: Methods and Protocols**, 495: 101-109.

Jirapakkul, W., Tinchan, P. and Chaiseri, S. (2013). Effect of drying temperature on key odourants in kaffir lime (*Citrus hystrix* DC., Rutaceae)

leaves. **International Journal of Food Science and Technology**, 48:143–149.

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