KKU Res.j. 2014; 19(4) : 596-605
http://resjournal.kku.ac.th

การขยายพันธุ์กระทือ (*Globba marantina* L.) ในหลอดทดลอง
In Vitro Propagation of *Globba marantina* L.

ภัทราพร พิมพ์หมื่น[1], ปิยะพร แสนสุข[1] และสุรพล แสนสุข[2]*
Phattaraporn Pimmuen[1], Piyaporn Saensouk[1] and Surapon Saensouk[2]*

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต. ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150
[1]Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Mahasarakham, 44150
[2] สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต. ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150
[2]Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Mahasarakham, 44150
*Corresponding author: pcornukaempferia@yahoo.com

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงหน่อย่อยของกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาวและไม่ผ่าครึ่งตามยาวบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ที่เติม Benzyladenine (BA) 3 มก/ล ร่วมกับ Naphthaleneacetic acid (NAA) 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าหน่อย่อยของกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาวมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน 20 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส ต้นและการเกิดราก เมื่อนำต้นอ่อนขนาด 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ), NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 0.5 มก/ล และ BA 3 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 40% ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 7.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 0.5 มก/ล และ BA 0.5 มก/ล มีจำนวนรากมากที่สุด 25.33 ราก/ชิ้นส่วนพืช

Abstract

The long divided and undivided bubils of *Globba marantina* L. were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3 mg/l Benzyladenine (BA) and 0.5 mg/l Naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 weeks**.** The result showed that the long divided bubils produced 20 percent of plant regeneration, and the average number of shoots was 3.5 shoot/explant. Callus induction, shoot and root formation were observed when cultured microshoot 1 cm in length on MS medium with various concentrations of Thidiazuron (TDZ), NAA combined with BA for 8 weeks. The highest percentage of callus induction was 40% when cultured microshoot on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 3 mg/l BA. The best result for shoot formation was 7.10 shoot/explant achieved on MS medium added with 2 mg/l TDZ. The highest number of root was 25.33 root/explant obtained on medium added with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA.

คำสำคัญ: : กระทือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หน่อย่อย
Keywords: *Globba marantina* L., tissue culture**,** bulbils

1. บทนำ

กระทือ (*Globba marantina* L.) เป็นพืชเฉพาะถิ่นอยู่ในวงศ์ขิง สกุลหงส์เหิน (*Globba* L.) ทั่วโลกพบพืชสกุลนี้ประมาณ 89 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานพบ 42 ชนิด (1) ลักษณะของพืชสกุลหงส์เหินคือ ช่อดอกออกที่ปลายยอดซึ่งแทงออกมาจากยอดของลำต้นเทียม ช่อจะโค้งและห้อยลงอย่างสวยงามมีลักษณะเด่นคล้ายนางพญาหงส์ เมื่อช่อดอกสมบูรณ์สามารถสร้างหน่อย่อย (bulbil) รูปรี เมื่อยังอ่อนมีสีครีม เมื่อแก่แล้วมีสีเทา อยู่ตามซอกใบประดับ (รูปที่ 1) เนื่องจากดอกที่มีสีสันเหลืองสวยงามคล้ายนางพญาหงส์ จึงเป็นที่นิยมนำมาปลูกประดับ พืชในสกุลนี้บางชนิดใช้เป็นสมุนไพร เช่น *G. candida* Ridl. เหง้าและใบ มีสรรพคุณแก้หูน้ำหนวก (2)

รูปที่ 1 หน่อย่อยกระทือที่นำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (ลูกศรชี้)

การขยายพันธุ์พืชวงศ์ขิงนิยมใช้ส่วนของเหง้า แต่การขยายพันธุ์โดยใช้เหง้าจะทำให้ได้จำนวนต้นต่อปีค่อนข้างน้อย นอกจากนี้การใช้เหง้าในการเพาะปลูกยังเกิดโรคเน่าของเหง้า ทำให้จำนวนต้นไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ส่วนการขยายพันธุ์พืชวงศ์ขิงโดยการใช้เมล็ดพบในพืชบางสกุลเท่านั้น เช่น สกุลข่า (*Alpinia* Roxburgh.) สกุลขิง (*Zingiber* Miller.) และสกุลขมิ้น (*Curcuma* L.) เนื่องจากมีเมล็ดจำนวนมากแต่เมล็ดแข็งทำให้งอกเป็นต้นใหม่ได้ยาก ในพืชสกุลหงส์เหินนิยมขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของเหง้า บางชนิดสามารถใช้หน่อย่อยในการขยายพันธุ์ เช่น *G. schombergkii* Hook. f. พบว่าจำนวนต้นต่อหน่อย่อยที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยและเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร

มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงโดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆ เป็นจำนวนมาก ได้แก่ ยอด (3) ปลายยอด (4) ตาเหง้า (5, 6) ลำต้นเทียม (7) และกาบใบ (8) เพื่อชักนำให้เกิดต้นและราก การชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชวงศ์ขิงสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงใบอ่อน (9) ปลายยอด (10) เหง้า (11) และโคนใบ (12) ส่วนในพืชสกุลหงส์เหินมีรายงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฉพาะใน เช่น *G. brachyanthera* K.Schum. (13) *G. substrigosa* Wall ex Baker. (14) และ *Globba* sp. (15) แต่ในกระทือยังไม่เคยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการขยายพันธุ์ เนื่องจากการขยายพันธุ์พืชด้วยเทคนิคนี้สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมาก ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล และได้พืชต้นใหม่ที่ปราศจากโรค รวมทั้งเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชอย่างยั่งยืนต่อไป วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงหน่อย่อยกระทือให้เกิดเป็นต้นอ่อนและศึกษาการชักนำต้นอ่อนให้เกิดแคลลัส ต้นและราก

2. วิธีวิจัย

2.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงหน่อย่อยกระทือ

นำหน่อย่อยกระทือมาล้างทำความสะอาดผ่านน้ำไหล ล้างด้วยน้ำสบู่เหลวเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมาออกให้หมด ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่ว เป็นเวลา 30 วินาทีนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 20% เวลา 15 นาที หยดสารจับใบ (Tween 20) 1-2 หยด เขย่าเป็นครั้งคราวแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 15% เวลา 10 นาที นำหน่อย่อยมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 5 นาที นำหน่อย่อยที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาผ่าครึ่งตามยาวและไม่ผ่าครึ่งตามยาว เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำไปวางบนชั้นภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

2.2 ศึกษาผลของ TDZ ต่อการเกิดแคลลัส ยอดและรากกระทือ

นำต้นอ่อนกระทือขนาด 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 2 มก/ล ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำไปไว้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25ฑ2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

2.3 ศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัส ยอดและรากกระทือ

นำต้นอ่อนกระทือขนาด 1 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มก/ล ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำไปไว้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วยวิธีDuncan’s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (เวอร์ชัน 11.5 for Windows)

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

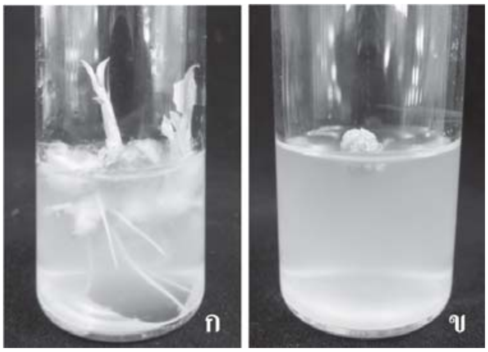
3.1 ผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงหน่อย่อยกระทือ

เมื่อนำหน่อย่อยที่ผ่าครึ่งตามยาวและไม่ผ่าครึ่งตามยาวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหน่อย่อยที่เพาะเลี้ยงเกิดรากสีขาวงอกออกทางด้านป้านของหน่อย่อยเจริญลงด้านล่าง ส่วนยอดเจริญขึ้นด้านบน บริเวณโคนต้นมีสีขาว เหนือโคนต้นมีสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ หน่อย่อยของกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาวมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 3.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ความยาวยอดเฉลี่ย 1.2 ซม. จำนวนรากเฉลี่ย 4 ราก/ชิ้นส่วนพืช ความยาวรากเฉลี่ย 1.8 ซม. (ตารางที่ 1) ซึ่งแตกต่างจากหน่อย่อยที่ไม่ผ่าครึ่งตามยาวพบว่าไม่เกิดยอดและราก ลักษณะหน่อย่อยยังคงเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงหน่อย่อยกระทือ เมื่อเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

วิธีการเพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) Mean±SE	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นส่วนพืช) Mean±SE	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE
หน่อย่อยผ่าครึ่งตามยาว	20%	3.5±1.06	1.2±0.56	4±1.41	1.8±0.14
หน่อย่อยไม่ผ่าครึ่งตามยาว	0	0	0	0	0



รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงหน่อย่อยกระทือ
ก. หน่อย่อยกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาวเจริญเป็นต้นอ่อน
ข. หน่อย่อยกระทือที่ไม่ผ่าครึ่งตามยาว

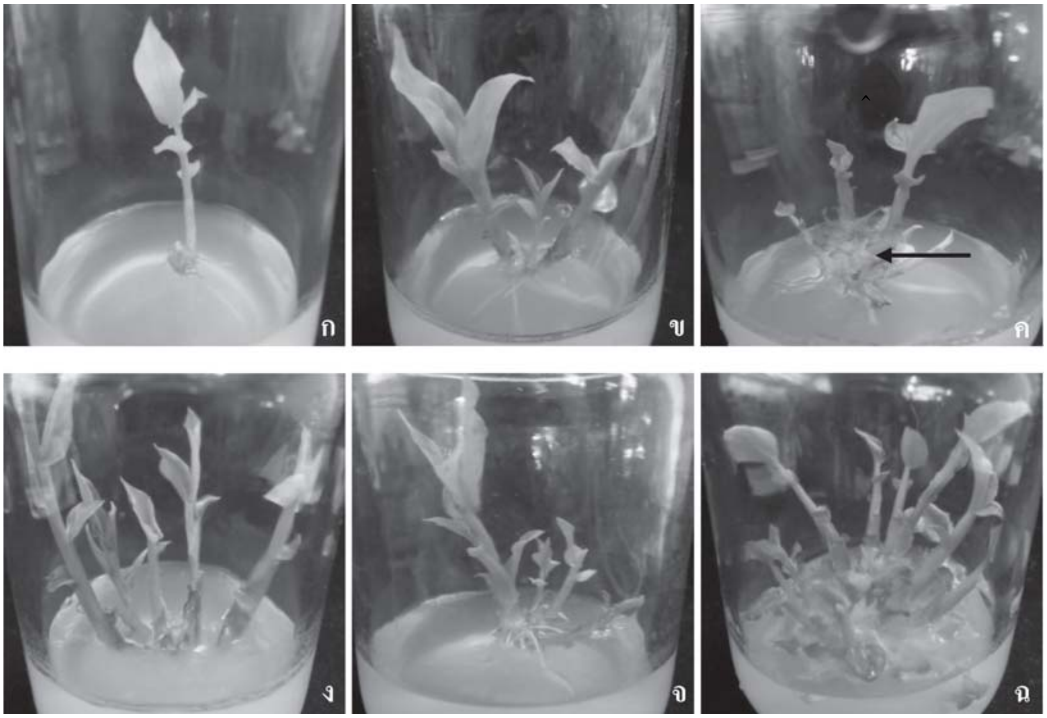
2. ผลของ TDZ ต่อการเกิดแคลลัส ยอดและรากกระทือ

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกระทือขนาด 1 ซม. บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 2 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.25 และ 0.5 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 30%, 30% และ 20% ตามลำดับ เริ่มเกิดแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสมีสีขาว เป็นแคลลัสเกาะกันแบบหลวม (friable callus) และแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก/ล มีจำนวนยอดมากที่สุด 7.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ยอดมีสีเขียว เจริญออกจากบริเวณโคนต้นอ่อน มีใบ 4-5 ใบ ใบที่อยู่บนสุดจะมีขนาดใหญ่กว่าใบอื่น ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มก/ล มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 10.6 ราก/ชิ้นส่วนพืช รากมีขนาดเล็ก สีขาว มีขนรากจำนวนมาก ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.81 ซม. และความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.78 ซม. (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ผลของฮอร์โมน TDZ ต่อการเกิดแคลลัส ยอดและรากของต้นอ่อนกระทือ เมื่อเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

TDZ (มก/ล)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) Mean±SE	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นส่วนพืช) Mean±SE	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE
0	0	1.10 ± 0.10^{b}	4.81 ± 0.53^{a}	5.90 ± 1.00^{b}	3.78 ± 0.77^{a}
0.1	30%	5.40 ± 1.98^{a}	2.60 ± 0.21^{b}	10.60 ± 2.50^{a}	1.07 ± 0.16^{b}
0.25	30%	5.30 ± 1.57^{a}	2.25 ± 0.18^{b}	4.90 ± 1.26^{b}	0.71 ± 0.15^{b}
0.5	20%	6.60 ± 0.74^{a}	2.24 ± 0.15^{b}	3.00 ± 0.93^{bc}	0.66 ± 0.11^{b}
1	0	4.90 ± 0.88^{a}	2.48 ± 0.20^{b}	3.30 ± 0.71^{bc}	0.37 ± 0.09^{b}
2	0	7.10 ± 1.12^{a}	1.95 ± 0.21^{b}	0.20 ± 0.20^{c}	0.45 ± 0.45^{b}

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT



รูปที่ 3 ลักษณะแคลลัส (ลูกศรชี้) ยอดและรากของกระทือเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์
ก. 0 มก/ล ข. 0.1 มก/ล ค. 0.25 มก/ล ง. 0.5 มก/ล จ. 1 มก/ล ฉ. 2 มก/ล

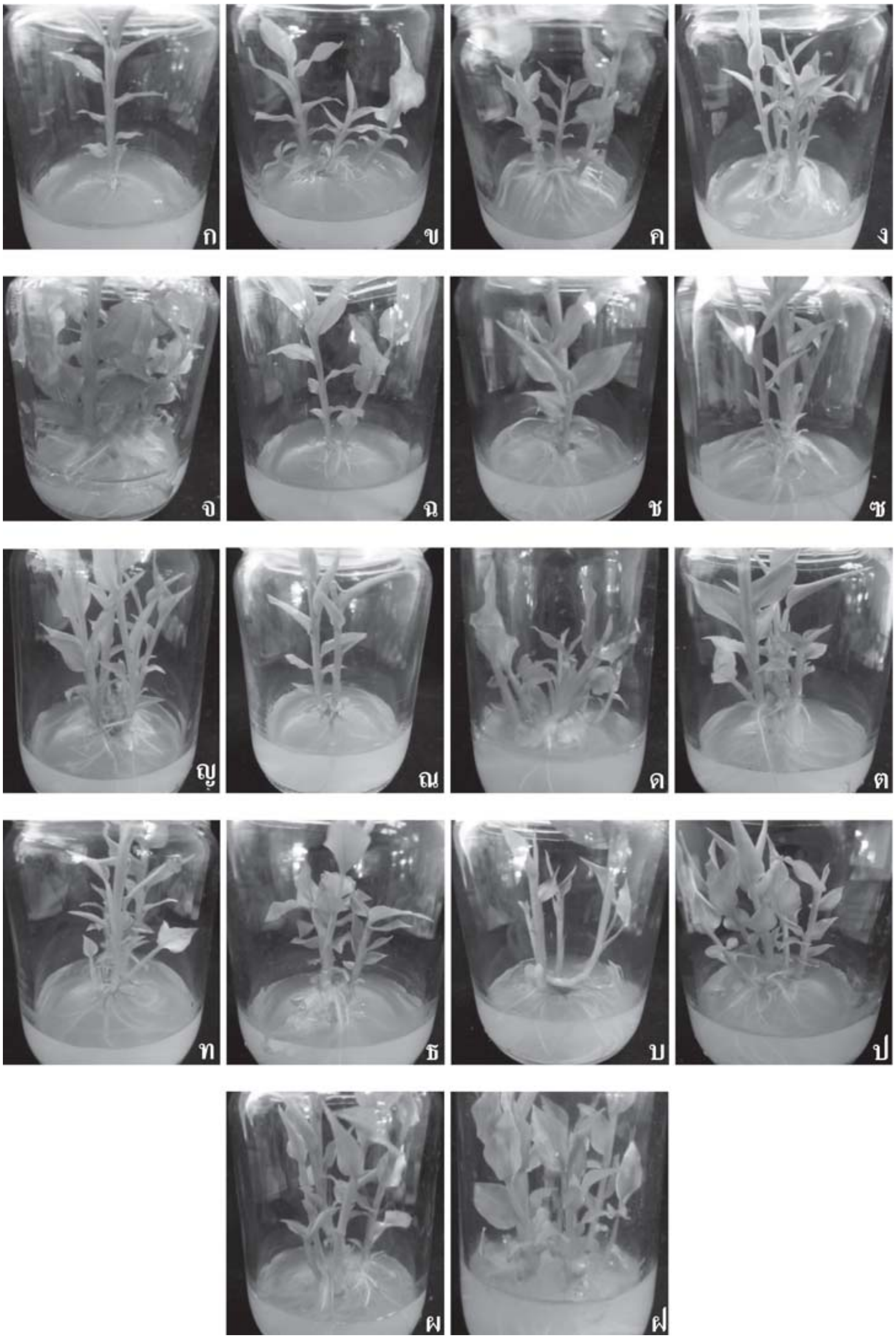
3. ผลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัส ยอดและรากกระทือ

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกระทือขนาด 1 ซม. บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล และ NAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 40% และ 30% ตามลำดับ แคลลัสมีสีขาว เหลืองอ่อน เป็นแคลลัสแบบเกาะกันหลวมๆ และแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้ ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.70 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนมีสีเขียว มีใบประมาณ 6 ใบ ใบออกสลับตรงข้าม ใบที่อยู่บนสุดมีขนาดใหญ่กว่าใบอื่น ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมฮอร์โมน NAA 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 2 มก/ล มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.79 ซม. ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 25.33 ยอด/ชิ้นส่วนพืช รากมีขนาดเล็ก สีขาว มีขนรากจำนวนมาก ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.68 ซม. (ตารางที่ 3 และรูปที่ 4) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 ผลของ NAA และ BA ต่อการเกิดแคลลัส ยอดและรากของต้นอ่อนกระทือ เมื่อเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

NAA (มก/ล)	BA (มก/ล)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) Mean±SE	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นส่วนพืช) Mean±SE	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE
0	0	0	1.30±0.21[c]	4.05±0.34[abc]	7.60±1.69[d]	2.22±0.20[cdef]
0	0.5	0	3.90±0.73[b]	3.14±0.51[bcd]	12.90±1.90[bcd]	1.94±0.21[defg]
0	1	0	3.10±0.50[bc]	2.62±0.30[cd]	13.77±1.16[bcd]	1.70±0.19[efg]
0	2	0	4.66±0.70[b]	3.08±0.26[bcd]	23.77±3.63[a]	1.50±0.09[fg]
0	3	0	6.70±1.16[a]	2.21±0.22[d]	19.55±3.06[abc]	1.37±0.09[g]
0	4	0	3.77±1.10[b]	2.22±0.22[d]	11.00±3.27[cd]	1.39±0.15[g]
0.5	0	0	3.60±0.80[bc]	3.61±0.36[abcd]	19.00±2.91[abc]	3.68±0.52[a]
0.5	0.5	0	2.60±0.33[bc]	3.96±0.49[abc]	25.33±1.95[a]	2.90±0.21[bc]
0.5	1	0	3.55±1.11[bc]	4.14±0.57[abc]	17.12±2.78[abc]	3.25±0.46[ab]
0.5	2	0	2.90±0.34[bc]	4.79±0.44[a]	24.40±2.78[a]	2.75±0.17[bc]
0.5	3	40%	4.60±0.77[b]	3.98±0.50[abc]	24.80±2.85[a]	2.40±0.12[cde]
0.5	4	0	2.50±0.54[bc]	3.76±0.51[abc]	13.20±1.84[bcd]	2.15±0.15[cdef]
1	0	0	3.00±0.62[bc]	3.66±0.50[abcd]	21.33±3.09[ab]	1.65±0.11[efg]
1	0.5	0	3.00±0.21[bc]	4.34±0.45[ab]	23.60±2.58[a]	2.16±0.14[cdef]
1	1	0	3.80±0.59[b]	4.45±0.55[ab]	23.60±1.93[a]	2.27±0.15[cdef]
1	2	0	3.44±0.64[bc]	4.40±0.57[ab]	23.00±2.96[a]	2.27±0.23[cdef]
1	3	30%	3.88±0.63[b]	3.26±0.52[abcd]	24.00±15.82[a]	1.94±0.18[defg]
1	4	0	4.33±0.88[b]	3.52±0.53[abcd]	15.00±2.44[bcd]	2.53±0.25[bcd]

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT



รูปที่ 4 ลักษณะแคลลัส ยอดและรากของต้นอ่อนกระทือเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA และ BA (ตามลำดับ) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ก. 0, 0 มก/ล ข. 0, 0.5 มก/ล ค. 0, 1 มก/ล ง. 0, 2 มก/ล จ. 0, 3 มก/ล
ฉ. 0, 4 มก/ล ช. 0.5, 0 มก/ล ซ. 0.5, 0.5 มก/ล ญ. 0.5, 1 มก/ล ฌ. 0.5, 2 มก/ล
ด. 0.5, 3 มก/ล ต. 0.5, 4 มก/ล ท. 1, 0 มก/ล ธ. 1, 0.5 มก/ล บ. 1, 1 มก/ล
ป. 1, 2 มก/ล ผ. 1, 3 มก/ล ฝ. 1, 4 มก/ล

3.2 อภิปรายผล

เมื่อนำหน่อย่อยกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาวและไม่ผ่าครึ่งตามยาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเฉพาะหน่อย่อยของกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาวเกิดต้นอ่อนได้ยอดและรากจำนวนมาก อาจเนื่องจากการผ่าครึ่งตามยาวทำให้เนื้อเยื่อพืชได้สัมผัสอาหารและดูดซับอาหารได้เร็วกว่า มีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Chong และคณะ (16) ที่ผ่าแบ่งยอดของ *Curcuma zedoaria* Rosc. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าเกิดยอดได้จำนวนมากกว่ายอดที่ไม่ผ่าแบ่งครึ่ง แต่แตกต่างจากการทดลองของ Kho และคณะ (13) ขยายพันธุ์ *Globba brachyanthera* K. Schum. โดยใช้หน่อย่อยที่ไม่ผ่าครึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Gamborg B5 (B5) ที่เติม BAP 3 มก/ล เกิดยอดมากที่สุด 6.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าหน่อย่อยที่นำมาเพาะเลี้ยงในครั้งนี้เป็นพืชคนละชนิดกับการศึกษาของ Kho และคณะ (13) ทำให้มีความแตกต่างของพันธุกรรมของพืชมีผลต่อการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน

ต้นอ่อนกระทือความยาว 1 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน TDZ ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัสดีที่สุด 30% แตกต่างจากการทดลองของ Zhang และคณะ (17) เพาะเลี้ยงเหง้า *Curcuma soloensis* Valeton. บนอาหารที่เติม TDZ 2.5 ไมโครโมล BA 2 ไมโครโมล และ 2,4-D 1.2 ไมโครโมล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 91.1% ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่นำฮอร์โมน TDZ มาชักนำให้เกิดยอดในพืชวงศ์ขิงชนิดอื่น เช่น Srirat และคณะ (18) เพาะเลี้ยงตาเหง้าของ *Curcuma longa* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน TDZ 5 มก/ล เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เกิดยอดมากที่สุด 6.65 ยอดต่อชิ้นส่วน Lo-apirukkul และคณะ (19) เพาะเลี้ยง *C. comosa* Roxb. ในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน TDZ 18.16 ไมโครโมล Zhang และคณะ (17) เพาะเลี้ยงเหง้า *C. soloensis* บนอาหารที่เติม TDZ 2.5 ไมโครโมล สามารถชักนำยอดดีที่สุด 18.7 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช Hamirah และคณะ (5) เพาะเลี้ยงตาเหง้าของ *Zingiber montanum* Koenig. บนอาหารสูตร B5 ที่เติมฮอร์โมน TDZ 0.5 มก/ล สามารถ ชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด 8.14 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช TDZ เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนินมีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดต้นพิเศษ (adventitious shoot) (20) จากการทดลองพบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมน TDZ จะทำให้ต้นอ่อนกระทือเกิดยอดเพิ่มมากขึ้น หากลดความเข้มข้นของฮอร์โมน TDZ หรือไม่เติมฮอร์โมน TDZ ในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ยอดและรากมีความยาวมาก เกิดรากจำนวนมาก

ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด 40% แตกต่างจากการทดลองของ Saensouk (9) เพาะเลี้ยงใบอ่อนของว่านเปราะทอง (*Cornukaempferia aurantiflora* Mood & Larsen) ในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D 2.0 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 95% Kou และคณะ (21) เพาะเลี้ยงละอองเรณู *Curcuma attenuate* Wall. ในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D 13.6 ไมโครโมล ร่วมกับ Kinetin 2.3 ไมโครโมล เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 33.3% ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก/ล มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Rahayu และคณะ (22) เพาะเลี้ยงยอดของ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. บนอาหารที่เติม BAP 5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เกิดยอดดีที่สุด 2.50 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจาก Rahman และคณะ (23) และ Kambaska และคณะ (24) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงเพื่อชักนำให้เกิดยอดในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA จากการทดลองพบว่าหากเติมฮอร์โมน BA เพียงชนิดเดียว จะกระตุ้นการเกิดยอดจำนวนมาก เนื่องจากฮอร์โมน BA เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนินมีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การเจริญของตาข้าง การเกิดหน่อเล็กๆและการเกิดยอด (25) แต่การเติมฮอร์โมน NAA อย่างเดียว ทำให้รากมีความยาวมาก ฮอร์โมน NAA เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดรากและหากเติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ทำให้ยอดมีความยาวเฉลี่ยมาก และมีจำนวนรากมากขึ้น จากการ

ทดลองในครั้งนี้พบว่าต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ลักษณะต้น รากมีขนาดใหญ่และแข็งแรงกว่าต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA เหมาะที่จะนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

4. สรุป

การเพาะเลี้ยงหน่อย่อยของกระทือที่ผ่าครึ่งตามยาว เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 3 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนมากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากหากไม่ผ่า จะไม่เกิดการตอบสนอง ต้นอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารที่มีฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีกว่าต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเฉพาะฮอร์โมน TDZ ต้นอ่อนกระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก/ล มีจำนวนยอดมากที่สุด 7.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนกระทือเกิดรากได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2557 ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณคุณเนตรชนก ทังสุพานิช ที่ให้ทุนการศึกษา

6. เอกสารอ้างอิง

(1) Larsen K, Larsen SS. Gingers of Thailand. Queen Sirikit Botanic Garden. Edition 1., Chiang Mai. 2006.

(2) Chuaku W. Taxonomy of medicinal plants. Faculty of Pharmacy, Mahidol University; 2005. Thai.

(3) Theanphong O, Songsak T, Kirdmanee C. Effect of plant growth regulators on micropropagation of *Curcuma aeruginosa* Roxb. Thai Journal of Botany, 2010;2 (Special Issue). 135-142.

(4) Kha A, Nasrin S, Hossain MT. Large scale multiplication of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) from shoot tip culture. Journal of Biological Science. 2003;3(1): 59-64.

(5) Hamirah MN, San HB, Boyce PC, Sim SL. Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 2010;18(1): 127-130.

(6) Raihana R, Faridah QZ, Julia AA, Abdelmageed AHA, Kadir MA. *In vitro* culture of *Curcuma mangga* from rhizome bud. Medicinal Plants. 2011;5(28): 6418-6422.

(7) Pandey YR, Sagwansupyakorn C, Sahavacharin O, Thaveechai N. *In vitro* Propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Kasetsart Journal (Natural Science). 1997;31: 81-86.

(8) Prakash S, Elangomathavan R, Seshadri S, Kathiravan K, Ignacimuthu S. Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. Plantlets from rhizome and leaf sheath explant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004;78: 159-165.

(9) Saensouk P. Callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Cornukaempferia aurantiflora* Mood & Larsen. *Pakistan* Journal of *Botany,* 2011;43(5): 2415-2418.

(10) Malamug JJF, Inden H, Asahira T. Plantlet regeneration and propagation from Ginger callus. Sciencetia Horticulturae. 1991;48: 89-97.

(11) Vincent KA, Hariharan M, Mathew KM. Embryogenesis and plantlet formation in tissue culture of *Kaempferia galanga* L.: a medicinal plant. Phytomorphology. 1992;42(3&4): 253-256.

(12) Salvi ND, George L, Eapen S. Plant regeneration from leaf base callus of Turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2001;66: 113-119.

(13) Kho PE, Sani HB, Boyce PC, Sim SL. *In vitro* propagation of *Globba brachyanthera* K.Schum. Biotechnology. 2010;(18)1: 119-122.

(14) Wasoontarapiwat N, Chuenboonngarm N, Jenjittikul T. *In vitro* improvement of size and length of *Globba substrigosa* Wall. ex Baker roots. [MSc thesis] Mahidol: Mahidol University; 2011. Thai.

(15) Janjula N. Embryo culture and micropropagation in *Globba* sp. [MSc thesis] Kasetsart: Kasetsart University; 2010. Thai.

(16) Chong YH, Khalafalla MM, Bhatt A, Chan LK. The effects of culture systems and explant incision on *in vitro* propagation of *Curcuma zedoaria* Rosc. Pertanika Journal. 2012;35(4): 863-874.

(17) Zhang S, Liu N, Sheng A, Ma G, Wu G. Direct and callus-mediated regeneration of *Curcuma soloensis* Valeton (Zingiberaceae) and *ex vitro* performance of regenerated plants. Scientia Horticulturae. 2011;130: 899-905.

(18) Srirat P, Sirisansaneeyakul S, Parakulsuksatid P, Prammanee S, Vanichsriratana W. *In vitro* propagation of *Curcuma longa* L. from rhizome bud explant. Proceedihgs of the 3rt international conference on fermentation technology for value added agricultural products. 2008; 4: P. 1-5.

(19) Lo-apirukk S, Jenjittikul T, Saralamp P, Prathanturarug S. Mircropropagation of a Thai medicinal plany for women's health, *Curcuma comosa* Roxb., via shoot and microrhizome inductions. *Nature Medicine*. 2012;66: 265-270.

(20) Lu C. The use of thidiazuron in tissue culture. *Developmental Biology.* 1993;29: 92-96.

(21) Kou Y, Ma G, Jaime A, Silva TD, Liu N. Callus induction and shoot organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuate* Wall. *Plant Cell*, *Tissue* and *Organ Culture*. 2013;112: 1-7.

(22) Rahayu S, Adil WH. The effect of BAP and Thidiazuron on *in vitro* growth of java turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Plant Science. 2012;7(10): 820-824.

(23) Kambaska KB, Santilata S. Effect of plant growth regulator on micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). cv-Suprava and Suruchi. Agricultural Technology. 2009;7(2): 271-280.

(24) Rahman MM, Amin MN, Ahamed T, Ahmad A, Ahmed R, Ahmed MB, Ail MR, et al. *In vitro* rapid propagation of Black Thorn (*Kaempferia galangal* L.): A rare medicinal and aromatic plant of Bangladesh. Plant Science. 2005;5(3): 300-304.

(25) Saensouk P. Plant tissue culture. Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University. 2010. Thai.