



ผลของ 2,4-D และ Kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ในสภาพปลอดเชื้อของหยาดน้ำค้าง (*Drosera spatulata Labill.*) Effect of 2,4-D and Kinetin on Callus Induction from *in vitro* Leaf Explant of Sundews (*Drosera spatulata Labill.*)

กนกวรรณ แสงมุขดี, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, เยาวพา จิระเกียรติกุล*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี 12120

Kanokwan Sangmukdee, Panumart Rithichai, Yaowapha Jirakiattikul*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Pathum Thani 12120

Received 2 February 2023; Received in revised 11 May 2023; Accepted 31 May 2023

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิของหยาดน้ำค้าง (*Drosera spatulata Labill.*) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ 2,4-D และ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบหยาดน้ำค้างบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0 และ 0.2 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์ในที่มีด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มี 7 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่า มีการพัฒนาของยอดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ kinetin สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L มีการเกิดแคลลัส เท่ากับ $83.33 \pm 7.22 - 87.5 \pm 0.00\%$ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่น นอกจากนี้ อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 475.95 ± 40.35 mg และ 58.10 ± 1.30 mg แคลลัสที่พัฒนามบนอาหารทุกสูตรมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีแดงปนเหลืองเล็กน้อย

คำสำคัญ: หยาดน้ำค้าง; แคลลัส; สารควบคุมการเจริญเติบโต; ชิ้นส่วนใบ; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Abstract

Callus culture is one of techniques that could be utilized to produce secondary metabolites from sundews (*Drosera spatulata* Labill.). This research aims to study the effect of 2,4-D and kinetin on callus induction from *in vitro* leaf explant of sundews. The leaf explants were cultured on ½ MS medium supplemented with 0, 0.5, 1 and 2 mg/L 2,4-D alone, or in combination with 0 and 0.2 mg/L kinetin under dark conditions for 6 weeks. The experimental design followed a completely randomized design (CRD) with seven treatments and three replications. The results showed that shoots were induced on ½ MS medium without plant growth regulators, while callus was induced on ½ MS medium supplemented with 2,4-D alone, or in combination with kinetin. The callus formation percentages ranged from 83.33 ± 7.22 to 87.5 ± 0 % on ½ MS medium supplemented with 0.5–2 mg/L 2,4-D in combination with 0.2 mg/L kinetin, which significantly differed from the other treatments. Furthermore, the highest fresh (475.95 ± 40.35 mg) and dry weight (58.10 ± 1.30 mg) were observed on ½ MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D in combination with 0.2 mg/L kinetin. The compact and yellowish red color callus was induced from this study.

Keywords: Sundews; Callus; Growth regulators; Leaf explants; Plant tissue culture

1. บทนำ

หยาดน้ำค้าง (Sundew) เป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Drosera* พืชสกุลนี้มีประมาณ 170 ชนิด (Chuakul, 2000) เป็นพืชล้มลุก ลำต้นแนบกับพื้นดิน ใบถูกปกคลุมด้วยเส้นขนเล็กๆ ที่ปลายขนมีต่อมสีแดงทำหน้าที่ผลิตเมือกเหนียว เมื่อแสงแดดส่อง เมือกจะเป็นประกายคล้ายหยาดน้ำค้าง โดยหยาดน้ำค้างชอบแสงแดดจัด แต่เมื่ออยู่ในที่ร่ม ขนและต่อมที่ปลายขนจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเขียว (Wannakraioj, et al., 2021) นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ นอกจากนี้หยาดน้ำค้างยังมีสรรพคุณทางยา โดยหยาดน้ำค้างทุกชนิดจะมี plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinones) หรือ ramentaceone (7-methyl-juglone) หรือทั้งสองอย่าง ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแนฟโทควิโนน (naphthoquinone) (Zenk et al., 1969) มีรายงานการนำสารสกัดของหยาดน้ำค้างไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการอักเสบ (Paper et al., 2005) มีสารต้านอนุมูลอิสระ

(Fukushima et al., 2009; Balaji and Asirvatham, 2015) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทางช่องปาก เช่น โรคฟันผุ โรคปริทันต์อักเสบ (Didry et al., 1998) จากประโยชน์ดังกล่าวของหยาดน้ำค้าง จึงได้มีการนำพืชชนิดนี้มาผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา (Samaj et al., 1999)

จากความต้องการใช้ประโยชน์ที่มีเพิ่มมากขึ้น การขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต้นพืชโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในพืชชนิดนี้ เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ในปริมาณมาก รวดเร็ว ต้นที่ผลิตได้ปราศจากโรค และสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิได้อีกด้วย (Putalun et al., 2010; Miclea and Zahan, 2017) โดย *Drosera spatulata* เป็นหยาดน้ำค้างชนิดหนึ่งที่แตกต่างกันมีใบคล้ายรูปช้อน (Sangdanuch and Dovanvae, 2008) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกับชนิดอื่นๆ มีรายงานศึกษาการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อแล้ว โดย Krongtam and Junkasiraporn (2019) พบว่า ชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง *D. spatulata* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการพัฒนาของยอดและราก แต่ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L มีการพัฒนาเป็นแคลลัสโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุด อย่างไรก็ตาม ในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น มักนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA (indole butyric acid) NAA (naphthalene acetic acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ร่วมหรือไม่ร่วมกับสารในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA (benzyladenine) และ Kinetin (6-furfuryl adenine) ซึ่งสารทั้งสองกลุ่มนี้มีคุณสมบัติส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของพืช (Bhojwani and Razdan, 1996) ดังรายงานของ Banharn and Ngoentem (2021) พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 mg/L สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (*D. adela*) เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 100% นอกจากนี้ Novitasari and Isnaini (2021) ได้รายงานว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบของ *Nepenthes gracilis* เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 88.89% ส่วน Sidek et al. (2022) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ Mardi Siraj 297 เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 95% และชิ้นส่วนใบของ *Barringtonia racemose* เกิดแคลลัสได้สูงสุด 93.33% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L (Dalila et al., 2013) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาการใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของหยาดน้ำค้าง (*D. spatulata*) ดังนั้นในงานศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ 2,4-D และ

kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง (*D. spatulata*) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดนำแคลลัสไปใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิของพืชชนิดนี้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชทดลองและสภาพเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงยอดหยาดน้ำค้าง (*D. spatulata*) ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ อาหารที่ใช้ในการทดลองมี pH เท่ากับ 5.6-5.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 N ทำการนึ่งกำจัดเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นระยะเวลา 15 นาที

2.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อยอดมีการเจริญเติบโตและมีจำนวนยอดมากเพียงพอ ตัดชิ้นส่วนใบที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อให้มีความยาวประมาณ 0.5 cm แล้วนำชิ้นส่วนใบมาวางลงบนอาหารที่จะทำการศึกษา โดยสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองมี 7 สูตร คือ อาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสิ่งทดลองควบคุมอาหารสูตร ½ MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 mg/L เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพมืด ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 7 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 8 ขวด โดยเพาะเลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น (ใบ) เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์ ทำการบันทึกการเกิดแคลลัส (%) ลักษณะและสีของแคลลัสที่พัฒนา น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัส (mg) โดยน้ำหนักแห้งของแคลลัส บันทึกหลังจากอบที่อุณหภูมิ 50°C นาน 48 ชั่วโมง นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผน

การทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเกิดแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง (*D. spatulata*) บนอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสิ่งทดลองควบคุมไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (figure 1) แต่มีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้น ส่วนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ kinetin สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยการเกิดแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (figure 2 A) ซึ่งจากการทดลอง พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L มีการเกิดแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 87.50 ± 0.00 % แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการเกิดแคลลัสบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L ที่มีค่าเท่ากับ 83.33 ± 7.22 % ส่วนชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 mg/L มีการเกิดแคลลัส เท่ากับ 37.50 ± 0.00 % 29.17 ± 7.22 % และ 75.00 ± 0.00 % ตามลำดับ

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง (*D. spatulata*) นั้นจำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยการเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ kinetin สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อย่างไรก็ตาม การเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ให้ผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D เป็นสารในกลุ่มออกซินที่ส่งผลต่อกระบวนการ DNA methylation ที่มากกว่าปกติ ทำให้ข้อมูลรูปแบบการเจริญเติบโตที่กำหนดไว้กับเนื้อเยื่อถูกกำจัดไป

เนื้อเยื่อจึงไม่เจริญเป็นอวัยวะตามปกติ แต่เกิดเป็นแคลลัสแทน (George et al., 2008) คุณสมบัติช่วยในการแบ่งเซลล์ของพืช นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และ kinetin เป็นสารในกลุ่มไซโทไคนิน มีคุณสมบัติกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ (Bhojwani and Razdan, 1996) สารทั้งสองกลุ่มนี้เมื่อใช้ร่วมกันจะกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ (Pierik, 1997) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสของหยาดน้ำค้างชนิดอื่นที่ใช้ 2,4-D หรือสารในกลุ่มออกซินร่วมกับสารในกลุ่มไซโทไคนิน เช่น อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 3 และ 5 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ (Banham and Ngoentem, 2021) นอกจากนี้ Toomkum and Junkasiraporn (2019) พบว่า อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA โดยใช้ความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ 0 0.1 0.5 และ 1.0 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง (*D. indica*) ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบหยาดน้ำค้าง (*D. spatulata*) บนอาหารสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบการพัฒนาของยอดนั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Krongtam and Junkasiraporn (2019) ที่พบว่าชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง *D. spatulata* และ *D. adaeae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/4 MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการพัฒนาไปเป็นยอดและราก

แคลลัสที่พัฒนามาบนอาหารทุกสูตรมีลักษณะเกาะกันแน่น หรือ compact callus มีสีแดงปนเหลืองเล็กน้อย นอกจากนี้มีลักษณะเยิ้มเป็นเมือก และมีขน (figure 1) การที่สีของแคลลัสมีสีแดงเป็นส่วนใหญ่ นั้น เนื่องจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้างปกคลุมไปด้วยเส้นขนเล็กๆ ที่ปลายขนมีต่อมสีแดง จึงทำให้แคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีแดง ซึ่งสีของแคลลัสขึ้นอยู่กับอวัยวะที่นำมาใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส (Wannakraioj, et al., 2021) จากลักษณะของแคลลัสที่พัฒนานี้ สอดคล้องกับลักษณะ

ของแคลลัสหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ที่พัฒนาบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม 2, 4-D และ kinetin มีลักษณะเกาะกันอย่างแน่น สีของแคลลัสแตกต่างกันออกไป ตั้งแต่สีม่วงเข้มจนถึงสีชมพู ซึ่งสีที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากสารสีแอนโทไซยานิน (anthocyanins) (Banham and Ngoentem, 2021) ในขณะที่แคลลัสของหยาดน้ำค้าง (*D. indica*) ที่พัฒนาบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable) และมีสีเขียว แต่เมื่อเติม BA ร่วมกับ NAA โดยความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น แคลลัสที่พัฒนามีลักษณะเกาะกันแน่น และมีสีแดง (Toomkum and Junkasiraporn, 2019)

3.2 น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัส

จากการทดลองพบว่า น้ำหนักสดของแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (figure 2 B) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L มีน้ำหนักสดมากที่สุด เท่ากับ 475.95 ± 40.35 mg แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L ที่มีน้ำหนักสดของแคลลัส เท่ากับ 404.90 ± 74.02 mg และ 414.39 ± 67.68 mg ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L มีน้ำหนักสดของแคลลัสต่ำสุด เท่ากับ 95.67 ± 4.72 mg น้ำหนักแห้งของแคลลัสที่พัฒนา พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (figure 2 C) โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L มีน้ำหนักแห้งของแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 58.10 ± 1.30 mg รองลงมาคือ แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-2

mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L ที่มีน้ำหนักแห้งของแคลลัส เท่ากับ 45.14 ± 7.16 mg และ 44.17 ± 7.00 mg ส่วนแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L มีน้ำหนักแห้งของแคลลัสต่ำสุด เท่ากับ 12.83 ± 0.71 mg

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสที่พัฒนาเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin มีน้ำหนักสดและแห้งของแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว เนื่องจากความเข้มข้นและสัดส่วนของไซโทไคนินกับออกซินมีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อ (Pierik, 1997) โดย 2,4-D เป็นสารที่มีฤทธิ์ของออกซินและความคงตัวสูง จึงมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัส และเมื่อใช้ร่วมกับสารในกลุ่มไซโทไคนิน คือ kinetin จึงทำให้แคลลัสพัฒนาได้ดียิ่งขึ้น (Wannakrairoj, et al., 2021) อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ซึ่งเป็น 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L สามารถชักนำให้แคลลัสที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับแคลลัสที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบของหยาดน้ำค้าง (*D. indica*) บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 1.542 ± 0.649 g (Toomkum and Junkasiraporn, 2019) นอกจากนี้ ในหยาดน้ำค้างนิวซีแลนด์ พบว่า แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำเช่นกัน มีน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 0.36 ± 0.0957 g (Banham and Ngoentem, 2021)

4. สรุปผลการทดลอง

อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด 87.50 ± 0.00 %

แคลลัสมีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด เท่ากับ 475.95 ± 40.35 mg และ 58.10 ± 1.30 mg ตามลำดับ โดยแคลลัสที่พัฒนามีลักษณะเกาะกันแน่น และมีสีแดงปนเหลือง

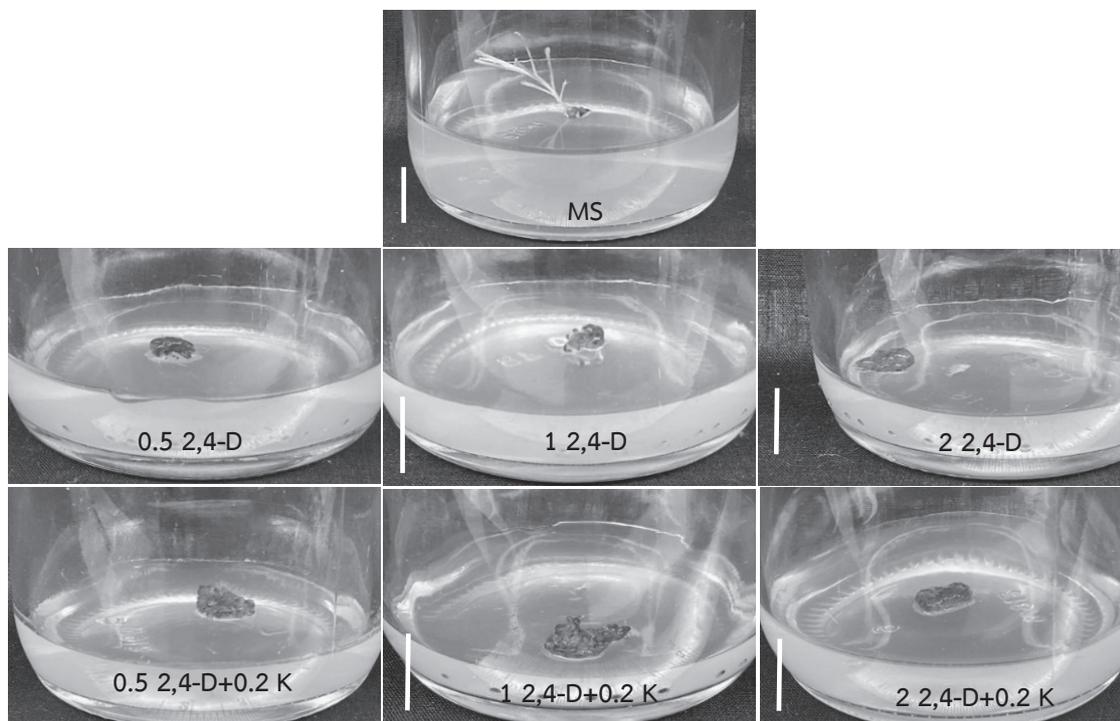


Figure 1 Shoot and callus induction after leaf explants of *Drosera spatulata* were cultured on 1/2 MS medium supplemented with 0, 0.5, 1 and 2 mg/L 2,4-D in combination with or without 0.2 mg/L kinetin for 6 weeks.

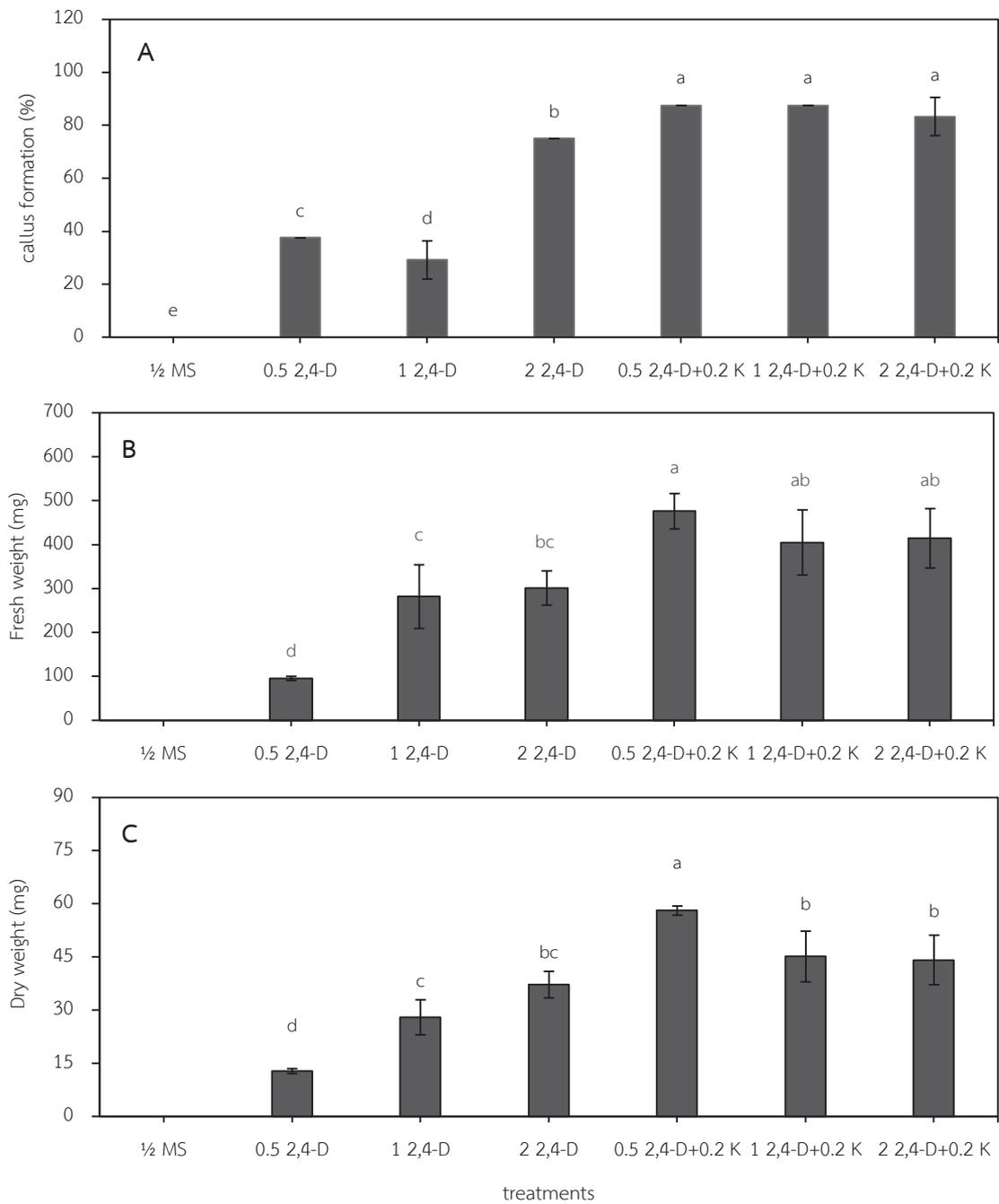


Figure 2 A) callus formation (%), B) callus fresh weight (mg) and C) callus dry weight (mg) after leaf explants were cultured on 1/2 MS medium supplemented with 0, 0.5, 1 and 2 mg/L 2,4-D in combination with or without 0.2 mg/L kinetin for 6 weeks.

5. References

- [1] Balaji, V. R. and Asirvatham, R., 2015, *In vitro* anticancer and antioxidant activity studies on *Drosera peltata* J.E.Sm., Spatula DD 5: 183-189.
- [2] Banham, S. and Ngoentem, C., 2021, The Influence of plant growth regulators and chitosan on *Drosera adelae* F. Muell. *in vitro* condition, Burapha Science Journal 26: 753-769. (in Thai)
- [3] Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K., 1996, Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Elsevier Science, Amsterdam, 766 p.
- [4] Chuakul, W., 2000, Isaan medicinal plants, In Chuakul, W., Prathantururug, S. and Saralamp, P. (Eds.), Encyclopedia of medicinal plant, vol. 4, Amarin printing, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- [5] Dalila, D. Z., Jaafar, H. and Manaf, A. A., 2013, Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media, Asian J. Plant Sci. 12: 21-27.
- [6] Didry, N., Dubreuil, L., Trotin, F. and Pinkas, M., 1998, Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria, J. Ethnopharmacol. 60: 91-96.
- [7] Fukushima, K., Nagai, K., Hoshi, Y., Masumoto, S., Mikami, I., Takahashi, Y., Oike, H. and Kobori, M., 2009. *Drosera rotundifolia* and *Drosera tokaiensis* suppress the activation of HMC-1 human mast cells, J. Ethnopharmacol. 125: 90-96.
- [8] George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J., 2008, Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Springer, Dordrecht, 502 p.
- [9] Krongtam, R. and Junkasiraporn, S., 2019, In vitro plant regeneration and callus induction from leaf explants of sundews (*Drosera spathulata* Labill. and *Drosera adelae* F. Muell.), Burapha Science Journal 24: 1205-1219. (in Thai)
- [10] Kuo, P., Hsu, Y. and Cho, C., 2006, Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells, Mol. Cancer Ther. 5: 3209-3222.
- [11] Marchant, N. G., Aston, H. I. and George, A. S., 1982, Droseraceae, pp. 9-66, In George, A.S. (Ed.), Flora of Australia, Vol. 8, Australian Government Publishing Service, Canberra.
- [12] Miclea, I. and Zahan, M., 2017, Propagation of *Drosera rotundifolia* and *Drosera capensis* in an *in vitro* culture system, Bull. UASVM Ani. Sci. Biotechnol. 74: 144-148.
- [13] Novitasari, Y. and Isnaini, Y., 2021, Propagation of pitcher plants (*Nepenthes gracilis* KORTH. and *Nepenthes reinwardtiana* MIQ.) through callus induction, J. Agric. 33: 81-92.

- [14] Sangdanuch, P. and Doanvae, W. 2008. Carnivorous Plant, Amarin Printing and Publishing, Bangkok, 184 p. (in Thai)
- [15] Sidek, N., Nulit, R., Kong, Y. C., Yien, C. Y., Sekeli, R. and EL Barghathi, M. F., 2022, Callogenesis and somatic embryogenesis of *Oryza sativa* L. (cv. Mardi Siraj 297) under the influence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin, AIMS Agric. Food 7: 536–552.
- [16] Pierik, R. L. M., 1997, *In Vitro Culture of Higher Plants*, 4th edition. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 348 p.
- [17] Putalun, W., Udomsin, O., Yusakul, G., Juengwatanatrakul, T., Sakamoto, S., Tanaka, H., 2010, Enhanced plumbagin production from *in vitro* cultures of *Drosera burmanii* using elicitation, Biotechnol. Lett. 32: 721–724.
- [18] Rivadavia, F., Miranda, V. F. O., Hoogenstrijd, G., Pinheiro, F., Heubl, G. and Fleischmann, A., 2012, Is *Drosera meristocaulis* a pygmy sundew? Evidence of a long-distance dispersal between Western Australia and Northern South America, Ann. Bot. 110: 11-21.
- [19] Samaj, J., Blehova, A., Repcak, M., Ovecka, M. and Bobak, M., 1999, *Drosera* species (Sundew): *In vitro* culture and the production of plumbagin and other secondary metabolites, Biotechnol. Agric. For. 43: 105-135.
- [20] Toomkum, C. and Junkasiraporn, S., 2019, induction of callus and ploidy level inspection from tissue culture of sundew (*Drosera indica* L.) in sterile condition, Burapha Science Journal 24: 929-944. (in Thai)
- [21] Wannakrairoj, S., Tubpatud, Y., Nontaswatsri, C., Kunasakdakul, K., Charoensub, R., Vanaprasert, P., Chuntaratin, P. and Ong, R. L., 2021, Principle of Plant Tissue Culture, Kaenchand printing center Co., Ltd., Bangkok, 508 p.
- [22] Zenk, M. H., Furbringer, M. and Steglich, W., 1969, Occurrence and distribution of 7-methyljuglone and plumbagin in the Droseraceae, Phytochemistry. 8: 2199-2200.