การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่องอกนอกหลอดทดลอง

In Vitro Propagation of *Curcuma longa* Linn. from *Ex Vitro* Sprouted Rhizome

ปริญา สุคนธรัตน์
Pariya Sukontharat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่องอกนอกหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางปริญา สุคนธรัตน์
สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

.....กรรมการ
(ดร.สุนทรียา กาละวงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางปริญา สุคนธรัตน์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางปริญา สุคนธรัตน์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่องอกนอกหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางปริญา สุคนธรัตน์
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

ศึกษาการขยายพันธุ์ขมิ้นชันในหลอดทดลอง โดยศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อและการขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยทางตรงและทางอ้อมด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้ชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันปลอดเชื้อ และผลิตต้นพันธุ์ขมิ้นชันจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นลง จากการศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ พบว่า การให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ poly-oxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูง 68.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด การชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ยมากที่สุด 7 ยอดต่อชิ้นส่วน อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ α-Nabthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างรากได้ดีที่สุด 19.74 รากต่อยอด และเมื่อย้ายต้นกล้าขมิ้นชันที่สมบูรณ์ปลูกลงดินในถาดหลุม นาน 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 86.90 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบที่แยกจากหน่อในหลอดทดลองได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอเกิดขึ้นได้ดีเมื่อย้ายแคลลัสของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างจุดเขียวมากที่สุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS เติม 2,4 -D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดยอดรวมที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้สูงที่สุด 4.83 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

Thesis Title *In Vitro* Propagation of *Curcuma longa* Linn. from *Ex Vitro* Sprouted Rhizome
Author Ms. Pariya Sukontharat
Mejor Program Plant Science
Academic Year 2015

Abstract

The effects of various sterile methods of sprouted rhizome disinfestation on *in vitro* propagation of *Curcuma longa* Linn. in successful sterile culture was investigated. Sterile explants were then cultured for mass propagation in a short period of time. The results showed that sterile sprouted rhizomes running under tap water for 20 min, immersed in 70% alcohol for 1 minute, soaked in 20% Clorox with a few drops of Tween 20 for 20 minutes, washed with distilled water for 5 minutes, soaked in 10% Clorox with a few drops of Tween 20 for 10 minutes, then washed with distilled water 3 times for 5 minutes each time gave the highest percentage of sterile culture at 68.5. Culturing of sprouted rhizome on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3% sucrose and 4 mg/L thidiazuron (TDZ) for 12 weeks gave the highest number of shoots at 7 shoots/explant. For root induction, MS medium with 0.5-1.0 mg/L α-naphathaleneacetic acid (NAA) gave the highest number of roots at 19.7 roots/shoot after culturing for 8 weeks. The plantlets transferred to net pot containing soil gave a survival rate of 86.90%. after 4 weeks of transfer. For callus induction MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/L dicamba gave the highest callus induction frequency at 66.67% after 8 weeks of culture. For proliferation of the callus 0.1 mg/L 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) containing medium gave the best result after culturing for 4 weeks. For induction of somatic embryogenesis culturing of callus on MS medium supplemented with 3% sucrose and 0.1 mg/L BA gave the highest percentage of green spots at 83.33. MS medium supplemented with 3% sucrose 0.1 mg/L 2, 4-D 0.1 mg/l NAA and 0.25 mg/l BA gave the highest number of germinated somatic embryos at 4.83 embryos/culture after culturing for 12 weeks. Germination of somatic embryos into complete plantlets was obtained on MS medium supplemented with 3% sucrose 0.1 mg/l 2, 4-D and 0.1 mg/L BA after culturing for 9 weeks.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.ทัศนี ขาวเนียม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ สั่งสอนทั้งทางด้านวิชาการ การวิจัย คุณธรรมและจริยธรรม และทักษะในด้านต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ลุล่วงเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุนทรียา กาละวงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อปลื้ม คุณแม่ผ่อง พี่สาว น้องชาย น้องสาว เด็กชายจักรชัยและเด็กชายจักรธรลูกชาย ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจให้เสมอ จนข้าพเจ้าเรียนจบ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ บุคคลากรภาควิชาพืชศาสตร์ และอาจารย์ประจำวิชาจากคณะต่าง ๆ ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ความรู้ การอบรมสั่งสอน และความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ปริญา สุคนธรัตน์

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		(5)
Abstract		(6)
กิตติกรรมประกาศ		(7)
สารบัญ		(8)
รายการตาราง		(9)
รายการภาพประกอบ		(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ		(11)
ใบตอบรับการตีพิมพ์		(12)
สรุปเนื้อหา		
บทที่ 1	บทนำต้นเรื่อง	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	12
บทที่ 2	การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่องอกนอกหลอดทดลอง	
	การทดลองที่ 1 ศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ	13
	การทดลองที่ 2 ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชัน	15
	การทดลองที่ 3 ผลของชนิดและความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชัน	25
	การทดลองที่ 4 ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของขมิ้นชัน	30
บทที่ 3	สรุป	36
เอกสารอ้างอิง		38
ภาคผนวก		42
ผลงานตีพิมพ์		44
ประวัติผู้เขียน		50

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิด ความเข้มข้น ระยะเวลาและประสิทธิภาพ ของสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ	6
2	เทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ	15
3	ผลของเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนของขมิ้นชันปลอดเชื้อ	16
4	อิทธิพลของชนิดและความเข้นข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดขมิ้นชัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์	21
5	อิทธิพลของชนิดและความเข้นข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มยอดของขมิ้นชัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์	22
6	ผลของ 2,4-D หรือ dicamba เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ BA ต่ออัตราการชักนำแคลลัส (%) หลังการย้ายเลี้ยง 8 สัปดาห์ และการเพิ่มปริมาณแคลลัส เป็นเวลา 12 สัปดาห์	28
7	ผลของ dicamba 2,4-D NAA BA และ น้ำมะพร้าว เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกันต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 12 สัปดาห์	33
8	ผลของ 2,4-D NAA และ BA เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน ต่อการงอกเป็นพืชต้นใหม่ เป็นเวลา 9 สัปดาห์	34

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	การชักนำยอดของชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชัน	21
2	การเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันจากชิ้นส่วนยอดเดี่ยว เป็นเวลา 8 สัปดาห์	23
3	การอนุบาลและการย้ายปลูกลงดินในกระถางพลาสติกของต้นขมิ้นชัน	23
4	การชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสของขมิ้นชัน	27
5	การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสของขมิ้นชัน	34
6	การงอกเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 9 สัปดาห์	35

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog หรือ สูตรมูราชิกและสกุค
Tween 20	=	Poly-oxyethylene sorbitan monolaurate
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
BA	=	6-benzyladenine
BAP	=	N_6-benzylaminopurine
NAA	=	α-napthaleneacetic acid
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
IAA	=	Indole-3-acetic acid
KN	=	6-furfurylaminopurine (kinetin)
TDZ	=	Thidiazuron
$CaOCl_2$	=	Calcium hypochlorite
NaOCl	=	Sodium hypochlorite (Clorox)
H_2O_2	=	Hydrogen peroxide
$AgNO_3$	=	Silver nitrate
$HgCl_2$	=	Mercuric chloride
HgI_2	=	Mercuric iodide
$HgBr_2$	=	Mercuric bromide
H_2SO_4	=	Sulfuric acid
CW	=	Coconut water
%	=	Percent
มก/ล	=	Milligram per litre
เบทาดีน	=	Povidone-iodine

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 18 มีนาคม 2558

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัย **การทำให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อและการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง** เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์นั้น กองบรรณาธิการฯ ได้พิจารณาแล้ว เห็นว่าบทความวิจัยดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารฯ จึงตอบรับตีพิมพ์ลงวารสารฯ ในปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (เมษายน-มิถุนายน 2558) หน้า 36-40 ทั้งนี้กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับได้จากเว็บไซต์ของวารสารฯ

กองบรรณาธิการหวังว่าจะได้รับการเสนอผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารฯ จากท่านในโอกาสต่อไป

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-39

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

Songklanakarin Journal of Plant Science

SJPS

ปีที่ 2 ฉบับที่ 2
เมษายน-มิถุนายน 2558
Volume 2 No. 2
April-June 2015

ISSN 2351-0846

ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 1

บทนำต้นเรื่อง

บทนำต้นเรื่อง

ขมิ้นชันเป็นพืชดั้งเดิมในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกมากในประเทศมาเลเซีย อินเดีย ศรีลังกา และปากีสถาน ชาวอินเดียใช้ประกอบในพิธีกรรมทางศาสนา ชาวจีนนิยมนำมาทำเป็นสีย้อมผ้า สมุนไพรและเครื่องเทศ ต่อมาแพร่ได้หลายไปยังแอฟริกาตะวันออกและแอฟริกาตะวันตก (นลินี, 2545) ขมิ้นชันอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. ชื่อสามัญว่า curcuma turmeric หรือ yellow root เป็นพืชล้มลุก มีอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน เนื้อเหง้ามีสีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นเฉพาะ ซึ่งสารเคมีสำคัญที่พบ คือ น้ำมันหอมระเหยประมาณ 2 - 6 เปอร์เซ็นต์ และสารที่ให้สีเคอร์คูมีน เคอร์คูมิน และอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน สำหรับสารเคอร์คูมินจะมีสีเหลืองส้มหรือสีเหลืองแดง หากปริมาณสารเคอร์คูมิน ไม่ต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จะใช้เป็นเครื่องเทศ แต่ถ้าหากสูงกว่า 8 -15 เปอร์เซ็นต์ จะใช้เป็นสมุนไพร (นลินี, 2545) คนไทยนิยมใช้ขมิ้นอ้อยปรุงอาหารมากกว่า ส่วนขมิ้นชันมักใช้เป็นยา เหง้าขมิ้นชันนิยมใช้แต่งอาหารให้มีสีเหลือง (พันธิตร์, 2545) ด้านการรักษาใช้เป็นพืชสมุนไพรแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้จุกเสียด (Thamlikikul *et al*., 1989) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหาร (Sangousa and Punnipa, 2011) รักษาแผลเปื่อยในกระเพาะและลำไส้ (Prucksunand *et al*., 2001) ลดการอักเสบชนิดเฉียบพลัน ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (นลินี, 2545; ศุภารัตน์ และคณะ, 2549; Araujo and Leon, 2001; Singh *et al*., 2002; Cikrikci *et al*., 2008; Subramoniam *et al*., 2013) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนัง แก้โรคผื่นคัน รักษาแผลผุพอง แก้อาการแพ้เนื่องจากแมลงกัดต่อย (พันธิตร์, 2545) ใช้ในการสมานแผล การดูแลผิวพรรณ (วันทนี , 2546) ด้านการเกษตร กำจัดหมัดกระโดด (ทัศนี และพนารัตน์, 2544) กำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช (กอ, 2546) และมีงานวิจัยพบว่า ออกฤทธิ์โดยอ้อมในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (งามผ่อง และคณะ, 2549)

ปัจจุบันนำเทคนิคการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อพืชมาใช้อย่างกว้างขวาง เพราะสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดโรคได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (สมปอง, 2539) ขมิ้นชันเป็นพืชที่มีเหง้าใต้ดินการทำให้ปลอดเชื้อทำได้ค่อนข้างยาก มีรายงานการใช้สารละลายคลอรอกซ์และเมอคิวริคคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (Buddharaksa and U-kong, 2011; Goyal *et al.,* 2010; Jala, 2012; Theanphong *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2011) แต่ไม่มีการรายงานผลอัตราปลอดเชื้อของชิ้นส่วนพืช และมีการศึกษาการขยายพันธุ์ขมิ้นชันในหลอดทดลองทั้งทางตรงและทางอ้อมมากมาย (Shagufta *et al*., 2009; Goyal *et al.,* 2010; Jala, 2012; Sharma *et al.,* 2013) แต่จำนวนต้นที่ได้ยังมีปริมาณน้อย จึงทำการศึกษาวิธีการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ และวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองเพื่อผลิตต้นพันธุ์ขมิ้นชันจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นลง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้นชันอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. มีชื่อท้องถิ่นว่า ขมิ้น ขี้มิ้น หมิ้น (ภาคใต้) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยวก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ตายอ (กะเหรี่ยงกำแพงเพชร) สะยอ (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) เป็นพืชล้มลุกสูง 30 - 90 เซนติเมตร เหง้ามีรสฝาดและกลิ่นหอม ขนาดเล็กกว่าและฉุนกว่าเหง้าขมิ้นอ้อย ส่วนเหนือดินเป็นก้านใบหุ้มซ้อนกัน ใบเป็นใบเดี่ยวขนาดใหญ่แทงออกจากเหง้ารูปใบหอกกว้าง 12 - 15 เซนติเมตร ยาว 30 - 40 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อก้านดอกยาวแทงออกจากเหง้าแทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบ ช่อดอกรูปทรงกระบอก กลีบออกสีเหลืองอ่อน มีใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีนวล ดอกบานครั้งละ 3 - 4 ดอก ผลรูปกลม มี 3 พู (พันธิตร์, 2545) ในช่วงฤดูแล้งขมิ้นจะลงหัวใต้ดินส่งผลให้ลำต้นและใบบนดินแห้งตาย สายพันธุ์ขมิ้นชันที่ปลูกประเทศไทยที่ให้ผลผลิตสูงมีประมาณ 86 สายพันธุ์ (บุญหงษ์, 2553) ซึ่งจะขอกล่าวบางสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในภาคใต้และสายพันธุ์ที่ได้ผ่านการปรับปรุงพันธุ์มาแล้ว เช่น

-ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและสารสำคัญสูงกว่ามาตรฐานยาสมุนไพรไทยและสูงกว่าข้อกำหนดทางธุรกิจ คือ สารเคอร์คูมินอยด์เฉลี่ย 10.62 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันหอมระเหย 7.99 เปอร์เซ็นต์ และมี ar-turmerone 47.90 เปอร์เซ็นต์ (เก็บเกี่ยวที่อายุ 11 เดือน) และให้ผลผลิตหัวสดในภาคใต้ประมาณ 2.23 ตันต่อปี (กรมวิชาการเกษตร, 2556)

-ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 2 เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและสาระสำคัญสูงกว่ามาตรฐานยาสมุนไพรไทย และสูงกว่าข้อกำหนดทางธุรกิจ คือ สารเคอร์คูมินอยด์เฉลี่ย 10.04 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันหอมระเหย 7.78 เปอร์เซ็นต์ และมี ar-turmerone 23.38 เปอร์เซ็นต์ (เก็บเกี่ยวที่อายุ 11 เดือน) และให้ผลผลิตหัวสดในภาคใต้ประมาณ 2.59 ตันต่อปี (กรมวิชาการเกษตร, 2556)

-ขมิ้นชันพันธุ์แดงสยาม เป็นสายพันธุ์ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ค้นพบ ด้วยเทคโนโลยีการใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิด Microstellite marker ในการตรวจสอบลำดับเบสของขมิ้นชัน เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและมีสารเคอร์คูมินสูงประมาณ 10 - 12 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิต 6.2 ตันต่อไร่ มีการแนะนำและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพิ่มขึ้น (วิเชียร, 2548)

-ขมิ้นชันพันธุ์ TU04-9-20 Krad-r-lrr-16 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในชั่วรุ่นที่ 2 โดยรังสีแกมมา และสารคอลชิซีน (บุญหงษ์, 2553) โดยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำหนักสดประมาณ 0.975 ตันต่อไร่ น้ำหนักแห้งของเหง้าประมาณ 0.162 ตันต่อไร่ มีปริมาณเคอร์คูมิน 14.62 เปอร์เซ็นต์ ต้านทานโรคแอนแทรคโนส และหนอนกัดกินใบ (บุญหงษ์ และคณะ, 2552)

นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น ขมิ้นชันพังงา (ทับปุด) ขมิ้นชันสุราษฎร์ธานี (ตาขุน) ขมิ้นชันระนอง ขมิ้นชันนครศรีธรรมราช (ขมิ้นด้วง) เป็นต้น

การขยายพันธุ์ใช้ส่วนของเหง้าที่มีอายุการเก็บเกี่ยวระหว่าง 11 - 12 เดือน (องอาญ และคณะ, 2541) ขนาดของเหง้าพันธุ์ควรมีตาหรือแง่งอย่างน้อย 3 - 5 ตาหรือแง่ง พื้นที่ 1 ไร่ใช้ท่อนพันธุ์ประมาณ 350 - 420 กิโลกรัม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ส่วนหัว ซึ่งจะเจริญเติบโตและแตกเหง้าดี ให้

ผลผลิตสูง เนื่องจากในหัวมีอาหารสะสมอยู่มาก แต่มีข้อเสีย คือ การเก็บเกี่ยวแต่ละครั้ง 1 ต้น จะมีเพียง 1 หัวเท่านั้น (นิรนาม, 2557) สามารถปลูกได้ปีละ 1 ครั้ง เพราะมีการเจริญเติบโตนาน 7 - 10 เดือน มีการเจริญเติบโตตามฤดูกาลและการปลูกอาศัยน้ำฝนเป็นส่วนใหญ่ โดยเริ่มปลูกประมาณปลายเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม หลังปลูกประมาณ 4 - 5 เดือน ต้นขมิ้นชันจะเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-กันยายน และเข้าสู่ระยะพักตัวในฤดูแล้ง สภาพดินฟ้าอากาศชอบอากาศค่อนข้างร้อนและมีความชุ่มชื้นในเวลากลางคืน ชอบดินร่วนซุยมีความอุดมสมบูรณ์ ระบายน้ำดี ไม่ชอบดินเค็ม ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ประมาณ 5 - 7.5

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การนำชิ้นส่วนพืชชนิดใดก็ได้ เช่น อวัยวะต่าง ๆ ข้อ ตา ปลายยอดและราก โปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้นซึ่งประกอบไปด้วย เกลือแร่ ธาตุอาหารต่าง ๆ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินหรือไซโตไคนิน เนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาพแวดล้อม (รังสฤษฎ์, 2541) ข้อดีของการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ เพิ่มปริมาณได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น ปลอดโรค มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ โตเร็วและมีขนาดสม่ำเสมอ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้พร้อมกันและผลผลิตได้มาตรฐาน สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชได้ สามารถผลิตยา และสารสกัดจากพืชบางชนิดได้ (สมปอง, 2539)

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการเตรียมและคัดเลือกตัวอย่างพืช โดยคัดเลือกชิ้นส่วนที่เหมาะสม ปราศจากโรคและแมลง ชิ้นส่วนพืชแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ชิ้นส่วนพืชที่ไม่เกี่ยวกับเพศ เช่น ปลายยอด ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ใบ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ใบเลี้ยง ราก เป็นต้น และชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศ เช่น ละอองเกสร รังไข่ ไข่อ่อน ผล เมล็ด และต้นอ่อนในเมล็ด เป็นต้น ขั้นตอนที่ 2 การทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงต้องผ่านกระบวนการที่ทำให้ชิ้นส่วนดังกล่าวปลอดเชื้อ โดยต้องเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับชิ้นส่วนพืช สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้แต่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อ เพราะจะส่งผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อ ขั้นตอนที่ 3 การเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ขั้นตอนนี้เป็นการนำเอาชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อแล้ว มาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ซึ่งบรรจุในภาชนะเลี้ยง แล้วนำไปวางเลี้ยงในสภาพที่สามารถควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้นตามความต้องการ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่และเพิ่มปริมาณทั้งทางตรงและทางอ้อม ขั้นตอนที่ 4 การเตรียมเพื่อย้ายปลูก ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมต้นพืชที่สมบูรณ์ก่อนการย้ายปลูกสู่ธรรมชาติ เป็นการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อให้ยืดยอด และมีรากบนอาหารสังเคราะห์ในภาชนะเลี้ยงที่ควบคุมสภาพแวดล้อม และขั้นตอนสุดท้าย คือ การย้ายปลูกสู่สภาพธรรมชาติ ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ขึ้นอยู่กับความสามารถในการย้ายปลูกให้ได้ต้นพืชที่เติบโตอย่างรวดเร็ว ขั้นตอนนี้เกี่ยวกับการปรับสภาพหรือการทำให้ต้นพืชแข็งแรงและมีชีวิตรอด

1. ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมี 2 ประการ คือ ขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งต้องเลี้ยงชิ้นส่วนพืชแล้วชักนำให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ความสำเร็จดังกล่าวต้องคำนึงถึง คืออาหารที่ใช้เลี้ยงในแต่ละสูตรมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกันแต่ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไป การเลือกใช้สูตรอาหารต้องให้เหมาะสมกับชนิดของพืช สูตรอาหารที่ใช้กันทั่วไป คือ สูตรมูราชิกและสกุค (Murashige and Skoog, 1962 หรือ MS) ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง น้ำตาลซูโครส วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็น ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารที่วางเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงต้องคำนึงถึงขนาดชิ้นส่วนพืช แหล่งของชิ้นส่วนพืช และอายุของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม สภาพแวดล้อมการเลี้ยง ฤดูกาล ซึ่งฤดูฝนมีโอกาสปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้สูง ระยะเวลาของการย้ายเลี้ยง การย้ายเลี้ยงในอาหารเป็นเวลานานมีผลทำให้การสร้างพืชต้นใหม่ลดลง หรือพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่คงเดิมแต่ต้นพืชที่ได้มีความปรวนแปรสูงมาก อัตราการกลายพันธุ์สูง (สมปอง, 2539) และปัจจัยทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งนับว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเราจำเป็นต้องคำนึงถึงขั้นตอนและปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้บรรลุไปตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

2. การทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจำเป็นต้องปลอดเชื้อในทุกขั้นตอน การเตรียมชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นให้ปลอดเชื้อ มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เพราะเมื่อได้ผลแล้วก็สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ และเพิ่มปริมาณได้ตามต้องการ เนื่องจากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้มีการปนเปื้อนด้วยสิ่งสกปรกและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ก่อนนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จึงต้องนำชิ้นส่วนพืชมาฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากภายนอก โดยการใช้สารละลายฟอกฆ่าเชื้อ การใช้ต้องคำนึงถึงชนิด ความเข้มข้น และเวลาที่เหมาะสมกับชิ้นส่วนของพืช สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อเจริญของพืช เพราะจะส่งผลต่อพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อโดยสังเขป ดังนี้ นำชิ้นส่วนพืชมาทำความสะอาด เอาดินหรือทรายที่ติดมาออกให้หมด โดยให้น้ำไหลผ่านค่อนข้างแรง ตัดชิ้นส่วนพืชให้มีขนาด 1.5 – 2 นิ้ว ตัดส่วนที่มีแผลเชื้อโรค เนื้อเยื่อที่แก่หรือไม่สะอาดทิ้งให้หมด ทำความสะอาดครั้งแรกด้วยสบู่หรือน้ำยาล้างจานซึ่งมีฤทธิ์เป็นกลางไม่กัด หรือสร้างแผลให้กับชิ้นส่วนพืช จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง หรือให้น้ำไหลผ่าน นาน 20 - 60 นาที ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชอีกครั้ง จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30-60 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น (สมปอง, 2539) จุ่มแช่ในสารละลายที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ ดังตารางที่ 1 อาจใช้สารจับใบร่วมด้วยเพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อเข้าไปในผิวของเนื้อเยื่อที่ไม่เรียบหรือมีขนได้ดีขึ้น เช่น Tween 20 (poly-oxyethylene sorbitan monolaurate) หรือ Teepol เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 1 - 2 หยด หรือใช้ผงซักฟอกในปริมาณที่พอเหมาะ (รังสฤษดิ์, 2541) นำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง เทสารละลายฟอกฆ่าเชื้อทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 - 5 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชออกมาซับด้วยกระดาษทิชชู

ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการตัดแต่งชิ้นส่วนพืชเพื่อวางเลี้ยงบนอาหารต่อไป ประสิทธิภาพของสารฟอกฆ่าเชื้อแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับ ระยะเวลา และปริมาณของสารที่ใช้ โดยปกติประสิทธิภาพจะเพิ่มมากขึ้นถ้าใช้เวลาและความเข้มข้นของสารมากขึ้น หากใช้มากเกินไปอาจทำอันตรายต่อความมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืชได้ (รังสฤษดิ์, 2541) จึงควรทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสม สุจิตรา และคณะ (2557) พบว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อของไม้น้ำใบพายที่เหมาะสม คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ยาปฏิชีวนะเตตร้าไซคลินเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารจับใบเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และเมอร์คิวริคคลอไรด์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเป็นเวลา 1 เดือน มีผลให้จำนวนยอดอ่อนที่ปลอดเชื้อ และสามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนเฉลี่ยได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 83.33 ± 7.64 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 ชนิด ความเข้มข้น ระยะเวลา และประสิทธิภาพ ของสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

สารเคมี	ความเข้มข้น %	ระยะเวลา (นาที)	ประสิทธิภาพ
แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ($CaOCl_2$)	9 - 10	5 - 30	ดีมาก
โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl ชื่อทางการค้า คือ คลอรอกซ์)	0.25 - 2.65	5 - 30	ดีมาก
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	10 - 12	5 - 15	ดี
น้ำโบรมีน	1 - 2	2 - 10	ดีมาก
ซิลเวอร์ไนเตรท [$Ag(NO_3)_2$]	1	5 - 30	ดี
น้ำไอโอดีน	3	30	ดี
เมอร์คิวริคคลอไรด์ ($HgCl_2$)	0.1 - 1.0	2 - 10	พอใช้
เมอร์คิวริคไอโอดายด์ (Hgl_2)	0.5	30	ดี
เมอร์คิวริคโบรมายด์ ($HgBr_2$)	0.5	30	ดี
แอลกอฮอล์	70 - 95	2 - 5	ดีมาก
กรดซัลฟอริก (H_2SO_4)	20 - 70	5 - 20	ดีมาก

ที่มา ; ดัดแปลงจาก รังสฤษดิ์ (2541)

Buddharaksa และ U-kong (2011) พบว่า วิธีการฟอกฆ่าเชื้อของยอดผักหวานบ้านที่เหมาะสม คือ การใช้สารละลายครอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลายครอรอกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่งผลให้ชิ้นส่วน

ยอดผักหวานปลอดเชื้อดีที่สุดและมีอัตรารอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขมิ้นชัน Shagufta และคณะ (2009) ใช้วิธีจุ่มแช่แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 - 40 วินาที จากนั้นจุ่มแช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 20-50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที Goyal และคณะ (2010) เลือกใช้การจุ่มแช่ในสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที Zhang และคณะ (2011) เลือกใช้วิธีจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วินาที และสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้ Jala (2012) ใช้วิธีจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจุ่มแช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยจุ่มแช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง ก่อนล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แต่ไม่มีการรายงานผลอัตราชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อหลังการวางเลี้ยง

3. การเพาะเลี้ยงปลายยอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่มีจุดกำเนิดอยู่แล้วอย่าง เช่น ปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด เป็นต้น มีข้อดีคือจะได้ยอดที่เจริญพัฒนาเป็นต้นพืชต้นใหม่ได้โดยตรง จึงเป็นการขยายพันธุ์ที่ได้ต้นพืชตรงตามสายพันธุ์เดิม ต้นที่ได้ยังปลอดโรคโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และเมื่อขนาดของชิ้นส่วนปลายยอดที่วางเลี้ยงใหญ่ขึ้นจำนวนของตาด้านข้างก็มากขึ้น เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมไซโตไคนินในอัตราความเข้มข้นที่สูง ช่วยส่งเสริมการเกิดยอดแขนงจากตาด้านข้างในอัตราที่สูง (สมปอง, 2539) เป็นการขยายพันธุ์ที่เหมาะกับการเพิ่มปริมาณของพืชพันธุ์ดี จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนเริ่มต้น 1 ชิ้น ภายในระเวลา 1 ปี อาจได้มากกว่าล้านยอด เนื่องจากพืชหลายชนิดสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ 3 - 8 เท่า ในการเปลี่ยนอาหารแต่ละครั้ง (ปิยดา และอารีย์, 2551)

จากการศึกษาในพืชวงศ์ Zingiberaceae อาทิ Shukla และคณะ (2007) พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดของ *C. angustifolia* Roxb. บนอาหารสูตร MS เติม 6-Benzyladenine (BA) เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.87 ± 0.28 ยอดต่อชิ้นส่วน Yusuf และคณะ (2011) พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดของ *Boesnbergia rotunda* L. บนอาหารสูตร MS เติม N_6-benzylaminopurine (BAP) เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α-napthalene acetic acid (NAA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 4.9 ± 0.1 ยอดต่อชิ้นส่วน Bhattacharya และ Sen (2013) พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดของ *Kaempferia galanga* L. บนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-furfurylaminopurine (KN) เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 16.52 ± 0.22 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับขมิ้นชัน Jala (2012) พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 2.6 ยอดต่อชิ้นส่วน Sharma และคณะ (2013) พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 88.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน การเพาะเลี้ยงส่วนยอดในขมิ้นชัน จะเห็นได้ว่าในขมิ้นชันเกิด

จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงค่อนข้างน้อย และบางชนิดใช้ไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวเติมลงในอาหารที่วางเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ แต่ในพืชบางชนิดต้องใช้ทั้งออกซินและไซโตไคนินร่วมกันจึงจะสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ทั้งนี้เป็นเพราะพืชบางชนิดมีปริมาณของออกซินที่เหมาะสมอยู่แล้ว จึงไม่จำเป็นต้องเติมลงในอาหารที่วางเลี้ยง

4. การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมาแต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีครอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ และฟลาโวทีนอยด์ หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ปริมาณ และชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง (รังสฤษดิ์, 2541) โดยทั่วไปแบ่งเป็นแคลลัสที่มีโครงสร้างแน่นทึบซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันแน่น เรียกว่า Compact callus และแคลลัสที่มีโครงสร้างร่วนเปราะซึ่งกลุ่มของเซลล์จะเกาะกันอย่างหลวม ๆ เรียกว่า Friable callus (สมปอง, 2539)

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ซึ่งชิ้นส่วนพืชที่มีสภาพเหมาะต่อการชักนำแคลลัสควรเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย นิยมใช้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ คือ คัพภะ ใบอ่อน ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือหรือใต้ใบเลี้ยง ปลายยอด ดอกอ่อน ราก ส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอก และเนื้อเยื่อพิเศษอื่น ๆ ของพืช คือ แคมเบียม คอร์เทค ไส้หรือแกนลำต้น ท่อลำเลียงอาหาร ไซเลมพาเรนไคมา และเอ็นโดสเปิร์ม (รังสฤษดิ์, 2541)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส ขนาด และรูปร่าง ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงไม่มีข้อจำกัดแต่มักใช้ชิ้นส่วนขนาดค่อนข้างเล็ก แต่ไม่เล็กมากจนเกินไปเพราะจะทำลายเนื้อเยื่อเจริญขณะแยก ชนิดของพืช ชนิด และอายุของชิ้นส่วนพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยทั่วไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส ความเข้มข้นของออกซินที่ใช้อยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนินอยู่ในช่วง 0.10-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณ และสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของชิ้นส่วนพืช และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่นำมาใช้ (รังสฤษดิ์, 2541) ธาตุอาหาร นอกจากธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบหลักทั่ว ๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว ยังมีอาหารเสริมพวกกรดอะมิโน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว ที่มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย เช่นกัน แหล่งของคาร์บอน ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และแซคคาโรส ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่วางเลี้ยง สภาพอาหาร แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักจะเจริญเติบโตได้น้อยหรือช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึมที่ปลดปล่อยมาจากเซลล์ซึ่งมีผลต่อ

การเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทั่วไปแล้วชิ้นส่วนพืชจะสร้างแคลลัสมากพอที่จะแบ่งและเปลี่ยนอาหารใหม่ภายใน 3 - 8 สัปดาห์ ขนาดของแคลลัสที่แยกต้องมีขนาดไม่เล็กจนเกินไปเพื่อไม่ให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนที่เริ่มเลี้ยง ชนิดของพืช ชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืชอีกด้วย ปกติแล้วทำการเปลี่ยนอาหารจะกระทำทุก ๆ 4 สัปดาห์ (รังสฤษดิ์, 2541) มีรายงานการวิจัยการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสในพืชวงศ์ Mohanty และคณะ (2008) พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนฐานที่เกิดยอดของ *C. aromatic* บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา30 วัน ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 82.16 เปอร์เซ็นต์ Raju และคณะ (2013) พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบของ *C. amada* Roxb. บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 26.43 เปอร์เซ็นต์ Zuraida และคณะ (2014) พบว่า การวางเลี้ยงยอดเดี่ยว ของ *K. parviflora* บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 95 วัน ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 20 ± 4.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาในขมิ้นชัน Kar และคณะ (2014) พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนฐานที่เกิดยอดของขมิ้นชัน บนอาหาสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 80.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสูตรอาหาร ชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโต และความเข้มข้นที่ใช้เหมือนกัน ชนิดของพืชที่ใช้แตกต่างกัน ส่งผลต่ออัตราการเกิดแคลลัสได้ต่างกัน พืชบางชนิดต้องการเพียงออกซิน แต่พืชบางชนิดต้องการทั้งออกซินและไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการแบ่งตัว และเพิ่มปริมาณ

5. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ

พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ มี 2 ช่องทาง คือ การสร้างยอดหรือราก หรือทั้งต้นทั้งรากจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่โดยการสร้างต้นอ่อน มีการสร้างยอดและรากเกิดขึ้นพร้อมกัน หรือพัฒนามาจากการสร้างแคลลัส (สมปอง, 2539)

โซมาติกเอ็มบริโอ หมายถึง โซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนามาจากเซลล์ร่างกายซึ่งมีโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย นั่นคือ มีส่วนที่จะกลายเป็นรากและยอด มีทั้งการพัฒนาทางตรงและทางอ้อมนั่น คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงโดยตรงเป็นการพัฒนาของคัพภะจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง เริ่มจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอและพัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อนพืชในที่สุด การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยอ้อมเป็นการพัฒนามาจากแคลลัส โดยเริ่มจากชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงเกิดแคลลัส จากนั้นพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ แล้วพัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อนพืชที่สมบูรณ์ การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยการผ่านแคลลัสนั้น แคลลัสจะพัฒนามาจากรอยตัดของชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เมื่อเนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วเป็นกลุ่มแคลลัส เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมก็จะงอกเป็นพืชต้นใหม่ แต่ต้นพืชที่ได้มีลักษณะแปรปรวน ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้เหมาะกับการปรับปรุงพันธุ์

เพื่อให้ได้เป็นพืชชนิดใหม่หรือพืชที่มีลักษณะใหม่ (สมปอง, 2539) มีรายงานการวิจัยในพืชวงศ์ Zingiberaceae Raju และคณะ (2013) พบว่า การย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *C. amada* Roxb. ในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 62.93 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 54.52 โซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน Zuriada และคณะ (2014) พบว่า หลังการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *C. caesia* บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 53 ± 4.5 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นพืช 15 ± 2.6 ต้น จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนพืชบางชนิดต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวก็สามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่พืชบางชนิดต้องการทั้งไซโตไคนินและออกซินลงในอาหารที่วางเลี้ยง เพื่อที่จะส่งเสริมแคลลัสพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่

6. การเตรียมและย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติ

ขั้นตอนสุดท้ายของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ต้นกล้าสามารถมีชีวิตรอดและมีการเจริญพัฒนาในสภาพธรรมชาติได้ จึงจะนับว่าประสบความสำเร็จ ต้นกล้าที่ได้จากกระบวนการสร้างต้นอ่อนที่มีทั้งยอดและราก ถือเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์แล้วไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการชักนำราก สามารถนำไปย้ายปลูกได้เลย ส่วนกรณีที่มีเพียงยอดต้องมีการชักนำรากก่อน การชักนำรากสามารถทำได้ในสภาพปลอดเชื้อ และในสภาพแปลงปลูก ซึ่งการชักนำรากในสภาพปลอดเชื้อจะสามารถสร้างรากสูงกว่า และเปอร์เซ็นต์การตั้งตัวเมื่อย้ายปลูกลงดินสูงกว่า ขั้นตอนนี้เกี่ยวกับการปรับสภาพหรือทำให้พืชแข็งแรง ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ และความเข้มแสงสูง ด้วยการปรับสภาพแบบค่อย ๆ เปลี่ยนไป

การชักนำรากในไม้ดอก และพืชผัก ทำโดยตัดแยกยอดแต่ละยอดมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS หรือ สูตร สูตรอาหารที่ลดธาตุองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือ เติม NAA เข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole-3-butyric acid (IBA) เข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากภายในเวลา 3 - 6 สัปดาห์ แต่การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจก่อให้เกิดผลเสีย คือ เปอร์เซ็นต์ จำนวนและความยาวรากที่ลดลง แล้วยังส่งเสริมการสร้างแคลลัสทำให้การกลายพันธุ์เป็นไปได้สูง กรณีไม้ยืนต้นทำได้โดยตัดยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS เติม BA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ Indole-3-acetic acid (IAA) เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (สมปอง, 2539) ในบางครั้งมีการเติมผงถ่าน 0.02-0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้มีการเกิดรากได้ดีขึ้น ในสภาพแปลงปลูกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีขายในท้องตลาด เช่น เซราดิกเบอร์ต่าง ๆ เลือกใช้ให้เหมาะสมกับประเภทของเนื้อไม้ เมื่อได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์จึงย้ายปลูกลงดิน สรุปได้ดังนี้

ขั้นตอนการย้ายปลูกลงดิน เริ่มจากการนำต้นกล้าที่สมบูรณ์ออกจากภาชนะที่ย้ายเลี้ยง ล้างวุ้นที่ติดมากับรากออกให้หมด เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ จุ่มแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น เบตาดีน จากนั้นผึ่งลมให้แห้งพอหมาด ๆ นำปลูกในภาชนะที่บรรจุวัสดุปลูกผสม หากเป็นชนิดพืชที่มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตต่ำวัสดุปลูกควรผ่านการอบฆ่าเชื้อก่อน ให้น้ำด้วยระบบพ่นหมอก หากไม่มีอุปกรณ์

ประยุกต์ใช้ภาชนะแก้ว หรือถุงพลาสติกคลุมต้นกล้าที่ย้ายปลูก 3 - 4 วัน จึงเปิดออก ทั่วไปใช้เวลา 1 - 4 สัปดาห์ ย้ายปลูกลงดินในภาขนะที่ต้องการ หรือแปลงปลูก ให้น้ำและดูแลรักษา ตามความต้องการของพืช

จากการศึกษาอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูกลงดินในพืชวงศ์ Zingiberaceae Mohanty และคณะ (2008) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของ *C. aromatic* ลงในกระถางที่บรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุปลูก วางเลี้ยงในเรือนกระจก เป็นเวลา 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ Zhang และคณะ (2011) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของ *C. kwangsiensis* ลงในกระถางพลาสติกที่บรรจุดิน ขุยมะพร้าว และเพอไลท์ เป็นวัสดุปลูก อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1 วางเลี้ยงในเรือนกระจก เป็นเวลา 2 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในขมิ้นชัน Shagufta และคณะ (2009) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ลงปลูกในกระถางบรรจุดิน ทราย และดินพีท เป็นวัสดุปลูก อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ1 วางเลี้ยงในเรือนกระจก นาน 30 - 50 วัน จากนั้นย้ายปลูกลงในแปลงปลูก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิต 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ Goyal และคณะ (2010) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ลงในบีกเกอร์ที่บรรจุดินสวน และทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อัตราส่วน 1 ต่อ 1 วางเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 93 เปอร์เซ็นต์ Ghosh และคณะ (2013) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ลงในกระถางที่บรรจุดิน และเวอมิคูไลท์ อัตราส่วน 2 ต่อ 1 นาน 30 วัน จากนั้นย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติก วางเลี้ยงเรือนกระจก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิต 86 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าต้นกล้าขมิ้นชันที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอัตรารอดชีวิตค่อนข้างสูง เมื่อย้ายปลูกในวัสดุปลูกคุณภาพดีผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวางเลี้ยงในเรือนกระจก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชัน
2. เพื่อศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันในหลอดทดลอง
3. เพื่อศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง
4. เพื่อศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของขมิ้นชันในหลอดทดลอง
5. เพื่อศึกษาอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูกต้นขมิ้นชันที่ได้จากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชลงดิน

บทที่ 2

การทดลองที่ 1

ศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ

บทนำ

ขมิ้นชัน จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชสมุนไพร ที่มีการใช้ประโยชน์ทั้งอาหารและยาทั้งในมนุษย์และสัตว์ (วันทนี, 2546; งามผ่อง และคณะ, 2549; ศุภารัตน์ และคณะ, 2549; Sangousa and Punnipa, 2011; Rajamma *et al*, 2012; Subramoniam *et al*., 2013) ปัจจุบันนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้การขยายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น เทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องปลอดเชื้อทุกขั้นตอน มีการศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อในไม้น้ำใบพายและผักหวานบ้าน (สุจิตรา และคณะ; 2557; Buddharaksa and U-kong, 2011) สำหรับขมิ้นชันซึ่งเป็นพืชที่มีเหง้าใต้ดิน มีข้อที่สั้นและถี่ การทำให้ปลอดเชื้อทำได้ค่อนข้างยาก มีรายงานการใช้สารละลาย คลอรอกซ์ และเมอร์คิวริวคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (Goyal *et al.,* 2010; Theanphong *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2011; Jala, 2012) แต่ไม่มีการรายงานผลอัตราปลอดเชื้อของชิ้นส่วนพืช จึงทำการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมที่ทำให้ชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ และมีการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อ หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพที่ควบคุมสภาพแวดล้อม

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำเหง้าของขมิ้นชันจากแปลงปลูกที่ หมู่ที่ 6 (บ้านเก่าร้าง) ตำบลคลองหอยโข่ง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา อายุประมาณ 8 - 12 เดือน ล้างทำความสะอาด เอาดินและสิ่งสกปรกออกให้หมดโดยใช้น้ำประปา ตัดรากออก

ศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ

นำเหง้าขมิ้นชันมาเลือกเฉพาะชิ้นส่วนหน่องอกที่ยังอ่อน ยาวประมาณ 1 - 1.5 นิ้ว มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ 4 วิธี (ตารางที่ 2.1) หลังฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำชิ้นส่วนมาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 17.97 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 10 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อของชิ้นส่วนพืช เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) ในแต่ละวิธีการฟอกฆ่าเชื้อทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 40 ชิ้นส่วน

ตารางที่ 2.1 เทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ

วิธีที่	วิธีการ
1	ให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตาม ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2	ให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
3	ให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที สารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์ เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
4	ให้น้ำไหลผ่าน 15 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน พบว่า วิธีการที่ใช้สารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์ เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูงสุด 73.5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่เมื่อวางเลี้ยงไประยะหนึ่ง พบว่า ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่การใช้สารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อรองลงมา 68.5 เปอร์เซ็นต์ และไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีดังกล่าวข้างต้น (ตารางที่ 2.2) อีกทั้งชิ้นส่วนพืชยังเป็นสีเหลืองอมส้ม และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียว เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ทั้งนี้ลักษณะเหง้าของขมิ้นชันที่มีข้อถี่ และเจริญอยู่ใต้ดิน การทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อจึงทำได้ยาก ซึ่งการใช้สารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์ที่ใช้เข้มข้นสูง เป็นเวลา 15 นาที ส่งผลให้เซลล์บริเวณที่สัมผัสสารโดนทำลาย และเซลล์บริเวณนั้นตาย ซึ่งปกติความเข้มข้นของสารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์ใช้อยู่ที่ประมาณ 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที (Goyal *et al.,* 2010; Theanphong *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2011) สำหรับวิธีการใช้สารละลายครอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยสารละลายครอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween

20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Buddharaksa และ U-kong (2011) ที่ใช้วิธีการข้างต้น ทำให้ชิ้นส่วนยอดผักหวานปลอดเชื้อ 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากลักษณะข้อของขมิ้นชันนั้นเจริญอยู่ใต้ดินและมีจำนวนข้อถี่ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ร่วมกับ Tween 20 ความเข้มข้นสูงเพียงครั้งเดียว ทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อได้น้อยกว่า การใช้สารละลายคลอรอกซ์ร่วมกับ Tween 20 ความเข้มข้นที่น้อยลงและฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เนื่องจากเวลาที่ใช้ฟอกน้อยเกิดไปทำให้เชื้อจุลินทรีย์ยังคงปนเปื้อนอยู่ และความเข้มข้นที่สูงจะทำลายเซลล์บริเวณที่สัมผัส ส่งผลให้เซลล์บริเวณนั้นตาย

ตาราง 2.2 ผลของเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันปลอดเชื้อ

วิธีการที่	อัตราปลอดเชื้อของชิ้นส่วนพืช (%)
1	44.0 [b]
2	68.5 [a]
3	73.5 [a]
4	35.5 [b]
F-test	**
C.V.(%)	12.8

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

สรุป

การศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ พบว่า การให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูง 68.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด

การทดลองที่ 2

ผลของชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันในหลอดทดลอง

บทนำ

ขมิ้นชัน เป็นพืชดั้งเดิมในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันมากในประเทศมาเลเซีย อินเดีย ศรีลังกา และปากีสถาน จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. ชื่อสามัญว่า curcuma turmeric yellow root เป็นพืชมีอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดินสีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นเฉพาะ สายพันธุ์ขมิ้นชันที่นิยมปลูกในภาคใต้ เช่น ตาขุน (สุราษฎร์ธานี) ขมิ้นด้วง (นครศรีธรรมราช) พันธุ์ตรัง 1 และพันธุ์ตรัง 2 (กรมวิชาการเกษตร, 2554) ซึ่งมีปริมาณ curcumin ค่อนข้างสูง คนไทยนิยมใช้ขมิ้นอ้อยปรุงอาหารมากกว่า ขมิ้นชันมักใช้เป็นยา เหง้าขมิ้นชันนิยมใช้แต่งอาหารให้มีสีเหลือง (พันธิตร์, 2545) ด้านการรักษาใช้เป็นพืชสมุนไพรแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้จุกเสียด (Thamlikikul *et al*., 1989) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหาร (Sangousa and Punnipa, 2011) รักษาแผลเปื่อยในกระเพาะและลำไส้ (Prucksunand *et al*., 2001) ลดการอักเสบชนิดเฉียบพลัน และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (นลินี, 2545; ศุภารัตน์ และคณะ, 2549; Araujo and Leon, 2001; Singh *et al*., 2002; Cikrikci *et al*., 2008; Subramoniam *et al*., 2013) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนัง แก้โรคผื่นคัน รักษาแผลผุพอง แก้อาการแพ้เนื่องจากแมลงกัดต่อย (พันธิตร์, 2545) ใช้ในการสมานแผล การดูแลผิวพรรณ (วันทนี, 2546) ด้านการเกษตร กำจัดหมัดกระโดด (ทัศนี และพนารัตน์, 2544) กำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช (กอ, 2546) และมีงานวิจัยพบว่าออกฤทธิ์โดยอ้อมในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (งามผ่อง และคณะ, 2549) ปัจจุบันนำเทคนิคการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อพืชมาใช้อย่างกว้างขวาง เพราะสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดโรคได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (สมปอง, 2539) และมีงานวิจัยการขยายพันธุ์ขมิ้นชันในหลอดทดลองมากมาย แต่จำนวนต้นที่ได้ยังมีปริมาณน้อย (Shagufta *et al*., 2009; Goyal *et al.,* 2010; Jala, 2012; Sharma *et al.,* 2013) ดังนั้นจึงสนใจศึกษาการขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง เพื่อผลิตต้นพันธุ์ขมิ้นชันจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นลง

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำเหง้าขมิ้นชันชิ้นส่วนแง่งที่ 1 และแง่งที่ 2 (sprouted rhizome) อายุประมาณ 8-12 เดือน ที่เริ่มงอกส่วนหน่ออ่อน นำมาล้างดินและสิ่งสกปรกออก จากนั้นตัดแต่งเอารากออกนำมาล้างให้สะอาดอีกครั้ง ตัดเอาเฉพาะส่วนที่ยังอ่อนอยู่ยาวประมาณ 1-1.5 นิ้ว นำมาล้างทำความสะอาดกับน้ำยาล้างจาน หลังจากนั้นให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1. ศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดขมิ้นชัน

นำชิ้นส่วนพืชของขมิ้นชันที่ผ่านการฟอกฆ่าแล้วมาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เติม 2, 4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Thidiazuron (TDZ) เข้นข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 6-Furfurylaminopurine (KN) เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 10.64 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนการสร้างยอดต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ชิ้นส่วน

2. ศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชัน

นำชิ้นส่วนพืชยอดของขมิ้นชันที่ได้จากการศึกษาข้างต้น ตัดแต่งให้เป็นยอดเดี่ยวยาว 1.0 เซนติเมตร มาย้ายเลี้ยงบนสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA เข้มข้น 1.0 - 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 10.64 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนการสร้างยอดและจำนวนรากต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 6 ชิ้นส่วน

3. ศึกษาอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูกลงดิน

นำชิ้นส่วนยอดเดี่ยว ยาว 1 เซนติเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 10.64 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้าให้มากขึ้น นำต้นกล้าขมิ้นชันที่สมบูรณ์ออกจากภาชนะที่วางเลี้ยง ล้างผงวุ้นที่ติดมาออกให้หมดผึ่งลมพอแห้งหมาด ๆ แล้วจุ่มส่วนของรากต้นกล้าขมิ้นชันลงในสารละลาย povidone-iodine (เบตาดีน) จากนั้นผึ่งลมพอแห้งหมาด ๆ จึงนำต้นกล้าขมิ้นชันย้ายปลูกในถาดหลุมเพาะชำพลาสติกสีดำ ขนาด 104 หลุม ที่บรรจุดินปลูกผสมเสร็จเป็นวัสดุปลูก ปลูกทั้งหมดจำนวน 168 ต้น จากนั้นรดน้ำให้ชุ่ม นำถุงพลาสติกใสขนาด 30 × 40 นิ้ว มาบรรจุถาดหลุมพลาสติกที่ปลูกต้นขมิ้นชันเรียบร้อยแล้ว ปิดปากถุงพลาสติกใสให้แน่น วางเลี้ยงในสภาพที่ให้ร่มเงา เมื่อครบ 3 วัน เปิดปากถุงทิ้งไว้ 10 ชั่งโมง ปิดปากพลาสติกถุงอีกครั้ง เมื่อครบ 7

วัน นำถาดหลุมออกจากถุงพลาสติกใส สังเกตดูหากวัสดุปลูกยังมีความชื้นไม่ต้องให้น้ำ ครบ 1 เดือน บันทึกอัตรารอดชีวิต จากนั้นนำต้นกล้าที่อนุบาลแล้วย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 6 นิ้ว ที่บรรจุดินปลูกผสมเสร็จ ดินร่วน ขุยมะพร้าว และปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2 ต่อ 1 ต่อ 1 ต่อ 1 จำนวน 100 ต้น รดน้ำให้ชุ่ม การให้น้ำหลังจากนี้สังเกตวัสดุปลูกเป็นสำคัญ หากวัสดุปลูกยังมีความชื้นสูง ไม่ต้องให้น้ำ วางเลี้ยงในสภาพที่ให้ร่มเงา เมื่อครบ 1 เดือน บันทึกผลอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกสีดำ

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาการชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 2.4 และภาพที่ 2.1 (ก)) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dey และคณะ (2012) พบว่า ชิ้นส่วนหน่องอกของข้าวสายพันธุ์ IR-64 บนอาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 10.3 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังพบว่า ชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันที่วางบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ถึงแม้ว่าสามารถส่งเสริมการเกิดยอดเพียง 1.67 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สามารถส่งเสริมการเกิดแคลลัส (ภาพที่ 2.1 (ข)) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิลาสินี และคณะ (2557) พบว่า friable callus ของบุกเนื้อทรายสามารถเพิ่มปริมาณได้ดี บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลการเพิ่มปริมาณจากยอดเดี่ยวที่ชักนำขมิ้นชันในหลอดทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 4.17 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 2.5 และภาพที่ 2.2 (ก)) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jala (2012) ที่พบว่า ชิ้นส่วนหน่ออ่อนของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 2.60 ยอดต่อชิ้นส่วน และในขณะที่อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างรากได้ดีที่สุด 19.74 รากต่อยอด (ภาพที่ 2.2 (ข)) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nasri และคณะ (2013) พบว่า จากการวางเลี้ยงฐานใบของลูกผสม *Alstroemeria ligto* บนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดรากสูงสุด 2.7 รากต่อชิ้นส่วน จะเห็นได้ว่าปริมาณของออกซินและไซโตไคนินที่ใช้มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช หากสัดส่วนของออกซินมีความเข้มข้นสูงจะส่งเสริมการสร้างราก ส่วนไซโตไคนินสูงจะส่งเสริมการสร้างยอด กระบวนการนี้บางครั้งได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ คือมีทั้งยอดและราก บางครั้งสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมจะส่งเสริมการสร้างยอดเพียงอย่างเดียว (สมปอง, 2539) และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่งเสริมให้เกิดยอด 1.25 ยอดต่อชิ้นส่วน ชักนำให้เกิดราก 7.75 รากต่อชิ้นส่วน แสดงว่า อาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีธาตุอาหารที่เพียงพอกับความต้องการของพืชอยู่แล้ว และชิ้นส่วนยอดขมิ้นชันที่วางเลี้ยงมีปริมาณของออกซินเหมาะสมต่อการชักนำรากอยู่แล้ว จึงสามารถส่งเสริม

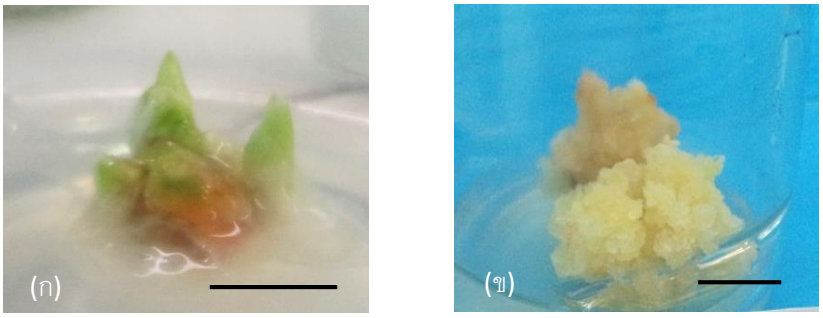
ตารางที่ 2.4 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดขมิ้นชัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)					จำนวนยอด/ชิ้นส่วนพืช
2,4-D	TDZ	NAA	BA	KN	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.33[ab]
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.67[b1]
0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	3.33[a]
0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	1.33[b]
0.0	0.0	1.0	5.0	0.0	2.33[ab]
0.0	4.0	1.0	5.0	0.0	1.67[b]
0.0	4.0	1.0	0.0	2.0	1.67[b]
0.5	0.0	1.0	0.0	2.0	0.00[c]
F-test					**
C.V. (%)					30.14

[1] สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.1 การชักนำยอดของชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชัน

(ก) ชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันที่เกิดยอดหลังการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 4.0 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์

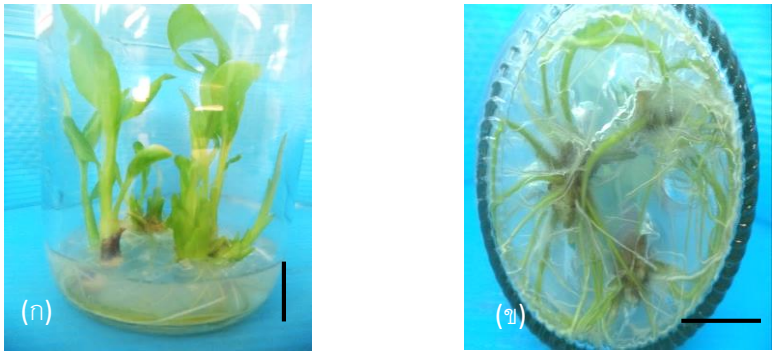
(ข) ชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันที่เกิดแคลลัส บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก/ล เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)

ตารางที่ 2.5 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)			จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช	จำนวนรากต่อชิ้นส่วนพืช
BA	NAA	2,4-D		
0.0	0.0	0.0	1.25^{c}	7.75^{c}
1.0	0.0	0.0	3.46^{ab}	9.67^{c}
1.0	0.5	0.0	3.50^{ab}	9.84^{c}
1.0	1.0	0.0	3.00^{ab}	10.66^{bc}
1.0	0.0	0.5	0.00^{c}	0.00^{d}
1.0	0.0	1.0	0.00^{c}	0.00^{d}
2.0	0.0	0.0	4.17^{a}	8.92^{c}
2.0	0.5	0.0	2.79^{b}	10.04^{c}
2.0	1.0	0.0	3.59^{ab}	13.84^{b}
2.0	0.0	0.0	0.00^{c}	0.00^{d}
2.0	0.0	0.5	0.00^{c}	0.00^{d}
3.0	0.0	1.0	3.25^{ab}	8.92^{c}
3.0	0.5	0.0	2.67^{b}	9.84^{c}
3.0	1.0	0.0	2.84^{ab}	10.66b^{c}
3.0	0.0	0.5	0.00^{c}	0.00^{d}
3.0	0.0	1.0	0.00^{c}	0.00^{d}
0.0	0.5	0.0	2.50^{b}	19.74^{a}
0.0	1.0	0.0	2.84^{ab}	19.75^{a}
0.0	0.0	0.5	0.75^{c}	0.00^{d}
0.0	0.0	1.0	0.00^{c}	0.00^{d}
F-test			**	**
C.V. (%)			34.93	24.84

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.2 การเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันจากชิ้นส่วนยอดเดี่ยว เป็นเวลา 8 สัปดาห์
(ก) ยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดเดี่ยวของ ขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.0 มก/ล
(ข) รากที่เกิดจากชิ้นส่วนยอดเดี่ยวของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มก/ล (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)

ภาพที่ 2.3 การอนุบาลและการย้ายปลูกลงดินในกระถางพลาสติกของต้นขมิ้นชัน
(ก) ต้นกล้าขมิ้นชันที่สมบูรณ์พร้อมปลูก (ข) การอนุบาลต้นขมิ้นชันในถุงพลาสติกใส (ค)–(ง) ต้นขมิ้นชันหลังการย้ายปลูกลงดินในกระถางพลาสติก นาน 1 เดือน (บาร์= 2.0 เซนติเมตร)

ให้การสร้างราก เมื่อนำต้นกล้าขมิ้นชันอนุบาลในถาดหลุมเพาะชำพลาสติกสีดำ บรรจุดินปลูกผสมเสร็จเป็นวัสดุปลูก ซึ่งหาซื้อได้ตามท้องตลาด เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า มีอัตรารอดชีวิต 86.90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกสีดำ ที่บรรจุดินปลูกผสมเสร็จ ดินร่วน ขุยมะพร้าว และปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2 ต่อ 1 ต่อ 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า มีอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูก 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ของ Goyal และคณะ (2010) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของขมิ้นชันลงในบีกเกอร์ที่บรรจุ ดินสวนและทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อัตราส่วน 1 ต่อ 1 วางเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 93 เปอร์เซ็นต์ Ghosh และคณะ (2013) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของขมิ้นชันลงในกระถางที่บรรจุ ดินและเวอมิคูไลท์ อัตราส่วน 2 ต่อ 1 นาน 30 วัน จากนั้นย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วางเลี้ยงเรือนกระจก มีอัตรารอดชีวิต 86 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองจะเห็นได้วัสดุปลูกที่ใช้จะหาซื้อได้ตามท้องตลาด ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ วางเลี้ยงในสภาพที่ให้ร่มเงา ไม่จำเป็นต้องวางเลี้ยงในเรือนกระจกหรือสภาพที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ ก็สามารถมีอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูกลงดินที่สูง แสดงว่า ขมิ้นชันเป็นพืชที่มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี

สรุป

จากการศึกษาการชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชัน พบว่า อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดมากที่สุด 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน การเพิ่มปริมาณจากยอดเดี่ยวที่ชักนำในหลอดทดลอง พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดมากที่สุด 4.17 ยอดต่อยอดที่เพาะเลี้ยง อาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างรากได้ดีที่สุด 19.74 รากต่อยอด และเมื่อย้ายต้นกล้าขมิ้นชันที่สมบูรณ์ลงปลูกในดิน เป็นเวลา 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 86.90 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3

ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชัน

บทนำ

ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรหนึ่งขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่ทรงคุณค่าคู่กับวิถีชีวิตของคนไทยมาช้านาน ตั้งแต่สมัยโบราณจนถึงปัจจุบัน ใช้บำบัดรักษาอาการโรคต่างๆ นำมาใช้ปรุงแต่งสีสันและเพิ่มรสชาติอาหารให้น่ารับประทาน และมีคุณค่าทางโภชนาการ เรียกได้ว่า “เป็นทั้งยาและอาหาร” (พันธิตร์, 2545) การขยายพันธุ์ใช้ส่วนของเหง้าและหัว ซึ่งการเก็บเกี่ยวแต่ละครั้ง 1 ต้น จะมีเพียง 1 หัวเท่านั้น (นิรนาม, 2557) แต่การขยายพันธุ์แบบเดิมเพิ่มเหง้าพันธุ์ได้ปริมาณน้อย จึงนำเอาเทคนิคการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ เพราะสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดโรคได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (สมปอง, 2539) เทคนิคดังกล่าว สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงได้โดยตรงหรือพัฒนามาจากแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยง การชักนำแคลลัสควรคำนึงถึงชนิดของพืช ชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืช ปกติแล้วสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินที่สมดุล จะส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัส (รังสฤษดิ์, 2541) มีการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ ในพืชในวงศ์ Zingiberaceae (Zhang *et al*., 2011; Raju *et al*., 2013; Kar *et al*., 2014) มากมาย แต่ขมิ้นชันมีรายงานการศึกษาน้อยจึงสนใจทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสของขมิ้นชัน เพื่อผลิตต้นพันธุ์ขมิ้นชันให้มากขึ้นในระยะเวลาที่สั้นลง

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

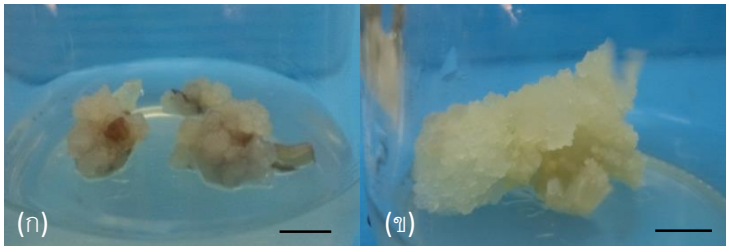
นำชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันที่เกิดยอดจากการทดลองที่ 2 ตัดเป็นยอดเดี่ยว วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เติม TDZ เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณยอด

ผลของชนิดและความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง

นำส่วนกาบใบที่แยกจากหน่อในหลอดทดลองของขมิ้นชัน อายุ 6 สัปดาห์ ตัดแต่งให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เติม 2, 4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 15.0 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการสร้างแคลลัส จากนั้นย้ายเลี้ยงลงอาหารสูตรเดิม หลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัส ปริมาณแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 9 ชิ้นส่วน

ผลและวิจารณ์

จากการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบ พบว่า อาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.6 และภาพที่ 2.4 (ก)) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สกุลรัตน์ (2553) พบว่า อาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดปมของแคลลัสในปาล์มน้ำมันได้สูงสุดเฉลี่ย 32.99 ปมต่อแคลลัส Jiang และคณะ (2010) พบว่า เอ็มบริโอที่แก่เต็มที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร third-stage larvae (L3) ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสของข้าวสาลีสายพันธุ์ Yumai 34 ได้สูงสุด 82.21 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณแคลลัสมากที่สุด เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.4 (ข)) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kar และคณะ (2014) พบว่า ชิ้นส่วนยอดของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือ เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สามารถชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสได้สูง 70.91 - 80.30 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักสดแคลลัส 44.5 - 48.3 มิลลิกรัมต่อชิ้นส่วน ซึ่งการชักนำให้เกิดแคลลัสนิยมใช้สูตรอาหาร MS แต่มีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืชที่ใช้เลี้ยง (รังสฤษดิ์, 2541) ปกติแล้วหากสัดส่วนของออกซินสมดุลกับไซโตไคนินจะส่งเสริมให้เซลล์บริเวณตัดของชิ้นส่วนพืชเกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส (สมปอง, 2539) จะเห็นได้ว่าในพืชบางชนิดเติมออกซินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากพืชชนิดนั้นมีปริมาณของไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสอยู่แล้ว แต่พืชบางชนิดต้องใช้ทั้งออกซินและไซโตไคนินเพื่อส่งเสริมการเกิดและเพิ่มปริมาณแคลลัส



ภาพที่ 2.4 การชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสของขมิ้นชัน
(ก) ชิ้นส่วนกาบใบบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์
(ข) ชิ้นส่วนกาบใบบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

ตาราง 2.6 ผลของ 2,4-D หรือ dicamba เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ BA ต่ออัตราการชักนำแคลลัส (%) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และการเพิ่มปริมาณแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)			การชักนำแคลลัส (%)	ปริมาณแคลลัส	ลักษณะของ
2,4-D	Dicamba	BA	8 สัปดาห์	4 สัปดาห์	แคลลัส
0.00	0.00	0.00	0.00^{i}	-	-
0.10	0.00	0.00	50.00^{abcd}	+++++	WC
0.25	0.00	0.00	55.56^{abc}	+++	WYC
0.50	0.00	0.00	8.33^{ghi}	+	WF
1.00	0.00	0.00	8.33^{ghi}	+	WF
0.00	0.10	0.00	11.11^{ghi}	++	WF
0.00	0.25	0.00	2.78^{i}	++	WC
0.00	0.50	0.00	33.33^{def}	+++	WC
0.00	1.00	0.00	66.67^{a}	+++	WC
0.10	0.00	0.10	25.00^{efg}	++++	WF, YGC
0.10	0.00	0.50	61.11^{ab}	++++	WF, YGC
0.25	0.00	0.10	44.44^{bcd}	++	WF, WYC
0.25	0.00	0.50	38.89^{cde}	++	WFC
0.50	0.00	0.10	16.67^{fghi}	++	WF
0.50	0.00	0.50	22.22efgh	+	WYF
1.00	0.00	0.10	8.33^{ghi}	+	WYF
1.00	0.00	0.50	2.70^{8i}	+	WF
0.00	0.10	0.10	0.00^{i}	-	-
0.00	0.10	0.50	5.56^{hi}	+	WF
0.00	0.25	0.10	11.11ghi	++	WC
0.00	0.25	0.50	5.56^{hi}	++++	WF, WYGC
0.00	0.50	0.10	8.33^{ghi}	++	WC
0.00	0.50	0.50	8.33^{ghi}	++	WC
0.00	1.00	0.10	8.33^{ghi}	+	WF
0.00	1.00	0.50	22.22^{efgh}	+	WF
F-test			**		
C.V. (%)			54.90		

+++++ปริมาณมากที่สุด ++++ปริมาณมาก ++ปริมาณปานกลาง ++ปริมาณน้อย +ปริมาณน้อยที่สุด -ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง WF ลักษณะสีขาวเกาะกันหลวม ๆ WYC ลักษณะสีขาว-เหลืองเกาะกันแน่น WC ลักษณะสีขาวเกาะกันแน่น WFC ลักษณะสีขาวเกาะกันแน่นและเกาะกันหลวม ๆ YGC ลักษณะสีเหลือง-เขียวเกาะกันแน่น WYF ลักษณะสีขาว-เหลืองเกาะกันหลวม ๆ WYGC ลักษณะสีขาว-เหลือง-เขียวเกาะกันแน่น

**แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

สรุป

การศึกษาการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบที่แยกจากหน่อในหลอดทดลองของขมิ้นชัน อายุ 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

การทดลองที่ 4

ผลของชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของขมิ้นชันและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

บทนำ

ขมิ้นชันเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับความนิยม นำมาเป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์สมุนไพร เครื่องสำอางค์ และผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับสปา (นิรนาม, 2257) ปัจจุบันนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช และนำเอาเทคนิคดังกล่าวมาใช้ศึกษากับพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิด เช่น *C. aromatic* *C. amada* Roxb. *B. rotunda* L. *K. parviflora* เป็นต้น (Mohanty *et al.,* 2008; Yusuf *et al.,* 2011; Raju *et al.,* 2013; Zuraida *et al.,* 2014) และมีรายงานการศึกษาการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของขมิ้นชัน *C. amada* Roxb. และ *C. caesia* (Raju *et al.,* 2013; Zurida *et al.,* 2014; He and Gang, 2014; Kar *et al.,* 2014) เนื่องจากการศึกษาการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยการผ่านชิ้นส่วนแคลลัสในขมิ้นชัน มีการศึกษาน้อยและในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษา จึงสนใจศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ จากชิ้นส่วนแคลลัสของขมิ้นชันที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนหน่องอกบนสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากการทดลองที่ 2) มาเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม Dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ จนครบอายุ 12 สัปดาห์

1. ศึกษาการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนแคลลัส

ย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม Dicamba เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 0.1 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 - 25 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียว หรือ ร่วมกัน เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 15.0 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนจุดเขียว อัตราการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ จำนวนยอดและจำนวนราก วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวด

2. ศึกษาการเกิดเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ

ย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้างต้น บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือ ร่วมกัน เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง

15.0 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนต้นพืชที่สมบูรณ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 2 ขวด

ผลและวิจารณ์

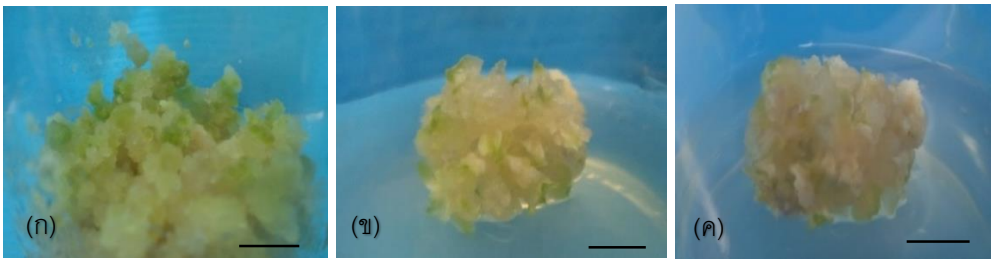
จากการศึกษา พบว่า แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา12 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดจุดสีเขียวมากที่สุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสบนสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 33.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.7 และภาพที่ 2.5 (ก)) และมีจำนวน โซมาติกเอ็มบริโอ 2.67 เอ็มบริโอ แต่เมื่อย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งเสริมให้เกิดยอดได้สูงที่สุด 4.83 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 2.7 และภาพที่ 2.5 (ข)-(ค)) ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และเมื่อนำมาย้ายเลี้ยงเพื่อชักนำให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้เฉลี่ยสูงที่สุด 0.67 ต้น แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2.8 และภาพที่ 2.6) แสดงว่า การเติมไซโตไคนินลงในอาหารเพียงอย่างเดียวแคลลัสของขมิ้นชันไม่สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ แต่เมื่อเติมไซโตไคนินร่วมกับออกซิน สามารถส่งเสริมให้แคลลัสของขมิ้นชันเกิดยอดที่จะพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชได้ เนื่องจากไซโตไคนินมีความเข้มข้นสูงบางครั้งการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอจะเกิดเพียงยอดไม่มีการสร้างรากเพราะไม่มีความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต (สมปอง, 2539) สำหรับน้ำมะพร้าว พบว่า การเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารที่วางเลี้ยง สามารถส่งเสริมให้เกิดจุดเขียว 41.67 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ แสดงว่า น้ำมะพร้าวมีปริมาณ ไซโตไคนินกับออกซินในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้ชิ้นส่วนแคลลัสของขมิ้นชันเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมะพร้าวในอาหารที่วางเลี้ยงเพิ่มขึ้น 20 - 25 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการสร้างจุดเขียว จะเห็นได้ว่าเมื่อเติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวลงในอาหารที่วางเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของขมิ้นชัน สามารถแค่ชักนำให้เกิดจุดเขียว แต่เมื่อเติมออกซินร่วมกับไซโตไคนิน แคลลัสของขมิ้นชันสามารถชักนำให้เกิดยอดที่เจริญพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ แสดงว่าขมิ้นชันเป็นพืชที่ต้องการทั้งออกซินและ ไซโตไคนินในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนามาจากแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับ Zuriada และคณะ (2014) พบว่า หลังการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *C. caesia* บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิด โซมาติกเอ็มบริโอ 53 ± 4.5 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นพืช 15 ± 2.6 ต้น นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอายุและลักษณะของแคลลัส (สมปอง, 2539) ที่นำมาศึกษาด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 2.7 ผลของ dicamba 2,4-D NAA BA และ น้ำมะพร้าว เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)					จุดเขียว (%)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน	จำนวนรากต่อชิ้นส่วน
dicamba	2,4-D	NAA	BA	CW (%)					
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	8.33	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.17^{d}
0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	16.67	33.33	2.67^{a}	3.00^{b}	3.00^{b}
0.00	0.10	0.00	0.25	0.00	16.67	8.33	0.17^{c}	0.17^{e}	0.67^{cd}
0.00	0.0	0.00	0.50	0.00	16.67	8.33	0.17^{c}	1.00^{d}	0.17^{d}
0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.17^{d}
0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.00	0.10	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	1.17^{c}
0.00	0.00	0.10	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.50^{de}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.10	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.10	0.00	0.10	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.10	0.10	0.10	0.00	33.33	16.67	0.50^{b}	2.17^{c}	2.17^{b}
0.00	0.10	0.10	0.25	0.00	16.67	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	8.67^{a}
0.00	0.10	0.10	0.50	0.00	8.33	0.00	0.00^{c}	4.83^{a}	2.50^{b}
0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	83.33	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	16.67	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	8.33	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.00	0.00	0.00	15.00	41.67	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.17^{d}
0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
0.00	0.00	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	0.00^{c}	0.00^{e}	0.00^{d}
F-test							**	**	**
C.V.(%)							93.89	141.42	74.30

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

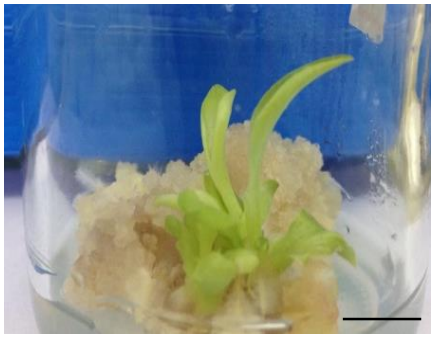


ภาพที่ 2.5 การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสของขมิ้นชัน
(ก) แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 12 สัปดาห์
(ข) - (ค) แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 0.1 มก/ล NAA เข้มข้น 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มก/ล เป็นเวลา 9 และ 12 สัปดาห์

ตารางที่ 2.8 ผลของ 2,4-D NAA และ BA เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ เป็นเวลา 9 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)			จำนวนต้นพืช
2,4-D	NAA	BA	
0.1	0	0.1	0.67[a]
0.1	0	0.25	0.00[b]
0.1	0	0.5	0.00[b]
0.1	0.1	0.1	0.00[b]
F-test			*
C.V. (%)			173.21

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.05$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.6 การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นพืชต้นใหม่บนอาหาร สูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นเวลา 9 สัปดาห์ (บาร์= 1.0 เซนติเมตร)

สรุป

แคลลัสของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดจุดสีเขียวมากที่สุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสบนสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ และเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 2.67 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และแคลลัสของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดยอดได้สูงที่สุด 4.83 ยอดต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ สามารถพัฒนายอดที่เกิดจากแคลลัสให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้เฉลี่ยสูงที่สุด 0.67 ต้น

บทที่ 3

สรุป

สรุป

เทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ โดยการให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูง 68.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด

การชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนหน่องอกของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดมากที่สุด 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน การเพิ่มปริมาณจากยอดเดี่ยวของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดมากที่สุด 4.17 ยอดต่อยอดที่เพาะเลี้ยง และอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างรากได้ดีที่สุด 19.74 รากต่อยอด และเมื่อย้ายต้นกล้าขมิ้นชันที่สมบูรณ์ลงปลูกในดิน เป็นเวลา 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 86.90 เปอร์เซ็นต์

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากที่สุด

การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจุดสีเขียวมากที่สุด 83.33 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4 -D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งเสริมให้เกิดยอดได้สูงที่สุด 4.83 ยอดต่อชิ้นส่วน และเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2556. องค์ความรู้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิต สู่การเป็น smart office สมุนไพรและเครื่องเทศ: เทคนิคการปลูกและการดูแลรักษาขมิ้นชัน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กอ สะแกกรัง. 2546. สารสกัดจากพืชสมุนไพรกลั่นป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูพืช. วารสารเกษตรธรรมชาติ 7: 30-44.

งามผ่อง คงคาทิพย์, ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช, ศิริรักษ์ จันทครุ, ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, ยุพา มงคลสุข สุริยัน สุทธิประภา, ภรภัทร สำอาง และบุญส่ง คงคาทิพย์. 2549. การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันและย่านพาโหมต่อต้านเชื้อไข้หวัดนก. รายงานการวิจัย. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัศนี เรืองหิรัญ และพนารัตน์ เสรีทวีกุล. 2544. นานาภูมิปัญญากับน้ำสกัดชีวภาพ. หนังสือพิมพ์กสิกร 74: 14-23.

นลินี จาริกภากร. 2545. ขมิ้น. วารสารสมุนไพรเพื่อสุขภาพ 16: 77-78.

นิรนาม. 2557. ขมิ้นชันพืชน้ำมันหอมระเหยที่มีศักยภาพของไทย. เข้าถึงได้จาก: http://www. .yesspathailand.com/สมุนไพรกลิ่นหอมของไทย/พืชน้ำมันหอมระเหย-ขมิ้นชัน.html (เข้าถึงเมื่อวันที่ 28 มกราคม 2557).

บุญหงษ์ จงคิด, ปัทมา ตาไล และทิพวรรณ หอมไม่วาย. 2552. การปรับปรุงพันธุ์ขมิ้นชันเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 17: 96-107.

บุญหงษ์ จงคิด. 2553. สายพันธุ์ขมิ้นชันที่ให้ผลผลิตสูง TU 04-9-1. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 18: 24-37.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2551. บทปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: บริษัท เอเจนเทค จำกัด.

พันธิตร์ มะลิสุวรรณ. 2545. ขมิ้นยอดสมุนไพรไทยบำบัดโรค. วารสารสมุนไพรเพื่อสุขภาพ 16: 67-76.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาสินี กวีกิจธรรมกุล, ยุพา มงคลสุข วราลักษณ์ รักษ์แดง, พนิดา วงษ์แหวน และเจษฎา วงศ์พรหม. 2557. การชักนำให้เกิดแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของบุกเนื้อทราย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร กีรตินิจกาล. 2548. พบขมิ้นชัน “แดงสยาม” ผลผลิตและสารเคอร์คูมินสูง มีสารออกฤทธิ์ป้องกันมะเร็ง. เข้าถึงได้จาก: http://.www. ku.ac.th/kunews/kamin.html (เข้าถึงเมื่อวันที่ 28 มกราคม 2557).

วันทนี เจตธรรมจักร. 2546. มหัศจรรย์ดอกไม้และสมุนไพรไทย. วารสารเกษตรธรรมชาติ 7: 10-17.

ศุภารัตน์ สุทธิมุสิก, ยุพิน พิมโคตร์ และสาวิตรี อินทรพันธ์. 2549. การศึกษาผลของสารสกัดขอขมิ้นชันต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการท้องเสียในสุกรและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงค์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทอเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2539. เอกสารประกอบการสอนเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุจิตรา เพรชคง สุรางค์ สัมโนจิตราภรณ์ และ ชมพูนุช มรรคทรัพย์. 2557. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและผลสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้น้ำใบพาย คริปอัลบิด้า. เข้าถึงได้จาก: http://agkb.lib.ku.ac.th/main/search_detail/result/287302 (เข้าถึงเมื่อวันที่ 28 มกราคม 2557).

องอาจ หาญชาญเลิศ ฉลองชัย แบบประเสริฐ และยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา. 2541. เอกสารเผยแพร่โครงการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ (การศึกษาการเจริญเติบโตและผลผลิตของขมิ้นชัน). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Araujo, C. and Leon, L. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 96: 723-728.

Bejoy, M., Dan, M. and Anish, N. P. 2006. Facters affecting the *in vitro* multiplication of the endomic zingiber *Curcuma haritha* Mangaly and Saba. Asian Journal of Plant Sciences 5: 847-853.

Bhattacharya, M. and Sen, A. 2013. *In vitro* regeneration of pathogen free *Kamepferia galangal* L. -a rare medicinal plant. Research in Plant Biology 3: 24-30.

Buddharakra, P. and U-Kong, W. 2011. Conservation and propagation *Taminadia uliginosa* Retz. and *Sauropus androgynous* (L.) Merr. by technique of *in vitro* culture. Naresuan University Journal 19: 14-16.

Cikrikci, S., Mozioglu, E. and Yilmaz, H. 2008. Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcumar longa*. Reccord of Natural Products 2: 19-24.

Dey, M., Bakshi, S., Galiba, G., Sahoo, L. and Panda, S. K. 2012. Development of a genotype independent and transformation amenable regeneration system from shoot apex in rice (*Oryza sativa spp.* indica) using TDZ. Biotechnology 2: 233-240.

Ghosh, A., Chattrajee, P. and Ghosh, P. 2013. A protocol for rapid propagation of genetically *true to type* Indian turmeric (*Curcuma longa* L.) through *in vitro* culture technique. Advances in Applied Science Research 4: 39-45.

Goyal, A. K., Ganguly, K., Mishra, T. and Sen, A. 2010. *In vitro* multiplication of *Curcuma longa* Linn. an important medicinal zingiber. NBU Journal of Plant Sciences 4: 21-24.

He, R. and Gang, D. R. 2014. Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of turmeric (*Curcumar longa*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 116: 333-342.

Jala, A. 2012. Effects of NAA and sucrose on shoot induction and rapid micropropagation by trimming shoot of *Curcuma longa* L. Thammasat International Journal of Science and Technology 4: 54-60.

Jiang, P. R., Xin, G. W. and Jun, Y. 2010. Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature culture of wheat. Agricultural Sciences in China 9: 31-37.

Kar, B., Kuanar, A., Singh, S., Mohanty, S., Joshi, R. K., Subudhi, E. and Nayak, S. 2014. *In vitro* induction, screening and detection of high essential oil yielding somaclones in turmeric (*Curcuma longa* Linn.). Journal of Plant Growth Regulation 72: 56-66.

Mohanty, S., Panda, M. K., Subudhi, E. and Nayak, S. 2008. Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. Biologia Plantarum 52: 783-786.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 45-47.

Nasri, F., Mortazavi, S. N., Ghaderi, N. and Javadi, T. 2013. Propagation *in vitro* of *Alstroemeria ligtu* hybrid through direct organogenesis from leaf base. Journal of Horticultural Research 21: 23-30.

Prucksunand, C., Indrasukhsri, B., Leethochawalit, M. and Hongspreugs, K. 2001. Phase II clinical trial on effect of the long turmeric (*Curcumar longa* Linn.) on headling of peptic ulcer. Southeast Asian Journal of Thailand Medicine and Public Health 32: 208-215.

Raju, C. S., Kathiravan, K., Aslam, A. and Shajahan, A. 2013. An efficient regeneration system *via* somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 112: 387-393.

Rajamma, A. G., Bai, V. and Nambisan, B. 2012. Antioxidant ant antibacterial activities of oleoresins isolated from nine *Curcuma* species. Phytopharmacology 2: 312-317.

Sangousa, P. and Punnipa, S. 2011. Effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. on cellular morphology and viability of *Helicobacter pylori*. Burrapha Science Journal 16: 75-82.

Singh, R., Chandra, R., Bose, M. and Luthra, P. M. 2002. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. Current Science 83: 737-740.

Shaqufta, N., Saiga, I., Sumera, J. and Aamir, A. 2009. *In vitro* clonal multiplication and acclimatization of different varieties of Turmeric (*Curcuma longa* L.) . Pakistan Journal of Botany 4: 2807-2816.

Shrama, S. K., Shrama, M. and Raina, V. 2013. *In vitro* protocol standardization for turmeric in Jammu division. Journal of Biotechnology Research Center 8: 55-57.

Shukla, S. K., Susmita, S., Vijaya, K. and Mishra, S. K. 2007. *In vitro* propagation of tikhur (*Curcuma angustifolia* Roxb.): A starch yielding plant. Indian Journal of Biotechnology 6: 274-276.

Subramoniam, A., Madhavachandran, V. and Gangaprasad, A. 2013. Medicinal plants is the treatment of arthritis. Annals of Phytomedicine an International Journal 2: 3-36.

Thamlikikul, V., Bunyaprophara, N. and T. Dechatiwongse. 1989. Randomized double-blind study of *Curcuma domestica* Val. For dyspepsia. Journal of the Medical Association of Thailand 72: 613 – 620.

Theanphong, O., Thanapat, S. and Chalermpol, K. 2010. Effect of plant growth regulators on micropropagation of *Curcuma aerginosa* Roxb. Thai Journal of Botany 2 (Special Issue): 135-142.

Yusuf, N. A., Annur, M. M. S. and Khalid, N. 2011 Rapid micropropagation *of Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturfl. (a valuable medicinal plant) from shoot bud explants. African Journal of Biotechnology 10: 1194-1199.

Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G. and Wu, G. 2011. *In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma kwangsiensis* Lindl. (Zingiberaceae). Plant Growth Regulation 64: 141-145.

Zuraida, A. R., Izzati, K. F. L., Nazreena, O. A., Radziah, C. M. Z. C., Asyikin, S. G. S. N. and Sreermanan, S. 2014. *In vitro* Regeneration of *Curcuma caesia* plantlets from basal part and *via* somatic embryogenesis. Advances in Bioscience and Biotechnology 5: 363-372.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS

องค์ประกอบ	**ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
KH_2PO_4	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.830
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.H_2O$	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.800
Na_2EDTA	37.300
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine HCl	0.500
ThaiamineHCl	0.100
Glycine	2.000
Sucrose (g)	30.000
Agar (g)	7.500
pH 5.7	pH 5.7

ผลงานตีพิมพ์

การทำให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ และการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบ ของขมิ้นชันในหลอดทดลอง

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (เมษายน-มิถุนายน): 36-40, 2558
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 2, No. 2 (April-June): 36-40, 2015

Research article

การทำให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ และการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง

Sterile Methods and Callus Induction from Leaf Sheath of *Curcuma longa* Linn. *In Vitro*

ปริญา สุคนธรัตน์[1], ทัศนี ชาวเนียม[1] และ สมปอง เตชะโต[1*]
Sukontharat, P.[1], Khawniam, T.[1] and Te-chato, S.[1*]

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
[1] Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

*Corresponding author: stechato@yahoo.com
Received 16 November 2014; Revised 17 February 2015; Accepted 24 February 2015

บทคัดย่อ

การศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ พบว่า การให้น้ำไหลผ่าน 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูง 68.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่า การเพาะเลี้ยงกาบใบบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงอาหารสูตรเดิม พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการย้ายเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์
คำสำคัญ: เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อ ขมิ้นชัน กาบใบ การชักนำแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัส

Abstract

The sterile techniques of explants of *Curcuma longa* Linn. on the sterile culture was investigated. The results showed that running with tap water for 20 min immersing in 70% alcohol for 1 min, soaking in 20% Clorox with a few drops for Tween 20 for 20 min, washing with distilled water for 5 min, soaking in 10% Clorox with a few drops Tween 20 for 10 min followed by 5 min washing with distilled water for 3 times gave the high percentage of sterile explant (68.5%). For induction and proliferation, leaf sheath cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/L dicamba for 8 weeks gave the highest callus induction (66.67%). In addition, callus cultured on medium with 0.1 mg/L 2, 4-D for 4 weeks gave the best result of callus proliferation.
Keywords: Sterile techniques, *Curcuma longa* Linn., leaf sheath, callus induction, callus proliferation

บทนำ

ขมิ้นชัน จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae **เป็นพืชสมุนไพร ที่มีการใช้ประโยชน์ทั้งอาหาร และยา สำหรับมนุษย์ และสัตว์ (วันทนี, 2546; งามผ่อง และคณะ, 2549; ศุภารัตน์ และคณะ , 2549; Sangousa and Punnipa, 2011; Rajamma *et al*, 2012 และ Subramoniam *et al*., 2013) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. ชื่อสามัญว่า curcuma turmeric yellow root เป็นพืชมีอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดินสีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นเฉพาะ ซึ่งสารเคมีสำคัญที่พบ คือ น้ำมันหอมระเหย ประมาณ 2-6 เปอร์เซ็นต์ และสารที่ให้สี curcumene curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin สายพันธุ์ขมิ้นชันที่นิยมปลูกในภาคใต้ เช่น ตาขุน (สุราษฎร์ธานี) ขมิ้นดัวง (นครศรีธรรมราช) พันธุ์ตรัง 1 และพันธุ์ตรัง 2**

Online open access e-journal : www.nares.psu.ac.th/department/plantScience/sjps/default.htm
Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nrsjps@group.psu.ac.th

(กรมวิชาการเกษตร, 2554) ซึ่งมีปริมาณ curcumin ค่อนข้างสูง แต่การขยายพันธุ์แบบเดิมเพิ่มเหง้าพันธุ์ได้ปริมาณน้อย เพราะในการเก็บเกี่ยวแต่ละครั้ง 1 ต้น จะมีเพียง 1 หัวเท่านั้น (กองบรรณาธิการ, 2557) จึงนำเอาเทคนิคการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อพืชมาใช้ เพราะสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดโรคได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (สมปอง, 2539) ขมิ้นชันเป็นพืชที่มีเหง้าใต้ดินการทำให้ปลอดเชื้อทำได้ค่อนข้างยาก มีรายงานการใช้สารละลายคลอรอกซ์ (Sodium Hypochlorite as available Chlorine 6% w/w) และ mercuric chloride ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (Anchalee, 2012; Buddharaksa and U-kong, 2011; Goyal *et al.*, 2010; Theanphong *et al*., 2010 และ Zhang *et al*., 2011) และมีการศึกษาการขยายพันธุ์ขมิ้นชันในหลอดทดลองมากมาย (Shagufta *et al*., 2009; Goyal *et al.*, 2010; Anchalee, 2012 และ Sharma *et al.*, 2013 แต่จำนวนต้นที่ได้ยังมีปริมาณน้อย นอกจากนี้มีการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ในพืชในวงศ์ Zingiberaceae (Zhang *et al*., 2011; Raju *et al*., 2013 และ Kar *et al*., 2014) ดังนั้นในการศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ และผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส เพื่อผลิตต้นพันธุ์ขมิ้นชันจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ

นำเหง้าขมิ้นชันชิ้นส่วนแง่งที่ 1 และแง่งที่ 2 (sprouted rhizome) อายุประมาณ 8-12 เดือน ที่ยังอ่อนอยู่มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ ที่แตกต่างกัน 4 วิธี ดังนี้คือ

หลังการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นส่วนมาตัดแต่งให้มีขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5.7

วิธีที่	วิธีการ
1	ผ่านน้ำไหล เป็นเวลา 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตาม ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (NaOCl 1.8 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2	ผ่านน้ำไหล เป็นเวลา 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา ตามด้วย สารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (NaOCl 1.2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (NaOCl 0.6 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
3	ผ่านน้ำไหล เป็นเวลา 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที สารละลาย mercuric chloride เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
4	ผ่านน้ำไหล เป็นเวลา 15 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที สารละลาย hydrogen peroxide เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 19.85 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อของชิ้นส่วนพืช เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ในแต่ละวิธีการฟอกฆ่าเชื้อทำ 5 ซ้ำๆ ละ 40 ชิ้นส่วน

การทดลองที่ 2 ศึกษาการชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำส่วนกาบใบที่แยกจากหน่อในหลอดทดลอง อายุ 6 สัปดาห์ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม 2, 4-D หรือ dicamba เข้มข้น 0.1–1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ benzyladenine (BA) เข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่า pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 17.97 ไมโครโมลาร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการสร้างแคลลัส จากนั้นย้ายเลี้ยงลงอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และสีของแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 9 ชิ้นส่วน

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน พบว่า วิธีการที่ใช้สารละลาย mercuric chloride เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูงสุด

73.5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่เมื่อวางเลี้ยงไประยะหนึ่ง พบว่า ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่การใช้สารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อรองลงมา 68.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชิ้นส่วนพืชยังเป็นสีเหลืองอมส้มและเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียว เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน โดยปกติแล้วลักษณะเหง้าของขมิ้นชันที่มีข้อถี่ และเจริญอยู่ใต้ดิน การทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อจึงทำได้ยาก ซึ่งการใช้ mercuric chloride ที่ใช้เข้มข้นสูง เป็นเวลา 15 นาที สามารถทำลายเซลล์บริเวณที่สัมผัส ส่งผลให้เซลล์บริเวณนั้นตาย ซึ่งปกติความเข้มข้นของสารละลาย mercuric chloride ใช้อยู่ที่ประมาณ 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที (Goyal *et al.*, 2010; Theanphong *et al.*, 2010 และ Zhang *et al.*, 2011) สำหรับวิธีการใช้สารละลายครอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ร่วมกับ Tween 20 ตามด้วยสารละลายครอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Buddharaksa และU-kong (2011) ที่ใช้วิธีการข้างต้น ทำให้ชิ้นส่วนยอดผักหวานปลอด 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากลักษณะข้อของขมิ้นชันนั้นเจริญอยู่ใต้ดินและมีจำนวนข้อถี่ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ร่วมกับ Tween 20 ความเข้มข้นสูงเพียงครั้งเดียว ทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อได้น้อยกว่า การใช้สารละลายคลอรอกซ์ร่วมกับ Tween 20 ความเข้มข้นที่น้อยลง และฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เนื่องจากเวลาที่ใช้ฟอกน้อยเกินไปทำให้เชื้อจุลินทรีย์ยังคงปนเปื้อนอยู่ และความเข้มข้นที่สูงจะทำลายเซลล์บริเวณที่สัมผัส ส่งผลให้เซลล์บริเวณนั้นตาย

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบที่แยกจากหน่อในหลอดทดลองของขมิ้นชัน อายุ 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนกาบใบเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kilinc (2004) พบว่า เมล็ดข้าวสาลีที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้สูงสุด 63.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณแคลลัสมากที่สุด เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการย้ายเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิลาสินี และคณะ (2557) พบว่า friable callus ของบุกเนื้อทรายสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชบางชนิดใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากพืชชนิดนั้นมีปริมาณของไซโตไคนินที่เหมาะสมอยู่แล้ว แต่พืชบางชนิดต้องใช้ทั้งออกซินและไซโตไคนินเพื่อส่งเสริมการเกิดและเพิ่มปริมาณแคลลัส

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนขมิ้นชันปลอดเชื้อ พบว่า การผ่านน้ำไหล เป็นเวลา 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยง จากนั้นจุ่มด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อได้สูง 68.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบที่แยกจากหน่อในหลอดทดลองของขมิ้นชัน พบว่า อาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์และแคลลัสเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MSเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการย้ายเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

Table 1 Effect of sterile techniques of explants on sterile explants (%) of *Curcuma longa* Linn after culture for 1 week.

Method	% of sterile explants
Sterile method 1	44.0 c
Sterile method 2	68.5 ab
Sterile method 3	73.5 a
Sterile method 4	35.5 d
F-test	**
C.V.(%)	12.8

** Different letters within the column indicate significant differences according to the DMRT ($P \leq 0.01$)

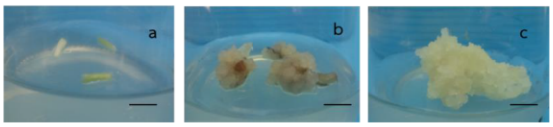


Figure 1 Callus induction and proliferation
(a) leaf sheath were culture on media for 1 day
(b) leaf sheath were culture on MS medium supplemented with 1.0 mg/l dicamba for 8 weeks
(c) leaf sheath were culture on MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D for 12 weeks. (bar 5 mm.)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2554. ขมิ้นชัน: ขั้นตอนในการปฏิบัติในการผลิตขมิ้นชัน. เข้าถึงได้จาก: http://www.kstation.tv [เข้าถึงเมื่อ 28 มกราคม 2557].

กองบรรณาธิการ. 2557. ขมิ้นชันพืชน้ำมันหอมระเหยที่มีศักภาพของไทย. เข้าถึงได้จาก: http://www.yesspathiland.com [เข้าถึงเมื่อ 28 มกราคม 2557].

งามผ่อง คงคาทิพย์ ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช ศิริรักษ์ จันทครุ ทวีศักดิ์ ส่งเสริม ยุพา มงคลสุข สุริยัน สุทธิประภา ภรภัทร สำอาง และบุญส่ง คงคาทิพย์. 2549. การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันและย่านพาโหมต่อต้านเชื้อไข้หวัดนก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาสินี กวีกิจธรรมกุล ยุพา มงคลสุข วราลักษณ์ รักษ์แดง พนิดา วงษ์แหวน และเจษฎา วงค์พรหม. 2557. การชักนำให้เกิดแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของบุกเนื้อทราย. เข้าถึงได้จาก: http://www.kukr.lib.ku.ac.th [เข้าถึงเมื่อ 15 มีนาคม 2557].

วันทนี เจตธรรมจักร. 2546. มหัศจรรย์ดอกไม้และสมุนไพรไทย. วารสารเกษตรธรรมชาติ 7: 10-17.

Table 2 Effect of 2, 4-D or dicamba alone and combination with BA on the callus induction (%) for 8 weeks and callus proliferation for 4 weeks.

Plant growth regulator (mg/l)			% callus induction[1]	Proliferation of callus[2]	Nature of callus
2,4-D	Dicamba	BA			
0.1	-	-	59.26abc	+++++	White Compact
0.25	-	-	59.26abc	+++	Yellow-white Compact
0.5	-	-	11.11fghi	+	White Friable
1.0	-	-	11.11fghi	+	White Friable
-	0.1	-	11.11fghi	++	White Friable
-	0.25	-	3.703hi	++	White Compact
-	0.5	-	37.04de	+++	White Compact
-	1.0	-	70.37a	+++	White Compact
0.1	-	0.1	29.63def	++++	White Friable Yellow-green Compact
0.1	-	0.5	66.67ab	++++	White Friable Yellow-green Compact
0.25	-	0.1	48.15bcd	++	White Friable White-yellow Compact
0.25	-	0.5	40.74cde	++	White Friable- Compact
0.5	-	0.1	22.22efgh	++	White Friable
0.5	-	0.5	25.93efg	+	White-yellow Friable
1.0	-	0.1	11.11fghi	+	White-yellow Friable
1.0	-	0.5	3.703hi	+	White Friable
-	0.1	0.1	0i	-	-
-	0.1	0.5	7.407ghi	+	White Friable
-	0.25	0.1	14.81fghi	+	White Compact
-	0.25	0.5	7.407ghi	+++	White Friable White-yellow-green Compact
-	0.5	0.1	11.11fghi	+	White Compact
-	0.5	0.5	11.11fghi	+	White Compact
-	1.0	0.1	11.11fghi	+	White Friable
-	1.0	0.5	25.92efg	+	White Friable
-	-	-	0i	-	-
F-test			**		
C.V. (%)			41.06		

+++++ maximum ++++ much +++ average ++ few + fewest

[1] Callus induction after for 8 weeks

[2] Proliferation of callus for 4 weeks

**Different letters within the column indicate significant differences according to the DMRT ($P \leq 0.01$) following ANOVA

ศุภารัตน์ สุทธิมุสิก ยุพิน พิมโคตร์ และสาวิตรี อินทรพันธ์. 2549. การศึกษาผลของสารสกัดของขมิ้นชันต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการท้องเสียในสุกรและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม โครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2549 มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา: 189 หน้า.

สมปอง เตชะโต. 2539. บทบาทและความสำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. *ใน* เอกสารประกอบการสอนเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 2 : 1-15. สงขลา.

Anchalee, J. 2012. Effects of NAA and sucrose on shoot induction and rapid micropropagation by trimming shoot of *Curcuma longa* L. Thammasat International Journal of Science and Technology 4: 54-60.

Buddharaksa, P. and U-kong, W. 2011. Conervation and propagation *Tamindia uliginosa* Retz. and *Sauropus androgynous* (L.) Merr. by technique of *in vitro* culture. Naresuan University Journal 19: 1-7.

Goyal, A. K., Ganguly, K., Mishra, T. and Sen, A. 2010. *In vitro* multiplication of *Curcuma longa* Linn. an important medicinal zingiber. NBU Journal of Plant Sciences 4: 21-24.

Kar, B., Kuanar, A., Singh, S., Mohanty, S., Joshi, R. K., Subudhi, E. and Nayak, S. 2014. *In vitro* induction, screening and detection of high essential oil yielding somaclones in turmeric (*Curcuma longa* Linn.). Journal of Plant Growth Regulation 72: 56-66.

Kilinc, M. 2004. Effect of dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Biotechnology & Biotechnology 18: 58-60.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 45-47.

Rajamma, A. G., Bai, V. and Nambisam, B. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of oleoresins isolated from nine *Curcuma* species. Phytopharmacology 2: 312-317.

Raju, C. S., Kathiravan, K., Aslam, A. and Shajahan, A. 2013. An efficient regeneration system *via* somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 112: 387-393.

Sangousa, P. and Punnipa, S. 2011. Effect of Curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. on Cellular Morphology and Viability of *Helicobacter pylori*. Burrapha Science Journal 16: 75-82.

Shaqufta, N., Saiga, I., Sumera, J. and Aamir, A. 2009. *In vitro* clonal multiplication and acclimatization of different varieties of Turmeric (*Curcuma longa* L.). Pakistan Journal of Botany 4: 2807-2816.

Shrama, S. K., Shrama, M. and Raina, V. 2013. *In vitro* protocol standardization for turmeric in Jammu division. Journal of Biotechnology Research Center 8: 55-57.

Subramoniam, A., Madhavachandran, V. and Gangaprasad, A. 2013. Medicinal plants is the treatment of arthritis. Annals of Phytomedicine an International Journal 2: 3-36.

Theanphong, O., Sonksak, T. and Kirdmanee, C. 2010. Effect of plant growth regulators on micropprpagation of *Curcuma aeruginosa* Roxb. Thai Journal of Botany 2: 135-142.

Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G. and Wu, G. 2011. *In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma Kwangsiensis* Lindl. (Zingiberaceeae). Journal of Plant Growth Regulation 64: 141-145.

SJPS-OP-I-M02-261114-012

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางปริญา สุคนธรัตน์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610620002

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีการเกษตร)	มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา	2543

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. ทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ปริญา สุคนธรัตน์ , ทัศนี ขาวเนียม และ สมปอง เตชะโต. 2557. การทำให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ และการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2 : 36-40.

ปริญา สุคนธรัตน์ , ทัศนี ขาวเนียม และ สมปอง เตชะโต. 2558.การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่องอกนอกหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)