การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกระชายดำในหลอดทดลอง (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)

In Vitro Plant Regeneration and Chromosome Doubling of Black Galingale (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)

กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง

Kamoltip Laipaitong

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
2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกระชายดำในหลอดทดลอง (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)

In Vitro Plant Regeneration and Chromosome Doubling of Black Galingale (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)

กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง
Kamoltip Laipaitong

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
2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกระชายดำในหลอดทดลอง (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)
ผู้เขียน นางสาวกมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง
สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์)

.....กรรมการ
(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

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

.....กรรมการ
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวกมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวกมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกระชายดำในหลอดทดลอง (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)
ผู้เขียน นางสาวกมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์พืชสมุนไพรกระชายดำที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยการนำชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของกระชายดำตัดแยกและวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม Benzylaminopurine (BAP) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า อาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุด 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 4.76 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สำหรับการเพิ่มปริมาณยอด โดยการนำชิ้นส่วนยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพอาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว พบว่า อาหารเหลวให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุด 6.30 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอดสูงสุด 3.94 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำยอดที่ได้มาชักนำรากโดยวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหาร (Full MS 1/2MS 1/3MS และ 1/4MS) พบว่า อาหาร 1/4MS ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากสูงสุดเฉลี่ย 7.35 รากต่อต้น และความยาวรากสูงสุดเฉลี่ย 7.22 เซนติเมตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่อจากเหง้าในสภาพปกติปลูกอนุบาล เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้าทั้งสองแหล่งสามารถแตกหน่อใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้จำนวนหน่อสูงสุด 3.67 หน่อต่อกอ จำนวนใบสูงสุด 7 ใบต่อกอ และความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 28 เซนติเมตร สำหรับการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.2 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAAเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 45 เปอร์เซ็นต์ และให้ขนาดแคลลัสสูงสุด 1.32 เซนติเมตร ในส่วนของการเพิ่มปริมาณแคลลัส นำแคลลัสที่ได้น้ำหนัก 150 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด 1,127 มิลลิกรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงไม่สามารถชักนำการเกิดพืชต้นใหม่จากแคลลัสได้ สำหรับการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้ชิ้นส่วนยอดจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.0 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า โคลชิซินเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำต้นเตระพลอยด์ได้สูงสุด 37.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี เมื่อวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย พบว่า ยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ ยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.09 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่า กระชายดำที่เป็นต้นเตระพลอยด์ให้จำนวนความหนาแน่นเซลล์คุม 2.8 เซลล์ต่อตารางไมโครเมตร ความกว้างเซลล์คุม 3.59 ไมโครเมตร ความยาวเซลล์คุม 6.05 ไมโครเมตร และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ 51.90 คลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า กระชายดำที่เป็นต้นเตระพลอยด์ให้อัตราการแตกหน่อ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหน่อ 2.80 หน่อ ความสูงต้น 22.7 เซนติเมตร จำนวนใบ 6.20 ใบต่อกอ ความกว้างใบ 5.84 เซนติเมตร ความยาวใบ 13.89 เซนติเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นดิพลอยด์ และความหนาใบ 0.35 มิลลิเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งให้ผลมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Thesis Title	*In Vitro* Plant Regeneration and Chromosome Doubling of Black Galingale (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker)
Author	Miss Kamoltip Laipaitong
Major Program	Plant Science
Academic Year	2017

Abstract

A simple and cost effective protocol for large-scale propagation of black galingale, a medicinal plant, has been studied. Sterilized shoot explants were excised and cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various concentrations of Benzylaminopurine (BAP) (1, 2, 3, 4 and 5 mg/L). The results showed that MS medium supplemented with 3 mg/L BAP gave the highest shoot induction (95 percent), number of shoots (3.75 shoots/explant) and shoot length (4.76 cm) after culturing for 6 weeks. For shoot proliferation, shoots from a previous study were excised and cultured on different types of culture media (solid, semi-solid and liquid MS medium, supplemented with 3 mg/L BAP). The highest percentage of shoot proliferation (100%), number of shoots (6.30 shoots/explant) and shoot length (3.94 cm) were obtained from liquid MS medium after 6 weeks of culture. After that, the shoots were cultured on different strengths of MS medium (full MS, 1/2MS, 1/3MS and 1/4MS). The results showed that 1/4MS medium gave the highest root induction (100%), number of roots (7.35 roots/shoot) and root length (7.22 cm) after culturing for 3 weeks. For acclimatization, the *in vitro* plantlets and *ex vitro* sprouting buds were transplanted singly in polyethylene bags containing soil, peat moss, and compost, at the ratio of 1:1:1 and kept in a greenhouse for 9 weeks. The results showed that both sources of plants can produce tillers at 100 percent, but the regenerated plantlets produced more tillers (3.67 tillers/clump), more leaves (7 leaves/clump) and taller plants (28 cm), than the *ex vitro* spouting buds. For callus induction, shoots were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0.2 0.5 1.0 and 2.0 mg/L) in combination with 1- Naphthaleneacetic acid (NAA) (0.2, 0.5 and 1.0 mg/L). The results showed that 0.5 mg/L 2,4-D in combination with 0.2 mg/L NAA gave the highest percentage of callus induction (45%) and the maximum size callus (1.32 cm). For proliferation, 150 mg calluses were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of 2,4-D (0.1 and 0.2 mg/L) and NAA (0.1 and 0.5 mg/L). The results showed that 0.2 mg/L 2,4-D in combination with 0.1 mg/L NAA gave the best percentage of proliferation (100%) and callus fresh weight (1,127 mg). MS medium with reduced concentrations of nutrients could not induce

plantlets from callus. For chromosome duplication, shoots of black galingale were immersed in colchicine solutions of 0.0, 0.1, 0.15, 0.20 and 0.25% and incubated for 24, 48 and 72 hours. The concentration of colchicine at 0.10% for 48 hours gave the highest survival rate (70%) and induced the highest percentage of tetraploid plants (37.5%) as analyzed by flow cytometry technique. And the result showed that LD_{50} was obtained from 0.12% colchicine solution for 48 hours and 0.09 % colchicine solution for 72 hours as evaluated by regression equation. For physiological characteristics, the results showed that guard cell density at 2.8 cells/μm^2, guard cell width at 3.59 µm, guard cell length at 6.05 µm and chloroplast numbers at 51.90 chloroplasts/guard cell were obtained. Twelve weeks after transferring to *ex vitro* environments, morphological characteristics of the induced tetraploid plants were measured. The results showed that tetraploid plants gave the highest percentage of sprout induction (100%), number of tillers (2.80 tillers/clump), plant height (22.7 cm), number of leaves (6.20 leaves/clump), leaf width (5.84 cm), leaf length (13.89 cm) and leaf thickness (0.35 mm).

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.ทัศนี ขาวเนียม และ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความเมตตา ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิจัย การปฏิบัติงานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเก็บรวบรวมข้อมูล การตรวจสอบเนื้อหาและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของการเขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายวลิต ไหลไผ่ทอง บิดา นางวรรณา เกตุแก้ว มารดา น้องสาว และญาติพี่น้องทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีที่สุด เป็นที่ปรึกษาเมื่อยามเกิดความท้อถอยให้กลับมามีแรงต่อสู้กับอุปสรรคต่าง ๆ อีกครั้ง คอยสั่งสอน อบรม ช่วยเหลือทุนการศึกษา และให้ความสนับสนุนเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ทั้งทางด้านวิชาการและคุณธรรม ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ จนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการผลิตและพัฒนาบุคลากรภายใต้ความร่วมมือระหว่างมูลนิธิชัยพัฒนา และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถานความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือซึ่งกันและกัน ให้กำลังใจในทุกครั้งที่เกิดปัญหาและท้อถอย คอยสนับสนุนให้ปฏิบัติตัวไปในทางที่ดี คอยตักเตือนเมื่อทำผิดพลาด และเป็นที่ปรึกษาในทุกเรื่องทั้งด้านการทำวิจัยและการดำเนินชีวิต จนข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์	(15)
สรุปเนื้อหา	
บทที่ 1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	17
บทที่ 2 การทดลอง	
การทดลองที่ 1 การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง	18
การทดลองที่ 2 การชักนำแคลลัสและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง	34
การทดลองที่ 3 ผลโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้ชิ้นส่วนยอดของกระชายดำ	46
บทที่ 3 สรุป	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	74
ผลงานตีพิมพ์	76
ประวัติผู้เขียน	84

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลของความเข้มข้นของ BAP ต่อการชักนำยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลองหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	23
2.2	ผลของชนิดอาหารต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	25
2.3	ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการชักนำรากของกระชายดำในหลอดทดลองหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	27
2.4	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากหลอดทดลอง และ หน่องอกจากธรรมชาติ หลังอนุบาลลงดินปลูกเป็นเวลา 9 สัปดาห์	28
2.5	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D และ NAA) ต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดผ่าครึ่งตามแนวยาว ขนาด 1.0 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	38
2.6	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D และ NAA) ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสกระชายดำ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	40
2.7	ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสกระชายดำหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	42
2.8	ผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนยอดกระชายดำ	51
2.9	ผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมททรี	53
2.10	ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n หลังจาก หลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	55
2.11	ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 3 เดือน	59

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.1	ลักษณะเหง้าและหน่ออ่อนของกระชายดำ	3
1.2	โครงสร้างทางเคมีของสารโคลชิซิน และลักษณะของ *Colchicum autumnale* L.	12
2.1	ลักษณะหน่องอกของกระชายดำนอกหลอดทดลองที่ใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ในหลอดทดลอง	20
2.2	ลักษณะยอดของกระชายดำจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังย้ายเลี้ยงทุก ๆ 6 สัปดาห์ เป็นเวลา 24 สัปดาห์	20
2.3	ลักษณะของยอดที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	24
2.4	ลักษณะของยอดที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	26
2.5	ลักษณะของรากที่ได้จากการวางเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่ลดและไม่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหาร และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	27
2.6	การรอดชีวิตของต้นกล้ากระชายดำในหลอดทดลองหลังอนุบาลลงถาดเพาะชำ (ดินปลูก แกลบเผา ขุยมะพร้าว และพีทมอส อัตราส่วน 2:1:1:1) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	29
2.7	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำจากแหล่งของชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน หลังจากออกปลูก เป็นเวลา 9 สัปดาห์	29
2.8	ลักษณะยอดของกระชายดำจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์	36
2.9	ลักษณะแคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ ใช้ในการทดลองที่ 2 และ 3	36
2.10	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการชักนำบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	39
2.11	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ที่ลดความเข้มข้นต่าง ๆ ลง หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	41

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2.12	ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	43
2.13	ชิ้นส่วนยอดของกระชายดำ อายุ 6 สัปดาห์ ที่ถูกตัดแต่งก่อนนำไปใช้ในการเพิ่มชุดโครโมโซม	48
2.14	อัตราการรอดชีวิตของกระชายดำหลังจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	52
2.15	ฮีสโตรแกรมแสดงปริมาณดีเอนเอของกระชายดำหลังจุ่มแช่สารละลายโคลชิซิน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	54
2.16	ความหนาแน่นเซลล์คุมของกระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X	56
2.17	ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของกระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X	57
2.18	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 3 เดือน	60

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog medium
BA	=	Benzyladenine
BAP	=	Benzylaminopurine
2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
NAA	=	1-Naphthaleneacetic acid
dicamba	=	3, 6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid
PFM	=	3,5,7,30′,40′-Pentamethoxyflavone
TMF	=	4′,5,7,-Triethoxylflavone
DMF	=	5,7-Dimethoxyflavone
SSE	=	Secondary somatic embryo
KN	=	Kinetin
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan’s multiple range test
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
TDZ	=	Thidiazuron
PI	=	Propidium iodide
DAPI	=	4′,6-Diamidino-2-phenylindole
ns	=	Non significant

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการตอบรับให้นำเสนอและตีพิมพ์บทความ

กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง, สมปอง เตชะโต และทัศนี ขาวเนียม. 2561. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 5: 13-18.

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 19 มกราคม 2561

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ในหัวข้อเรื่อง **"การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง"** ทั้งนี้บทความวิจัยดังกล่าวได้ผ่านการตรวจสอบความมีมาตรฐานทางวิชาการจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว จึงตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์ฯ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 (มกราคม – มีนาคม 2561) ทั้งนี้กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับจากเว็บไซต์ของวารสารฯ ได้ที่ http://natres.psu.ac.th/Department /PlantScience/sjps

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-9

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กระชายดำ (Black galingale) จัดเป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker กระชายดำจัดเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 20 - 30 เซนติเมตร เนื้อภายในเหง้ามีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม เนื้อใบมีสีม่วงเข้มเกือบดำ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับในระนาบเดียวกัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) ในประเทศไทยมีชื่อเรียกที่หลากหลายเช่น กระชายดำ ว่านกระชายดำ กระชายม่วง และว่านเพชรดำ เป็นต้น เหง้าของกระชายดำมีสารประกอบที่สำคัญ ได้แก่ 3,5,7,30′,40′-pentamethoxyflavone (PMF), 4′,5,7,-trimethoxylflavone (TMF), 5,7-dimethoxyflavone (DMF), borneol และ sylvestrene (Mekjaruskul and Sripanidkulchai, 2015) และในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์จากกระชายดำออกมาจำหน่ายในท้องตลาดอย่างหลากหลาย เช่น ชาชงกระชายดำ ลูกอม ไวน์กระชายดำ และแคปซูลกระชายดำ เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) จึงทำให้กระชายดำเป็นสมุนไพรที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเหง้ากระชายดำ เช่น รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate *et al*., 2005) ต้านการอักเสบ (Sae-wong *et al*., 2009) แก้แพ้ (Tewtrakul *et al*., 2008) และป้องกันภาวะซึมเศร้า (Hawiset *et al*., 2011) สำหรับประเทศไทยนิยมปลูกกระชายดำในเขตอำเภอนาแห้ว อำเภอด่านซ้าย และอำเภอภูเรือของจังหวัดเลย (สถาบันแพทย์แผนไทย, 2553) และมีรายงานการเพาะปลูกในจังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน กาญจนบุรี ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559) ปัจจุบันการขยายพันธุ์กระชายดำแบบดั้งเดิมหรือการใช้เหง้าเป็นไปได้ยากเนื่องจากต้องใช้เหง้าแม่พันธุ์ที่สม่ำเสมอปริมาณมากโดยการขยายพันธุ์แต่ละครั้งต้องใช้เหง้าแก่อายุ 10 - 12 เดือน และการปลูกกระชายดำ 1 ไร่ ต้องใช้เหง้าแก่ 200 - 250 กิโลกรัมต่อไร่ ประกอบกับการปลูกกระชายดำมักเกิดโรคเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ซึ่งส่งผลให้กระชายดำเกิดอาการใบเหลือง ต้นเหี่ยวเน่า หัวเน่า และตายในที่สุด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) ทำให้เกิดความเสียหายในการผลิตเหง้ากระชายดำ และอาจส่งผลทำให้ได้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ดังนั้นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ สามารถช่วยขยายพันธุ์พืชได้รวดเร็วและปลอดโรค โดยมีการรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชตระกูลขิง-ข่าหลายชนิดเช่น ดาหลา (Abdelmageed *et al*., 2011) ขมิ้น (Sharma *et al*., 2013) และเปราะหอม (Swapna *et al*., 2004) เป็นต้น สำหรับกระชายดำมีการรายงานการชักนำยอด โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ Benzylladenine (BA) (Prathanturaruga *et al*., 2015) และ จากการรายงานของ Zuraida และคณะ (2014a) รายงานการชักนำแคลลัสกระชายดำโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D และ NAA เป็นต้น นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์พืชร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังเป็นที่นิยมในนักปรับปรุงพันธุ์จำนวนมาก ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้สารโคลชิซินเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมของพืช

เนื่องจากสามารถประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด สำหรับในพืชตระกูลขิง-ข่า มีรายงานความสำเร็จการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินใน ว่านหาวนอน (Soonthonkalump and Thammasiri, 2012) และขมิ้น (Ketmaro *et al*., 2012) สำหรับในกระชายดำยังไม่มีรายงานการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซิน

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกระชายดำผ่านทั้งช่องทางตรงและอ้อม เพื่อให้ได้ต้นกระชายดำที่มีความสม่ำเสมอ ปลอดโรคจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ตลอดจนการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อให้ได้ผลผลิตและสารสำคัญของกระชายดำเพียงพอต่อความต้องการของท้องตลาดในปัจจุบัน อีกทั้งยังเป็นแหล่งของต้นกล้าพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก เป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชในการอนุรักษ์พันธุกรรม และปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และข้อมูลทั่วไป

กระชายดำจัดเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 20 - 30 เซนติเมตร เหง้าใต้ดินมีลักษณะอ้วนป้อม และแตกแขนงเป็นหัวด้านข้างค่อนข้างถี่ เหง้าเป็นสีม่วงดำ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว รูปไข่ หรือรูปรีกว้าง 5 - 10 เซนติเมตร เนื้อใบมีสีม่วงเข้มเกือบดำ กาบใบสั้นอวบหนา 2 อันขนาด 2 - 3 เซนติเมตร ปลายใบเป็นติ่งแหลม ฐานใบ 2 ข้างไม่เท่ากัน (ภาพที่ 1.1) ดอกจะออกเป็นช่อแทรกที่โคนกาบใบ ก้านช่อยาว 5 - 6 เซนติเมตร กลีบดอกส่วนโคนเชื่อมเป็นหลอด ยาว 3 - 3.2 เซนติเมตร ปลายแยกเป็นแฉก เกสรตัวผู้เป็นหมัน สีขาว รูปขอบขนานกว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 1.0 - 1.3 เซนติเมตร กลีบปากสีม่วง (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559)

ภาพที่ 1.1 ลักษณะเหง้าและหน่ออ่อนของกระชายดำ
ที่มา: ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (2553)

นอกจากนี้ในเหง้ากระชายดำยังมีสารสำคัญต่างๆ มากมายที่เป็นประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยา โดย Murata และคณะ (2013) ศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำในหนูทดลอง โดยการฉีดสารสกัดจากกระชายดำเข้าไปในหลอดเลือดของหนู จากการศึกษาพบว่า สารสกัดที่ได้จากเหง้ากระชายดำสามารถละลายลิ่มเลือด และทำให้ระบบไหลเวียนโลหิตของหนูทดลองดีขึ้น เมื่อเทียบกับการไม่ได้ฉีดสารสกัดจากกระชายดำเข้าไปในหลอดเลือดของหนูทดลอง เช่นเดียวกับ Mekjaruskul และ Sripanidkulchai (2015) ศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศของผู้ชาย โดยการนำสารสกัดจากกระชายดำมาใช้ร่วมกับยา Sildenafil ซึ่งเป็นยากระตุ้นทางเพศแล้วให้หนูตัวผู้กินเข้าไป ผลการศึกษาพบว่า การใช้สารสกัดจากกระชายดำร่วมกับยากระตุ้นทางเพศให้ผลดีกับหนูทดลองมากกว่าการใช้สารสกัดจากกระชายดำหรือการใช้ยากระตุ้นทางเพศเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา จากสารสกัดกระชายดำ เช่น รักษาแผล

ในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate *et al.,* 2005) ต้านการอักเสบ (Sae-wong *et al.,* 2009) ป้องกันโรคอ้วน (Leardkamolkarn *et al.,* 2009) แก้แพ้ (Tewtrakul *et al.,* 2008) ป้องกันภาวะซึมเศร้า (Hawiset *et al.,* 2011) และป้องกันมะเร็ง (Banjerdpongchai *et al.,* 2008) เป็นต้น

กระชายดำสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการใช้เหง้าซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิม โดยใช้เหง้าแก่อายุ 10 - 12 เดือน เป็นเหง้าแม่พันธุ์ และต้องใช้ในปริมาณมากถึง 200 - 250 กิโลกรัมต่อไร่ แต่ในการขยายพันธุ์แต่ละครั้งมักประสบปัญหาโรคเน่าจาก*เชื้อ Ralstonia solanacearum* ทำให้เสียเหง้า แม่พันธุ์ที่ดีไปไม่น้อย จึงต้องมีการนำเทคนิคใหม่ ๆ มาใช้ขยายพันธุ์กระชายดำ ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ได้พืชต้นใหม่จำนวนมาก ปลอดโรค และใช้ระยะเวลาอันสั้น

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำชิ้นส่วนพืชใดก็ได้ มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งประกอบไปด้วยเกลือแร่ ธาตุอาหารต่างๆ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อ และควบคุมสภาพแวดล้อม (รังสฤษดิ์, 2540) การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก ใช้ระยะเวลาสั้นและปลอดโรค

2.1 การชักนำยอดรวม

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่มีจุดกำเนิดอยู่แล้ว เช่น ปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด เป็นต้น มีข้อดีคือจะได้ยอดที่เจริญพัฒนาเป็นต้นพืชต้นใหม่โดยตรง จึงเป็นการขยายพันธุ์ที่ได้ต้นพืชตรงตามสายพันธุ์เดิม ต้นที่ได้ยังปลอดโรคโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และเมื่อขนาดของชิ้นส่วนปลายยอดที่วางเลี้ยงใหญ่ขึ้นจำนวนของตาด้านข้างก็มากขึ้น เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมไซโตไคนินในอัตราความเข้มข้นสูง ช่วยส่งเสริมการเกิดยอดแขนงจากตาด้านข้างในอัตราที่สูง (สมปอง, 2539)

จากการศึกษาในพืชวงศ์ Zingiberaceae โดย Rahman และคณะ (2004) พบว่าการขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนหน่องอกวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุด 14.5 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 6.2 เซนติเมตร Sharma และคณะ (2013) นำชิ้นส่วนปลายยอดของขมิ้นชัน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 88.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน Anchalee (2012) พบว่าการขยายพันธุ์ขมิ้นชันในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอด วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น

3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 13.4 ยอดต่อชิ้นส่วน Shukla และคณะ (2007) ศึกษาการนำชิ้นส่วนปลายยอดของอาวแดง (*Curcuma angustifolia* Roxb.) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.87 ยอดต่อชิ้นส่วน Abdelmageed และคณะ (2011) พบว่า การขยายพันธุ์ดาหลา (*Etlingera elatior*) ในหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนตาที่ซอกใบมาฟอกฆ่าเชื้อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.45 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.67 ยอดต่อชิ้นส่วน

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ BA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น โดย Bhattacharya และ Sen (2013) ศึกษาการนำชิ้นส่วนปลายยอดของเปราะหอม (*Kaempferia galangal* L.) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BAP และ Kinetin (KN) ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า การเติม BAP เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 16.52 ยอดต่อชิ้นส่วน

2.2 การเพิ่มปริมาณยอดรวม

การเพิ่มปริมาณยอดรวมเป็นขั้นตอนต่อเนื่องจากการชักนำยอดรวม โดยการนำชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อมาแยกและตัดให้มีขนาดเล็ก จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ ที่มีส่วนประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และวุ้น เป็นต้น นอกจากนี้ชนิดของอาหาร เช่น อาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว อาหารเหลว มีความสำคัญ และมีส่วนช่วยให้พืชดูดใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ และเพิ่มปริมาณยอดรวมได้จำนวนมากตามความต้องการ

จากการศึกษาพืชในวงศ์ Zingiberaceae โดย Salvi และคณะ (2002) ศึกษาชนิดของอาหารที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมของขมิ้นชันในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อ วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) หรืออาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 4.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 10.0 เซนติเมตร Stanly และ Keng (2007) ศึกษาชนิดของอาหารที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มปริมาณ

ยอดรวมของขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedorlia*) และกระทือควาย (*Curcuma zerumbet*) ในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อ วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง (วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์) หรืออาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 6.1 และ 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขมิ้นอ้อย และกระทือควาย ตามลำดับ Chong และคณะ (2012) ศึกษาชนิดของอาหารที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมขมิ้นอ้อยในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อ วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง (วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์) หรืออาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน

2.3 การชักนำราก

การชักนำรากเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเป็นขั้นตอนเตรียมความพร้อมให้พืชก่อนอนุบาลลงดินปลูก เพื่อให้พืชมีศักยภาพในการปรับตัว และอยู่รอดในระหว่างการอนุบาลภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งการชักนำรากอาจทำได้ทั้งในหลอดทดลองและนอกหลอดทดลอง ทั้งนี้พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมชักนำรากในหลอดทดลองมากกว่า เพื่อลดความเสี่ยงของพืชในการเกิดโรค และเหี่ยวแห้งในระหว่างชักนำรากนอกหลอดทดลอง โดยการชักนำรากในหลอดทดลองนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่กระตุ้นการเกิดรากได้ดี นอกจากนี้อาจจะใช้วิธีการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงเพื่อกระตุ้นการเกิดรากในหลอดทดลองได้อีกทางหนึ่ง

จากการศึกษาพืชในวงศ์ Zingiberaceae โดย Das และคณะ (2013) ศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลองของ *Zingiber moran* และกระทือ (*Zingiber zerumbet*) โดยใช้ยอดที่ปลอดเชื้อ ขนาด 3 – 4 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA IAA และ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 90 และ 86.6 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากสูงสุด 5.21 และ 7.12 ราก และความยาวรากสูงสุด 5.41 และ 5.51 เซนติเมตร ใน *Zingiber moran* และกระทือ ตามลำดับ

Sharmin และคณะ (2013) ศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลองของว่านนางคำ (*Curcuma aromatic*) โดยใช้ยอดที่ปลอดเชื้อ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความ

เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA และ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากสูงสุด 9.40 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากสูงสุด 3.52 เซนติเมตร Senarath และคณะ (2017) ศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลองของเปราะหอม โดยใช้ยอดที่ปลอดเชื้อ ขนาด 3 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากสูงสุด 6 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากสูงสุด 3.98 เซนติเมตร

2.4 การอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก

ขั้นตอนสุดท้ายของการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือการอนุบาลออกปลูกนอกหลอดทดลอง การที่ต้นกล้าสามารถมีชีวิตรอด เจริญเติบโต และพัฒนาในสภาพธรรมชาติได้จึงนับว่าประสบความสำเร็จในงานด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การย้ายพืชในหลอดทดลองไปสู่สภาพธรรมชาติในทันทีนั้น มักมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ เนื่องจากพืชที่ได้จากหลอดทดลองในตอนแรกนั้นมีการสร้างสารเคลือบผิวได้น้อย ทำให้ปากใบเปิดกว้าง จึงเกิดการสูญเสียน้ำ ทำให้พืชเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนที่ช่วยให้พืชปรับสภาพก่อนออกปลูกในสภาพแวดล้อม ซึ่งขั้นตอนนี้จะเกี่ยวกับการปรับสภาพหรือทำให้พืชแข็งแรง ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ และความเข้มแสงสูง ด้วยการปรับสภาพแวดล้อมแบบค่อย ๆ เปลี่ยนไป (ปริญา, 2558)

จากการศึกษาอัตรารอดชีวิตหลังการย้ายปลูกลงดินของพืชในวงศ์ Zingiberaceae โดย Goyal และคณะ (2010) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของขมิ้นชันลงในกระถางที่บรรจุดินสวน และทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อัตราส่วน 1:1 วางเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 1 เดือน มีอัตรารอดชีวิตถึง 93 เปอร์เซ็นต์ Zhang และคณะ (2011) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของ *Curcuma kwangsiensis* ลงในกระถางที่บรรจุดิน ขุยมะพร้าว และเพอไลท์เป็นวัสดุปลูก อัตราส่วน 1:1:1 วางเลี้ยงในเรือนกระจก เป็นเวลา 2 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ Abbas และคณะ (2011) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของขิงลงในกระถางที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุปลูกเพียงอย่างเดียว วางเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ Yunus และคณะ (2012) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของดาหลาลงในกระถางที่บรรจุ ดิน ทราย และพีทมอส เป็นวัสดุปลูก อัตราส่วน 1:1:1 ครอบด้วยถุงพลาสติก วางเลี้ยงในโรงเรือนอุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส ให้แสง 18 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 21 ไมโครโมล์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และรดด้วยน้ำกลั่นสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิตถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์ Jose และ Thomas (2015) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่

สมบูรณ์ของ *Curcuma caesia* Roxb ลงในกระถางที่บรรจุ ดิน และทราย อัตราส่วน 1:1 วางเลี้ยงในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 18-25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80-85 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิตถึง 93.85 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชที่ขยายพันธุ์ได้จากหลอดทดลองและพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบธรรมชาติ มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทำให้ทราบถึงศักยภาพการเจริญเติบโต และการปรับตัวของพืชในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า หลังจากย้ายลงสภาพธรรมชาติ โดย Salvi และคณะ (2002) ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของขมิ้นชัน ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง และขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า หลังจากย้ายลงสู่แปลงปลูกเป็นเวลา 32 สัปดาห์ พบว่า ขมิ้นชันที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ จำนวนใบ และความสูงดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชันที่ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า โดยให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ 6.5 หน่อต่อต้น จำนวนใบ 11.9 ใบ และความสูง 92.2 เซนติเมตร Singh และคณะ (2013) ศึกษาการเจริญเติบโตของขมิ้นชันพันธุ์ Lakadong ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง เปรียบกับการใช้เหง้า หลังจากย้ายลงแปลงปลูกเป็นเวลา 52 สัปดาห์ พบว่า ขมิ้นชันพันธุ์ Lakadong ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลองให้การเจริญเติบโตดีกว่าการขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า โดยให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ 6.45 หน่อต่อต้น จำนวนใบ 12.30 ใบ และความสูง 94.75 เซนติเมตร

2.5 การชักนำและการเพิ่มปริมาณแคลลัส

แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมาเพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในมีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง และชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ซึ่งชิ้นส่วนพืชที่มีสภาพเหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสควรเป็นชิ้นส่วนจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีอายุน้อย นิยมใช้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ คือ คัพภะ ใบอ่อน และใบเลี้ยง เป็นต้น (รังสฤษดิ์, 2540)

.จากการศึกษาในพืชวงศ์ Zingiberaceae โดย Saensouk (2011) ศึกษาการชักนำแคลลัส *Cornukaempferia aurantiflora* ในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อนวางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักแคลลัสสูงสุด 2.50 กรัม Raju และคณะ (2013) ศึกษาการชักนำแคลลัส *Curcuma amada* Roxb. โดยใช้ชิ้นส่วนของกาบใบ วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.70 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า

2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 26.43 เปอร์เซ็นต์ Kar และคณะ (2014) ศึกษาการชักนำแคลลัสในขมิ้นโดยใช้ชิ้นส่วนฐานที่เกิดยอด วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.80 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 80.30 เปอร์เซ็นต์ ปริญา (2558) ศึกษาการชักนำแคลลัสขมิ้นโดยใช้ชิ้นส่วนกาบใบ วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D dicamba และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 70.37 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ปริญา (2558) พบว่า การนำแคลลัสจากกาบใบขมิ้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากที่สุด Jose และ Thomas (2015) พบว่า การนำแคลลัสจากใบของ *Curcuma caesia* วางเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 45 วัน สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีที่สุด Zuraida และคณะ (2014b) พบว่า การนำแคลลัสที่ได้จากฐานลำต้นของ *Curcuma caesia* วางเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีที่สุด โดยให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 921 มิลลิกรัม และน้ำหนักแห้ง 390 มิลลิกรัม

สำหรับในกระชายดำมีรายงานการชักนำแคลลัสโดย Zuraida และคณะ (2014a) รายงานว่า การชักนำแคลลัสกระชายดำโดยใช้ชิ้นส่วนของยอดเดี่ยววางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.30 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 95 วัน พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 20เปอร์เซ็นต์

2.6 การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อมี 2 ช่องทาง คือ การสร้างยอดหรือราก หรือทั้งต้นทั้งรากจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ด้วยการสร้างต้นอ่อน มีการสร้างยอดและรากเกิดขึ้นพร้อมกัน หรือพัฒนามาจากแคลลัส (สมปอง, 2539) มีรายงานการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชในวงศ์ Zingiberaceae Zhang และคณะ (2011) ศึกษาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการวางเลี้ยงแคลลัสของ *Curcuma soloensis* บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.55 เปอร์เซ็นต์ เติม BA NAA และ Thidiazuron (TDZ) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปรับ pH 5.8 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า BA ที่ความเข้มข้น

2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 95.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอด 7.1 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 6.1 เซนติเมตร Raju และคณะ (2013) ศึกษาการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *Curcuma amada* Roxb. บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 62.93 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอด 54.52 ยอดต่อชิ้นส่วน Zuraida และคณะ (2014b) ศึกษาการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *Curcuma caesia* บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 53 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอด 15 ยอดต่อชิ้นส่วน Saensouk (2011) ศึกษาการย้ายเลี้ยงแคลลัสของเปราะทอง (*Cornukaempferia aurantiflora*) บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.55 เปอร์เซ็นต์ เติม BA และ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 5.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอด 3.42 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 4.53 เซนติเมตร

3. การปรับปรุงพันธุ์โดยการเพิ่มชุดโครโมโซม

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพิ่มชุดโครโมโซม เป็นการชักนำการกลายพันธุ์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ในพืชที่ได้รับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดีกว่าพันธุ์เดิม เช่น น้ำหนักผลผลิต คุณภาพ และการเจริญเติบโต เป็นต้น

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงนี้สามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้

ระดับการกลายพันธุ์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ

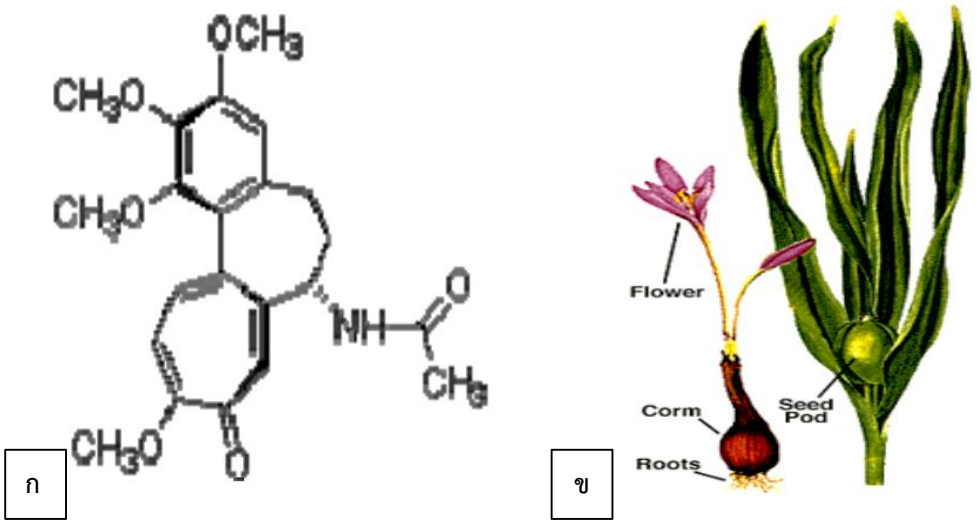
1. การกลายพันธุ์ระดับยีน คือการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนจากอัลลีลหนึ่งไปเป็นอีกอัลลีลหนึ่ง ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ
2. การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมหรือการเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซม (สิรินุช, 2548)

การกลายพันธุ์ของพืชสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติซึ่งได้รับอิทธิพลมาจากสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น รังสี ความชื้น และอุณหภูมิ ซึ่งเรียกว่า การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) (นพพร, 2543) ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์ในธรรมชาติอาจได้พืชพันธุ์ใหม่ที่ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ในธรรมชาติสามารถเกิดขึ้นได้ยาก ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์จึงต้องค้นหาวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่ต้องการและเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมในปัจจุบันมากที่สุด (สิรินุช, 2548)

3.1 การเพิ่มชุดโครโมโซมโดยการใช้สารเคมี

โครโมโซมอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ประกอบด้วยโปรตีน และดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์และถ่ายทอดลักษณะของสิ่งมีชีวิตหรือลูกหลาน โดยทั่วไปเซลล์ร่างกายแต่ละเซลล์ของพืชประกอบด้วยโครโมโซมหนึ่งชุดจากฝ่ายแม่ และอีกชุดหนึ่งจากฝ่ายพ่อ โครโมโซมของทั้งสองฝ่ายจะเป็นคู่กัน โดยเซลล์ร่างกายจะมีโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ดิพลอยด์ ในเซลล์สืบพันธุ์จะมีโครโมโซมครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกาย เรียกว่า แฮพลอยด์ สิ่งมีชีวิตเดียวกันจะมีโครโมโซมเท่ากัน (ประดิษฐ์, 2559) แต่เนื่องจากการเพิ่มชุดโครโมโซมในธรรมชาติเกิดขึ้นได้น้อย นักปรับปรุงพันธุ์จึงต้องหาวิธีการที่เหมาะสม เพื่อชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม พืชที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยการเพิ่มชุดโครโมโซมมักมีปริมาณสารเพิ่มขึ้น ขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้น มีผลทำให้ขนาดลำต้น ใบ และดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะที่แตกต่างจากการขยายพันธุ์แบบผสมเกสร (Griesbach, 1985) ซึ่งข้อดีของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อสร้างลักษณะดีใหม่ ๆ ที่ยังไม่เคยพบในสภาพธรรมชาติโดยใช้ระยะเวลาอันรวดเร็ว (บุญหงส์, 2548)

การใช้สารเคมีชักนำการกลายพันธุ์เป็นอีกวิธีที่นิยมในนักปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสามารถทำได้ในปริมาณมาก สะดวก รวดเร็ว และควบคุมความปลอดภัยได้ง่าย โดยสารที่นิยมใช้ตัวอย่างเช่น สารโคลชิซิน และเอธิลมีเทนซัลโฟเนต แต่ในงานวิจัยครั้งนี้เรามุ่งเน้นการชักนำการกลายพันธุ์โดยการใช้สารโคชิซิน สารโคลชิซินเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ มีน้ำหนักโมเลกุล 399.43 มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{22}H_{25}NO_6$ (ภาพที่ 1.2ก) สามารถละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม สารโคลชิซินสกัดได้จากเมล็ดและหัวของพืช เช่น *Colchicum autumnale* L. (ภาพที่ 1.2ข) (Matthew, 1998) และยังพบในพืชสกุล *Colchicum* ชนิดอื่น ๆ อีกด้วย โดยสารโคลชิซินสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยการเพิ่มชุดโครโมโซม ซึ่งสารโคลชิซินจะทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลที่ทำหน้าที่ดึงเซนโทรเมียร์ไปยังขั้วของเซลล์ การยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลนี้ทำให้โครโมโซมไม่แยกจากกันในระยะเมทาเฟส ทำให้โครโมโซมทั้งสองแท่งไม่ถูกดึงไปยังขั้วเซลล์ มีผลทำให้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งเซลล์จึงได้เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (อมรา, 2540 ; คำนูณ, 2540 ; นิตย์ศรี, 2541) ในการใช้สารโคลชิซินมีข้อควรระวัง คือ สารโคลชิซินสามารถสลายตัวได้เมื่อโดนแสง หรือความร้อนทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมหายไปด้วยดังนั้นจึงต้องกรองด้วยมิลลิพอร์เพื่อให้โคลชิซินอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของสารโคลชิซิน และลักษณะของ *Colchicum autumnale* L.
ก: โครงสร้างทางเคมีของสารโคลชิซินและ
ข: ลักษณะของ *Colchicum autumnale* L.
ที่มา: Matthew (1998)

การปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้สารโคลชิซิน เพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ การนำชิ้นส่วน PLBs ของกล้วยไม้ช้างแดงจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า PLBs ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถชักนำการเกิดต้นเตตระพลอยด์ได้มากสุด 60 เปอร์เซ็นต์ (ณัฐพร, 2553) นอกจากนี้ไซนียัะ (2555) ศึกษาการนำชิ้นส่วน Secondary somatic embryo (SSE) จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า SSE ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือคาดว่าจะเป็นต้นเตตระพลอยด์ Gantait และคณะ (2011) ศึกษาการใช้ชิ้นส่วนปลายยอดของเยอบีร่า จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่า ปลายยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดพืชเตตระพลอยด์สูงสุด 64 เปอร์เซ็นต์ Rego และคณะ (2011) ศึกษาการนำชิ้นส่วน Hypocotyl ของเสาวรส วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 15 วัน พบว่า สารโคลชิซิน ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์สูงสุด 8 เปอร์เซ็นต์ Omidbaigi และคณะ (2010) ศึกษาการนำเมล็ดโหระพาจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์สูงสุด 8 เปอร์เซ็นต์

สำหรับในพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีรายงานการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืชหลายชนิด โดย Adaniya และคณะ (2001) ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยการนำชิ้นส่วนปลายยอดของขิงมาวางเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งเติมสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 8 12 และ 14 วัน พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งร่วมกับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 วัน สามารถชักนำการเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงสุด 36.5 เปอร์เซ็นต์ Soonthonkalump และ Thammasiri (2014) ศึกษาการวางเลี้ยงยอดอ่อนของว่านหาวนอนบนอาหารแข็งเติมสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0 2 4 8 และ 12 วัน พบว่า การวางเลี้ยงยอดอ่อนของว่านหาวนอนบนอาหารแข็งที่เติมโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน สามารถชักนำการเกิดต้นเตตระพลอยด์สูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ Ketmaro และคณะ (2012) ศึกษาการนำยอดของขมิ้นจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นมิกโซพลอยด์ได้สูงสุด แต่ไม่มีรายงานการเกิดพืชเตตระพลอยด์ สำหรับในกระชายดำยังไม่มีรายงานการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซิน แต่ทั้งนี้การใช้สารโคลชิซินเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมต้องคำนึงถึงการเลือกใช้ชิ้นส่วน ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาที่พืชได้รับสารที่เหมาะสม (Blaskeslee *et al*., 1937) เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มชุดโครโมโซม ลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการทำการวิจัยในแต่ละครั้ง

3.2 การตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซม

พืชที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมจะมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทางสรีรวิทยา ได้แก่ จำนวนปากใบ ขนาดปากใบ จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ เป็นต้น นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือลักษณะภายนอกที่สามารถสังเกตเห็น สามารถเป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม เช่น ใบ ผล ดอก ลำต้น อาจมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม และการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีก็เป็นอีกทางเลือกที่เหมาะสมในการตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซม เนื่องจากสามารถทำได้รวดเร็ว ปริมาณมาก และให้ผลที่แม่นยำมากกว่าการตรวจด้วยการใช้เทคนิคการนับจำนวนโครโมโซมปลายราก

3.2.1 เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี

การใช้เทคนิคการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก พืชแต่ละชนิดมี วิธีการ สารเคมี และเทคนิคที่ใช้แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการตรวจปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคโฟลไซโตรเมทรีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเหมาะสมนำมาใช้ตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซม เนื่องจากเทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถทำได้ง่าย ปริมาณมาก และรวดเร็วกว่าการตรวจนับโครโมโซมปลายรากเป็นอย่างมาก (Dolezel *et al*., 1989) โฟลไซโตรเมทรีเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ โดยเซลล์จะถูกควบคุมให้ไหลเดี่ยว ๆ ด้วยความเร็วที่เหมาะสม จากนั้นเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยสีฟลูโอเรสเซนต์ เช่น Propidium iodide (PI) หรือ 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ถูกฉายแสงเลเซอร์ แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นที่เซลล์ จากนั้นระบบอิเล็กทรอนิกส์จะทำการ

แปลสัญญาณแสง และสะท้อนกลับ ออกมาเป็นกราฟเทคนิคนี้ สามารถตรวจวัดเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ความรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง (คำนูณ, 2554)

Glowacka และคณะ (2010) พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากใบของหญ้ามิลแคลทัช โดยการใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีที่สามารถแยกความแตกต่างของระดับโพลีพลอยด์ได้อย่างชัดเจน โดยสามารถแยกความแตกต่างได้ 4 ระดับ ดังนี้ ดิพลอยด์ ทริพลอยด์ เตตระพลอยด์ และเฮกซะพลอยด์ โดยความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่สามารถชักนำโพลีพลอยด์ได้ดีที่สุดคือ สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 313 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง Cai และ Kang (2011) ศึกษาการนำใบของ *Populus pseudosimonii* Kitag ที่ผ่านการชักนำโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซิน มาย้อมด้วยสี DAPI และตรวจสอบโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี พบว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี สามารถแยกความแตกต่างของพืชดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ ได้เช่นเดียวกับการใช้เทคนิคการนับจำนวนโครโมโซมปลายราก Dutt และคณะ (2010) รายงานว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโพลีพลอยด์ได้ พบว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถแยกความแตกต่างของส้มที่เป็นต้นดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ได้ Kaensaksiri และคณะ (2011) ศึกษาการนำใบแก่ของบัวบกมาสับและตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ โดยการใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี พบว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถแยกความแตกต่างของโพลีพลอยด์ได้ 3 ระดับ คือ ดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ Aina และคณะ (2012) รายงานว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโพลีพลอยด์ใน *Arachis paraguariensis* สามารถแยกความแตกต่างของโพลีพลอยด์ได้ 3 ระดับ คือ ดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์

นอกจากนี้ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่แยกความแตกต่างของระดับโพลีพลอยด์โดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี เช่น ฟีเวอร์ฟิว (Majdi and Karimzadeh, 2010) มันเทศประดับ (นุชรัฐ และธัญญะ, 2560) กล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ (ปฐมาภรณ์ และสาโรจน์, 2557) โหระพา (Omidbaigi *et al*., 2010) และมันสำปะหลัง (Zhou *et al*., 2017) เป็นต้น

3.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา

ลักษณะทางสรีรวิทยาเป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมได้ เพราะลักษณะทางสรีรวิทยาสามารถศึกษาได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยไม่ต้องมีวิธีการยุ่งยาก ไม่ต้องใช้สารเคมี หรืออุปกรณ์ที่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากถ้ามีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม ความหนาแน่นของปากใบ ขนาดของปากใบ และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ อาจมีจำนวนเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่จะช่วยยืนยันการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมได้อีกวิธีการหนึ่ง

Sun และคณะ (2009) ศึกษาการนำใบอ่อนของสาลี่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายใบอ่อนที่จุ่มแช่สารละลายโคลชิซินวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอด พบว่า ยอดที่ได้จากใบอ่อนที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลาย

โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Chen และ Gao (2007) ศึกษาการนำตายอดของต้นอึ่งคี้ จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง พบว่า ตายอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุด และปากใบของต้นเตตระพลอยด์มีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Gu และคณะ (2005) ศึกษาการนำชิ้นส่วนปลายยอดของพุทราจีนจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01 0.03 0.05 0.1 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ปลายยอดที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้ และต้นเตตระพลอยด์ที่ได้ มีความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่ปากใบมีความกว้าง และความยาวเพิ่มมากขึ้นเมื่อปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ Yang และคณะ (2006) ศึกษาการนำโซมาติกเอมบริโอของอุ่นจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน พบว่า โซมาติกเอมบริโอที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 วัน สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้ดีที่สุด และต้นเตตระพลอยด์ที่ได้มีความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่มีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบเพิ่มขึ้น Tang และคณะ (2010) ศึกษาการนำเอมบริโอเจนิคแคลลัสของต้นเจ้าหญิงจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เอมบริโอเจนิคแคลลัสที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุด ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้มีจำนวนความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่มีขนาดของปากใบและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น

นอกจากพืชที่กล่าวมาข้างต้น มีพืชอีกหลายชนิดที่ใช้ลักษณะทางสรีรวิทยาเป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง (Shige *et al*., 2009) สบู่ดำ (มยุรี, 2553) กล้วยไม้ม้าวิ่ง (วชิรพัฒน์, 2552) แววมยุรา (จิราภรณ์, 2554) และกล้วยไม้เอื้องเงิน (รัชนี, 2553) เป็นต้น

3.2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นลักษณะภายนอกของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล ซึ่งโดยทั่วไปพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ และช่วยจำแนกพืชที่มีโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปได้อีกวิธีหนึ่ง

Ye และคณะ (2010) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเตตระพลอยด์ของยี่เข่ง พบว่า ต้นเตระพลอยด์ของต้นยี่เข่งมีใบขนาดใหญ่ หนา สีเข้ม ละอองเรณู ดอก ผล และเมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ Liu และคณะ (2011) รายงาน การชักนำการกลายพันธุ์ ของ *Dendranthema nankingense* พบว่า ต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีขนาดของละออง

เรณู ดอก ใบ ต้นเปลี่ยนแปลงไป และสามารถทนความเย็นได้มากว่าต้นดิพลอยด์ Chen และคณะ (2011) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้นเตตระพลอยด์ของหน้าวัว พบว่า ต้นเตตระพลอยด์มีขนาดของใบใหญ่ หนา จานรองดอก และทรงพุ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ Abdoli และคณะ (2013) ศึกษาต้นเตตระพลอยด์ของ *Echinacea purpurea* (L.) พบว่า มีละอองเรณู เมล็ด ดอก และใบขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่สารโคลชิซิน Yanhong และคณะ (2016) พบว่า ต้นเตตระพลอยด์ของดาวเรือง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป คือ ใบหนา ดอกใหญ่ และลำต้นเตี้ยกว่าต้นปกติ Omidbaigi และคณะ (2010) รายงานว่า ต้นเตตระพลอยด์ของโหระพา มีใบหนาสีเข้ม รูปร่างใบเปลี่ยนไป เมล็ด ละอองเรณู และใบมีขนาดใหญ่กว่าต้นปกติ

นอกจากนี้มีพืชอีกหลายชนิดที่มีการยืนยันการเปลี่ยนแปลงไปของโครโมโซมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาเป็นเกณฑ์ ได้แก่ เสาวรส (Rego *et al*., 2011) พุทราจีน (Gu *et al*., 2005) Japanese barberry (Lehrer *et al*., 2008) *Echinacea purpurea* L. (Nilanthi *et al*., 2009) อึ้งคี้ (Chen and Gao, 2007) เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นของอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกระชายดำในหลอดทดลอง
2. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการชักนำเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสของกระชายดำ
3. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน ระยะเวลาที่จุ่มแช่ต่ออัตราการรอดชีวิต และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกระชายดำในหลอดทดลอง
4. เพื่อศึกษาผลของโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาของกระชายดำในหลอดทดลอง

บทที่ 2

การทดลองที่ 1
การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง
Plant Regeneration of Black Galingale derived from Shoot Culture

บทนำ

กระชายดำ (Black galingal จัดเป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker กระชายดำจัดเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 20–30 เซนติเมตร เนื้อภายในเหง้ามีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม เนื้อใบมีสีม่วงเข้มเกือบดำ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับในระนาบเดียวกัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) ในประเทศไทยมีการปลูกกระจายอยู่ทั่วประเทศ เช่น จังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน กาญจนบุรี ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559) แต่นิยมปลูกกระชายดำมากที่สุดในเขตอำเภอนาแห้ว อำเภอด่านซ้าย และอำเภอภูเรือของจังหวัดเลย (สถาบันแพทย์แผนไทย, 2553) ปัจจุบันกระชายดำเป็นพืชที่ได้รับความนิยมเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากมีสรรพคุณช่วยต้านอนุมูลอิสระ (เสริมสุขและไชยยง, 2547) รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate *et al*., 2005) ต้านการอักเสบ (Sae-wong *et al*., 2009) เนื่องจากในเหง้ากระชายดำมีสาระสำคัญหลายชนิด เช่น borneol sylvestrene 4′,5,7,-trimethoxylflavone (TMF) 5,7-dimethoxyflavone (DMF) (Mekjaruskul *et al*., 2015) จากความนิยมให้เพิ่มสูงขึ้นอาจทำให้เกิดการผลิตเหง้ากระชายดำไม่ทันตามความต้องการของผู้บริโภคและอุตสาหกรรมที่ผลิตสินค้าเกี่ยวกับกระชายดำ เนื่องจากการขยายพันธุ์กระชายดำโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เหง้าแก่ในปริมาณมากประมาณ 200 - 250 กิโลกรัมต่อไร่ และการปลูกกระชายดำในแต่ละครั้งต้องใช้เวลา 8 - 12 เดือน ถึงจะได้ผลผลิตต่อรอบ นอกจากนี้การปลูกกระชายดำยังเกิดโรคเน่าที่เหง้าซึ่งมีเชื้อสาเหตุจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* อาจทำให้กระชายดำตายในที่สุด จึงต้องหาวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพเพื่อขยายพันธุ์กระชายดำ โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถนำอวัยวะของพืชมาใช้ได้เกือบทุกส่วน เช่น ตา ข้อ ปลายยอด ใบ และเมล็ด เป็นต้น และวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างกว้างขวางและแพร่หลาย เพราะสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น (สมปอง, 2539)

ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงศึกษาการขยายพันธุ์กระชายดำ โดยการนำหน่องอกของกระชายดำมาผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นกระชายดำที่ปลอดเชื้อจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานหรือชิ้นส่วนเริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์หรืออนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลองของกระชายดำต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

นำหน่องอกของกระชายดำ ขนาด 4 เซนติเมตร อายุ 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.1) ทำให้ปลอดเชื้อโดยให้น้ำไหลผ่าน 1 ชั่วโมง แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นจุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ต่อมาจุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง หลังจากผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว นำมาตัดแต่งให้มีความยาว 1.0 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 6 สัปดาห์ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ จากนั้นนำยอดที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 2.2)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะหน่องอกของกระชายดำนอกหลอดทดลองที่ใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ในหลอดทดลอง (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะยอดของกระชายดำจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังย้ายเลี้ยงทุก ๆ 6 สัปดาห์ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของ BAP ต่อการชักนำยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง

นำยอดกระชายดำในหลอดทดลอง อายุ 6 สัปดาห์ ทำการแยกยอดรวมออกเป็นยอดเดี่ยวๆ แล้วตัดชิ้นส่วนยอดออกให้มีความสูง 1.0 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ความเข้มข้นวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดยอด จำนวนยอดรวม และความสูงยอด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) แต่ละทรีตเมนท์ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

2. ศึกษาชนิดของอาหารต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง

นำต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 6 สัปดาห์ ตัดส่วนยอดและรากออก ให้เหลือเฉพาะส่วนของยอดอ่อน มีความยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพของอาหารแข็ง (ความเข้มข้นวุ้น 0.75%) อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (ความเข้มข้นวุ้น 0.375%) และอาหารเหลว (ไม่เติมผงวุ้น) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกบันทึกอัตราการเกิดยอด จำนวนยอดรวม และความสูงยอด วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT โดยแต่ละชนิดของอาหารทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

3. ศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการชักนำรากของกระชายดำในหลอดทดลอง

นำยอดที่ปลอดเชื้อของกระชายดำ ขนาด 3 - 4 เซนติเมตร อายุ 6 สัปดาห์ จากการศึกษาที่ 2 ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุด วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง (full MS 1/2MS 1/3MS และ 1/4MS) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT โดยแต่ละชนิดของอาหารทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

4. การอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก

นำต้นกล้ากระชายดำในหลอดทดลองความสูง 5 เซนติเมตร อายุ 3 สัปดาห์ จากการศึกษาที่ 3 ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุด ออกมาจากขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นล้างน้ำทำความสะอาดวุ้นออกให้หมด นำต้นกล้ากระชายดำส่วนรากจุ่มแช่ในสารละลาย Propidone-iodine (เบตาดีน) ผึ่งลมต้นกล้ากระชายดำพอแห้งหมาด ๆ และนำต้นกล้ากระชายดำ 50 ต้น เพาะลงในถาดหลุมเพาะต้นกล้าขนาด 32 หลุม ที่บรรจุ ดินปลูก แกลบเผา ขุยมะพร้าว และพีทมอส อัตราส่วน 2:1:1:1 จากนั้นรดน้ำให้ชุ่ม ครอบด้วยขวดแก้วเพื่อปรับสภาพแวดล้อมให้กระชายดำค่อย ๆ ปรับตัว และวางเลี้ยงภายในโรงเรือนที่มีการพลางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิต

จากนั้นนำต้นกล้ากระชายดำในหลอดทดลองความสูง 5 เซนติเมตร และหน่อนอกหลอดทดลองความสูง 5 เซนติเมตร ปลูกเปรียบเทียบกันภายใต้สภาพในโรงเรือน โดยปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว กระถางละ 1 ต้น ดูแลรักษาต้นกล้ากระชายดำด้วยการรดน้ำ ใส่ปุ๋ย และกำจัดวัชพืช หลังจากอนุบาลเป็นเวลา 9 สัปดาห์ สังเกตการเจริญเติบโตของกระชายดำ โดยบันทึกอัตราการแตกหน่อ จำนวนหน่อ จำนวนใบ และความสูงต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 กระถาง ๆ ละ 1 ต้น

ผลการศึกษา

1. ผลของความเข้มข้นของ BAP ต่อการชักนำยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง

จากการศึกษา พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ BAP ความเข้มข้น 1 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอด 85 65 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของจำนวนยอด พบว่า BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต รองลงมาคือ BAP ความเข้มข้น 2 4 5 1 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 3.00 2.93 2.85 2.38 และ 1.50 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ สำหรับความสูงยอดพบว่า BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงยอดสูงสุด 5.34 เซนติเมตร รองลงมาคือ BAP ความเข้มข้น 1 3 0 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงยอด 4.81 4.78 4.60 4.31 และ 3.57 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.1 ภาพที่ 2.3)

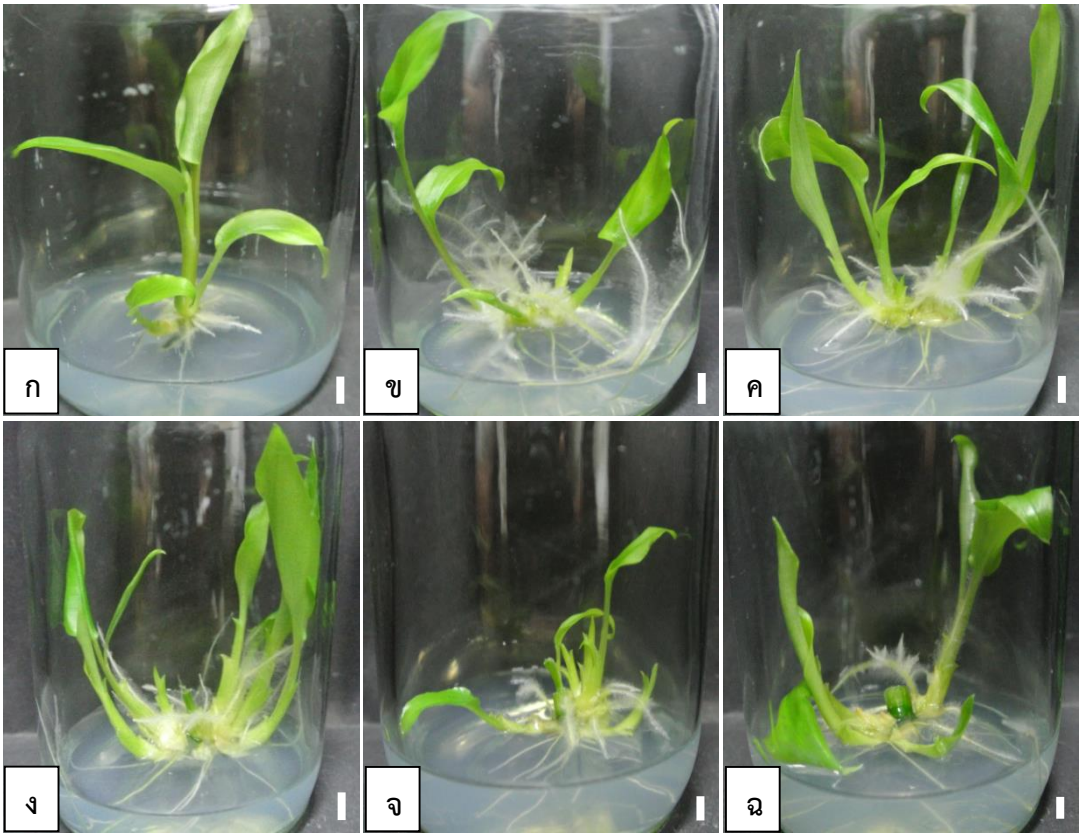
ตารางที่ 2.1 ผลของความเข้มข้นของ BAP ต่อการชักนำยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อัตราการเกิดยอด (%)	จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วน)	ความสูงยอด (เซนติเมตร)
0	80	1.50b	4.60
1	85	2.38ab	4.81
2	95	3.00a	5.34
3	95	3.75a	4.76
4	65	2.93ab	4.31
5	50	2.85ab	3.57
F-test		**	ns
C.V. (%)		29.75	31.22

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของยอดที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก: BAP ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข: BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค: BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง: BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ: BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ: BAP ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ผลของชนิดอาหารต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของกระชายดำบนอาหารชนิดต่างๆ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารเหลวให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง ให้อัตราการเกิดยอด 95 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของจำนวนยอด อาหารเหลวให้จำนวนยอดสูงสุด 6.3 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง รองลงมาคือ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง ให้จำนวนยอด 3.72 และ 3.23 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ สำหรับความสูงยอด พบว่า อาหารแข็งให้ความสูงยอดสูงสุด 4.33 เซนติเมตร รองลงมาคือ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว ให้ความยาวยอด 4.21 และ 3.94 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชนิดอาหาร (ตารางที่ 2.2 ภาพที่ 2.4)

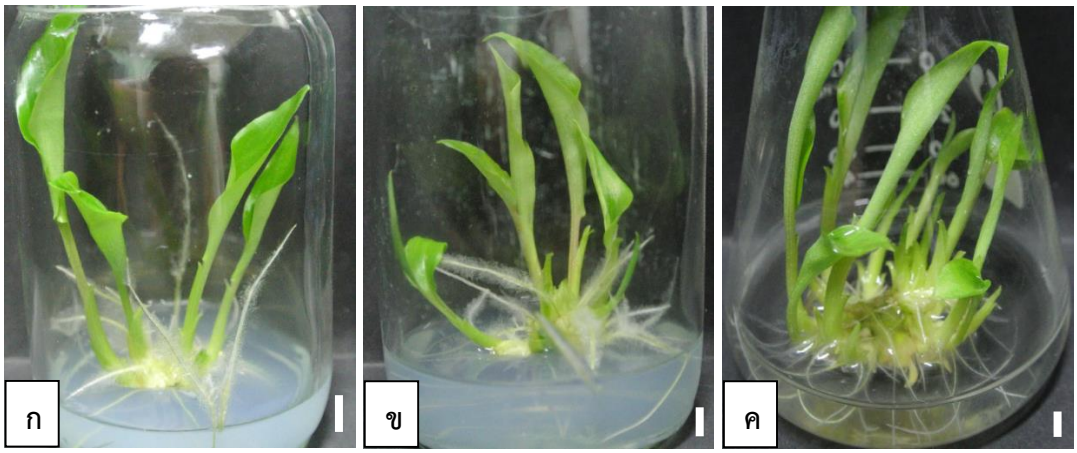
ตารางที่ 2.2 ผลของชนิดอาหารต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชนิดอาหาร	อัตราการเกิดยอด (%)	จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วน)	ความสูงยอด (เซนติเมตร)
อาหารแข็ง	95	3.23b	4.33
อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว	95	3.72b	4.21
อาหารเหลว	100	6.30a	3.94
F-test		**	ns
C.V. (%)		30.07	19.20

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของยอดที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)
ก: อาหารแข็ง
ข: อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว
ค: อาหารเหลว

3. ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการชักนำรากของกระชายดำในหลอดทดลอง

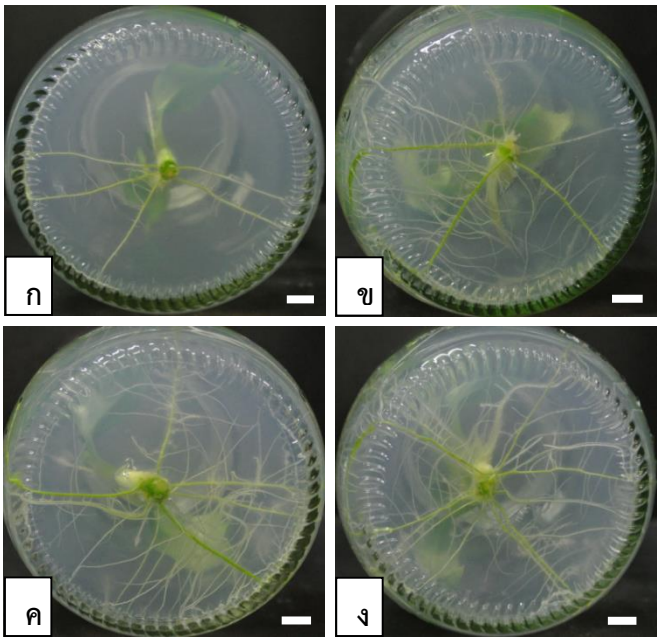
จากการศึกษาการชักนำรากของกระชายดำในหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร full MS 1/2MS 1/3MS และ 1/4MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของจำนวนราก พบว่า อาหาร 1/4 MS ให้จำนวนรากสูงสุด 7.35 รากต่อต้น แตกต่างทางสถิติกับอาหาร full MS รองลงมาคือ อาหาร 1/3MS 1/2MS และ full MS ให้จำนวนราก 6.60 5.80 และ 4.40 รากต่อต้น ตามลำดับ สำหรับความยาวราก พบว่า อาหาร 1/4MS ให้ความยาวรากสูงสุด 7.25 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับอาหาร 1/2MS รองลงมาคือ 1/3MS full MS และ 1/2MS ให้ความยาวราก 7.22 6.02 และ 5.58 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2.3 ภาพที่ 2.5)

ตารางที่ 2.3 ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการชักนำรากของกระชายดำในหลอดทดลองหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ความเข้มข้นธาตุอาหาร	อัตราการเกิดราก (%)	จำนวนราก (รากต่อต้น)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
full MS	100	4.40b	6.02ab
1/2MS	100	5.80ab	5.58b
1/3MS	100	6.60a	7.22a
1/4MS	100	7.35a	7.25a
F-test		**	**
C.V. (%)		17.21	9.97

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของรากที่ได้จากการวางเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่ลดและไม่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหาร และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก: full MS

ข: 1/2MS

ค: 1/3MS

ง: 1/4MS

4. ผลการอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก

จากการอนุบาลต้นกล้ากระชายดำในหลอดทดลองลงถาดหลุมเพาะต้นกล้าที่มีส่วนผสมของดินปลูก แกลบเผา ขุยมะพร้าว และพีทมอส อัตราส่วน 2:1:1:1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า จากการปลูกต้นกล้ากระชายดำทั้งหมด 50 ต้น มีต้นกล้ากระชายดำที่รอดชีวิตหลังย้ายอนุบาลจำนวน 40 ต้น คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.6)

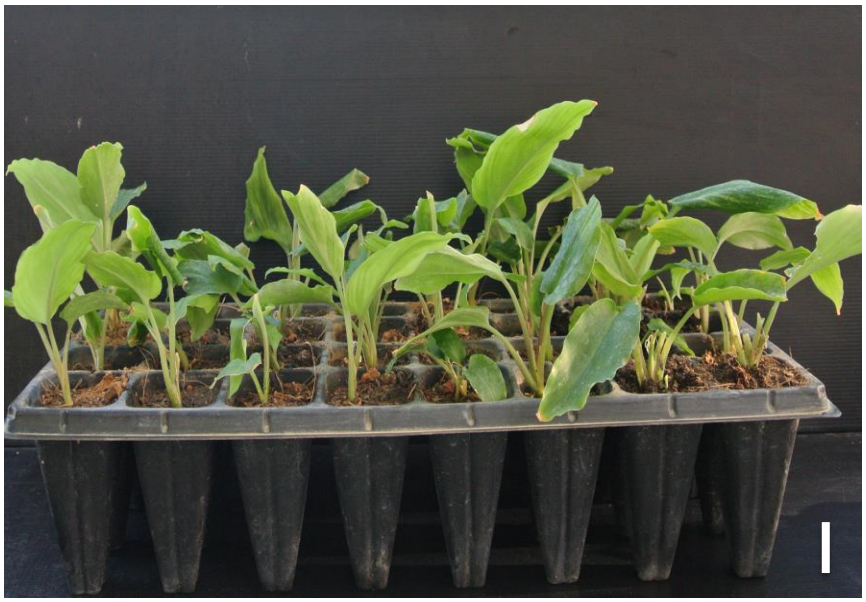
จากการอนุบาลต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากหลอดทดลอง และหน่อนอกหลอดทดลอง หลังจากย้ายลงอนุบาลเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากในหลอดทดลองสามารถแตกกอใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหน่อสูงสุด 3.67 หน่อต่อกอ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับหน่อนอกหลอดทดลอง จำนวนใบสูงสุด 7 ใบต่อกอ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับหน่อนอกหลอดทดลอง และมีความสูงต้นสูงสุด 28 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของหน่อนอกหลอดทดลอง (ตารางที่ 2.4 ภาพที่ 2.7)

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากหลอดทดลอง และหน่องอกจากธรรมชาติ หลังอนุบาลลงดินปลูกเป็นเวลา 9 สัปดาห์

แหล่งของชิ้นส่วน	อัตราการแตกหน่อ (%)	จำนวนหน่อ (หน่อต่อกอ)	จำนวนใบ (ใบต่อกอ)	ความสูง (เซนติเมตร)
หน่อนอกหลอดทดลอง	100	3.00	1.67	18.67
ต้นกล้าจากหลอดทดลอง	100	3.67	7.00	28.00
T-test		ns	*	ns
C.V. (%)		24.49	29.79	17.75

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญจากการเปรียบเทียบโดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2.6 การรอดชีวิตของต้นกล้ากระชายดำในหลอดทดลองหลังอนุบาลลงถาดเพาะชำ (ดินปลูก แกลบเผา ขุยมะพร้าว และพีทมอส อัตราส่วน 2:1:1:1) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 5 เซนติเมตร)

ภาพที่ 2.7 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำจากแหล่งของชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน หลังจากออกปลูก เป็นเวลา 9 สัปดาห์ (บาร์ = 10 เซนติเมตร)
ก: หน่อนอกหลอดทดลอง
ข: ต้นกล้าจากหลอดทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำยอดกระชายดำเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดของอาหาร เป็นต้น โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน สามารถชักนำการเกิดยอดได้เป็นอย่างดี จากการศึกษา พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน ให้ความยาวยอด 4.76 เซนติเมตร เช่นเดียวกับการทดลองของ Shukla และคณะ (2007) ที่ศึกษาการนำชิ้นส่วนปลายยอดของอาวแดง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.87 ยอดต่อชิ้นส่วน อย่างไรก็ตาม Abdelmageed และคณะ (2011) พบว่า การขยายพันธุ์ดาหลาในหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนตาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.67 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ Sharma และคณะ (2013) ได้ศึกษาการนำชิ้นส่วนปลายยอดของขมิ้นชันมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 88.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน เนื่องจาก BA เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารที่เติมไซโตไคนินในอัตราความเข้มข้นสูง จึงช่วยส่งเสริมการเกิดยอดแขนงจากตาด้านข้างในอัตราที่สูง นอกจากนี้ BA มีโมเลกุลขนาดเล็ก อยู่รวมกับอาหารได้อย่างดี จึงทำให้พืชดูดใช้ได้เป็นอย่างดีเมื่อเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มเดียวกัน และยังสลายตัวได้ยากเมื่อต้องอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม จึงเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวสำคัญที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ชักนำยอดในพืชชนิดต่าง ๆ (Rahman *et al.,* 2006) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ BA ที่ใช้จะต้องขึ้นอยู่กับพันธุ์ ชนิดพืช และชนิดของชิ้นส่วนในการวางเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่มีการตอบสนองต่อ BA ได้ยาก เนื่องจากพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อความเข้มข้นของ BA ที่แตกต่างกัน

สำหรับการเพิ่มปริมาณยอดรวมเป็นขั้นตอนต่อเนื่องจากการชักนำยอด โดยการนำชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อมาย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ที่มีส่วนประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และวุ้น เป็นต้น นอกจากนี้ชนิดของอาหาร เช่น อาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว อาหารเหลว มีส่วนช่วยให้พืชดูดใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพิ่มปริมาณยอดรวมได้จำนวนมากตามความต้องการ จากการศึกษาพบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในอาหารเหลว ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 6.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ให้ความยาวยอด 3.94 เซนติเมตร อย่างไรก็ตาม Salvi และคณะ (2002) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของขมิ้นชัน ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 4.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 10.0 เซนติเมตร จากการรายงานของ Stanly และ Keng (2007) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของขมิ้นอ้อย และกระทือควาย ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 6.1 และ 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขมิ้นอ้อย และกระทือควาย ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Chong และคณะ (2012) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของขมิ้นอ้อย ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ หทัยรัตน์ และคณะ (2555) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอ่อนของกระเจียวส้ม ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ยอดต่อชิ้นส่วน ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น เนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสัมผัสอาหารทุกส่วน ทำให้มีการเจริญที่ดี และค่อนข้างเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคู่ไปด้วย เพราะการเขย่าจะช่วยเพิ่มออกซิเจนในอาหารส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวมักเจริญเติบโตได้ช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (นิตยา และสุภาพร, 2559) นอกจากนี้การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับอาหารเหลวทำให้พืชมีการเพิ่มปริมาณได้จำนวนมาก เนื่องจากสามารถดูดใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ จึงส่งผลให้พืชนำสารควบคุมการเจริญเติบโตไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยอดได้อย่างมีประสิทธิภาพตามการรายงานข้างต้น

การชักนำรากเป็นขั้นตอนการเตรียมความพร้อมให้พืชก่อนอนุบาลลงดินปลูก เพื่อให้พืชสามารถปรับตัว และอยู่รอดในระหว่างการอนุบาลภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ โดยการชักนำรากในหลอดทดลองนิยมใช้วิธีการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง นอกเหนือจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญในการเกิดกระบวนการ Rhizogenesis เนื่องจากเมื่อลดความเข้มข้นของธาตุอาหาร อาจทำให้พืชมีอาการเครียด พืชจึงปรับตัวโดยการสร้างรากออกมาเพื่อหาอาหารอย่างรวดเร็ว ซึ่งการใช้วิธีนี้ยังเป็นการช่วยให้พืชปรับตัวเข้ากับสภาพแห้งแล้งในธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้จะต้องขึ้นอยู่กับพันธุ์และชนิดของพืชนั้น ๆ ว่าเกิดรากยากหรือไม่อีกด้วย เพราะพืชแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อการชักนำรากได้แตกต่างกัน ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณของยอดของกระชายดำส่งผลให้ยอดที่เพิ่มปริมาณได้ไม่สามารถเกิดรากได้ทุกยอด ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาการชักนำรากโดยคำนึงถึงความเข้มข้นของสูตรอาหาร จากการรายงานของ Das และคณะ (2013) ที่พบว่า การชักนำรากในหลอดทดลองของ *Z. Moran* และกระทือ โดยใช้ยอดที่ปลอดเชื้อ ขนาด 3 - 4 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 90.0 และ 86.6 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากสูงสุด 5.21 และ 7.12 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากสูงสุด 5.41 และ 5.51 เซนติเมตร ใน *Z. moran* และกระทือ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Sharmin และคณะ (2013) ศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลองของว่านนางคำ โดยใช้ยอดที่ปลอดเชื้อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้อัตราการเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากสูงสุด

9.40 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากสูงสุด 3.52 เซนติเมตร นอกจากนี้ Senarath และคณะ (2017) ศึกษาการชักนำรากในหลอดทดลองของเปราะหอม โดยใช้ยอดที่ปลอดเชื้อขนาด 3 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนรากสูงสุด 6 รากต่อชิ้นส่วน และความยาวรากสูงสุด 3.98 เซนติเมตร สำหรับในกระชายดำการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง สามารถชักนำการเกิดรากได้ในปริมาณมาก โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมด้วย แต่สำหรับการชักนำรากในพืชชนิดอื่น ๆ ควรเลือกวิธีการที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ชนิด เนื่องจากพืชแต่ละชนิดสามารถเกิดรากได้โดยวิธีการที่แตกต่างกัน ในพืชที่สามารถเกิดรากได้ง่ายอาจใช้วิธีการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงก็เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดราก สำหรับในพืชที่เกิดรากยากอาจต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมด้วย เพื่อช่วยกระตุ้นให้พืชมีการสร้างรากได้ดี และเมื่อย้ายอนุบาลออกปลูกสามารถทำให้พืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

ขั้นตอนสุดท้ายของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ต้นกล้าสามารถมีชีวิตรอดและมีการเจริญพัฒนาในสภาพธรรมชาติได้ จึงนับว่าประสบความสำเร็จ ซึ่งการอนุบาลต้นกล้ากระชายดำในหลอดทดลองลงดินปลูกจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องล้างวุ้นออก จากนั้นจุ่มแช่ในสารละลายเบตาดีนเพื่อป้องกันจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อาจเป็นเชื้อสาเหตุของโรคต่าง ๆ และอาจทำให้ต้นกระชายดำตายในที่สุด รวมไปถึงการปรับสภาพแวดล้อมแบบค่อยเป็นค่อยไป เพื่อไม่ให้ต้นกระชายดำสูญเสียน้ำและเหี่ยวตายในที่สุด สำหรับกระชายดำเป็นพืชที่ต้องการน้ำในปริมาณที่เหมาะสม ดังนั้นการให้น้ำก็ควรให้อย่างระมัดระวังเนื่องจากกระชายดำเป็นพืชหัว เมื่อชื้นมากเกินไปอาจทำให้หัวเน่า และต้นตายในที่สุด ซึ่งการเลือกวัสดุปลูก ควรเลือกวัสดุที่หาได้ง่าย ราคาถูก และเก็บความชื้นได้ดี จากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของกระชายดำในหลอดทดลองหลังอนุบาลลงดินปลูก ที่มีส่วนผสมของดินปลูก แกลบเผา ขุยมะพร้าว และพีทมอส อัตราส่วน 2:1:1:1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นกระชายดำในหลอดทดลองมีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาเห็นได้ว่าต้นกระชายดำที่ได้จากหลอดทดลองมีอัตราการรอดสูง เมื่ออยู่ในภาพแวดล้อมที่ค่อย ๆ เปลี่ยนแปลง ลักษณะต้นแข็งแรง ใบเขียว และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับ Goyal และคณะ (2010) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของขมิ้นชันลงในกระถางที่บรรจุดินสวน และทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อัตราส่วน 1:1 วางเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิตถึง 93 เปอร์เซ็นต์ Zhang และคณะ (2011) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของ *Curcuma kwangsiensis* ลงในกระถางที่บรรจุดิน ขุยมะพร้าว และเพอไลท์ เป็นวัสดุปลูก อัตราส่วน 1:1:1 วางเลี้ยงในเรือนกระจก เป็นเวลา 2 เดือน มีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ Yunus และคณะ (2012) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของดาหลาลงในกระถางที่บรรจุ ดิน ทราย และพีทมอส อัตราส่วน 1:1:1 ไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิตถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์ Abbas และคณะ (2011) พบว่า หลังการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์ของขิงลงในกระถางที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุปลูกเพียงอย่างเดียว ไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอัตรารอดชีวิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการอนุบาลลงดินปลูกสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ แสง และอุณหภูมิ ถ้าเราย้ายอนุบาลลงดินปลูกเหมือนพืชทั่วไปอาจทำให้ต้นกล้าตายได้ ดังนั้นในช่วงแรกของการอนุบาลลงดินปลูกควรใช้ขวดแก้วหรือขวด

พลาสติกครอบต้นกล้าไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เนื่องจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความชื้นสูงมาก จึงต้องมีการควบคุมความชื้น และควรมีการพลางแสงให้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้พืชมีการปรับตัวแบบค่อยเป็นค่อยไป สามารถรอดชีวิต และเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาพภายนอกหลอดทดลอง

สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของพืชที่ขยายพันธุ์ได้จากหลอดทดลองและพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบปกติ มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทำให้ทราบถึงความสามารถในการเจริญเติบโตและการปรับตัวของพืชในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยวิธีปกติ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากหลอดทดลอง และหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอกจะเห็นได้ว่ากระชายดำที่ได้จากในหลอดทดลองมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า เนื่องจากกระชายดำในหลอดทดลองมียอดและรากที่สมบูรณ์พร้อมที่จะดูดน้ำและธาตุอาหารเพื่อการเจริญเติบโตต่อไป แต่หน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอกเมื่อโดนตัดออกมาจากเหง้าอาจทำให้ไม่ได้รับอาหารสะสมจากเหง้า จึงทำให้มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า นอกจากนี้กระชายดำที่ได้จากในหลอดทดลองยังมีการสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินถึงแม้จะไม่ได้อยู่ในหลอดทดลอง ทำให้กระชายดำสามารถนำสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สะสมไว้มาใช้ในการเพิ่มจำนวนหน่อได้ดีกว่าหน่อนอกหลอดทดลองถึงแม้จะอยู่ในสภาพธรรมชาติแล้วก็ตาม โดย Salvi และคณะ (2002) รายงานว่าต้นกล้าของขมิ้นชันที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง ให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ จำนวนใบ และความสูงต้นดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชันที่ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า โดยให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ 6.5 หน่อต่อต้น จำนวนใบ 11.9 ใบ และความสูง 92.2 เซนติเมตร หลังจากย้ายลงสู่แปลงปลูกเป็นเวลา 32 สัปดาห์ นอกจากนี้ Singh และคณะ (2013) พบว่า ขมิ้นชันพันธุ์ Lakadong ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลองให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ จำนวนใบ และความสูงดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชันพันธุ์ Lakadong ที่ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า โดยให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ 6.45 หน่อต่อต้น จำนวนใบ 12.30 ใบ และความสูง 94.75 เซนติเมตร หลังจากย้ายลงสู่แปลงปลูกเป็นเวลา 52 สัปดาห์ จากการศึกษาสรุปได้ว่า พืชต้นใหม่ที่ได้จากหลอดทดลองให้การเจริญเติบโตที่ดีกว่าหน่องอกนอกหลอดทดลอง แต่ต้องคำนึงถึงความสม่ำเสมอทั้งอายุ และขนาดของต้นพืชที่นำมาศึกษาด้วย อีกทั้งในการศึกษานี้เก็บผลเพียงอายุ 9 สัปดาห์ หากมีการบันทึกผลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง หรือปริมาณสารสำคัญในเหง้าของกระชายดำก็จะทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

การทดลองที่ 2
การชักนำแคลลัสและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากยอดของกระชายดำ
Callus Induction and Plant Regeneration from Shoot of Black Galingale

บทนำ

กระชายดำ (Black galingal) จัดเป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker ในประเทศไทยมีการปลูกกระจายอยู่ทั่วประเทศ เช่น จังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน กาญจนบุรี ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559) แต่นิยมปลูกกระชายดำมากที่สุดในเขตอำเภอนาแห้ว อำเภอด่านซ้าย และอำเภอภูเรือของจังหวัดเลย (สถาบันแพทย์แผนไทย, 2553) ปัจจุบันกระชายดำเป็นพืชที่ได้รับความนิยมเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากมีสรรพคุณช่วยต้านอนุมูลอิสระ (เสริมสุข และไชยยง, 2547) รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate *et al*., 2005) ต้านการอักเสบ (Sae-wong *et al*., 2009) เนื่องจากในเหง้ากระชายดำมีสาระสำคัญหลายชนิด เช่น Borrneol Sylvestrene 4′,5,7,-trimethoxylflavone (TMF) 5,7-dimethoxyflavone (DMF) (Mekjaruskul *et al*., 2015) สำหรับในกระชายดำนอกจากการขยายพันธุ์โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงอวัยวะหรือเนื้อเยื่อแล้วสามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้นโดยตรงแล้วนั้น ยังสามารถขยายพันธุ์โดยชักนำการเกิดแคลลัสโดยผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเทคนิคในการขยายพันธุ์โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งแคลลัสที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหมือนแคลลัสที่ได้จากธรรมชาติที่พืชสร้างขึ้นในขณะที่เกิดบาดแผล แต่มีความแตกต่างทางกระบวนการเมตาบอลิซึมโครงสร้างเซลล์ การเจริญเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (บุญยืน, 2547) แคลลัส คือ เซลล์ที่อยู่กันเป็นกลุ่มประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมาเพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในมีแวคิลโอลจำนวนมาก ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง พัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ (รังสฤษดิ์, 2540) สามารถแบ่งแคลลัสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Compact callus เป็นแคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่น และ Frible callus เป็นแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (สมปอง, 2539) การชักนำแคลลัสสามารถใช้ชิ้นส่วนพืชที่มีอายุน้อย เช่น ใบอ่อน คัพภะ ปลายยอด ใบเลี้ยง ดอก เป็นต้น ทั้งนี้การชักนำแคลลัสนอกจากการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม ยังต้องคำนึงถึงสารควบคุมการเจริญเติบโต ธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมที่วางเลี้ยงด้วยเช่นกัน เพื่อให้สามารถชักนำแคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และประสบผลสำเร็จมากที่สุด สำหรับประโยชน์ของการชักนำแคลลัสนอกจากใช้ในการขยายพันธุ์แล้วนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นอีกหลายด้าน เช่น การนำมาใช้ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์ การแยกโปรโตพลาสต์ การปรับปรุงพันธุ์ การสร้างสารทุติยภูมิ และการรักษาพันธุกรรม เป็นต้น (รังสฤษดิ์, 2540)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงต้องการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส เพิ่มปริมาณแคลลัส และพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ เพื่อให้ได้กระชายดำที่มีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรม ปริมาณมาก ในเวลาอันรวดเร็ว

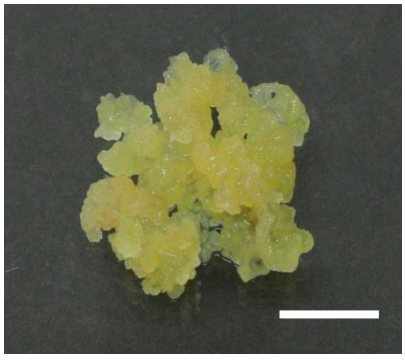
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

การศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนยอดอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.8) ที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที จากนั้นนำยอดมาตัดให้มีขนาด 1.0 เซนติเมตร และผ่าครึ่งตามแนวยาว หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้ไปวางเลี้ยงบนสูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัส

ภาพที่ 2.8 ลักษณะยอดของกระชายดำจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)
ก: ลักษณะยอดก่อนผ่า
ข: ลักษณะยอดหลังผ่า

นำแคลลัสจากการทดลองที่ 1 ที่ได้จากสูตรอาหารที่สามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 150 มิลลิกรัม ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกระชายดำ โดยแคลลัสที่เลือกใช้ในการทดลองจะเป็นแคลลัสสีเหลือง ที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 ลักษณะแคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ ใช้ในการทดลองที่ 2 และ 3 (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. **ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดกระชายดำในหลอดทดลอง**

นำชิ้นส่วนยอดกระชายดำอายุ 6 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาด 1 เซนติเมตร และผ่าครึ่งตามแนวยาวให้ได้ 2 ชิ้นส่วนใน 1 ยอด วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ความเข้มข้นวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดแคลลัส ขนาด และลักษณะแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

2. **ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสกระชายดำในหลอดทดลอง**

ย้ายแคลลัสจากการทดลองที่ 1 ปริมาณ 150 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ความเข้มข้นวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเพิ่มแคลลัส น้ำหนัก และลักษณะแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

3. **ศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสกระชายดำในหลอดทดลอง**

ย้ายแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ จากการทดลองที่ 2 วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ระดับต่าง ๆ (full MS 1/2MS 1/3MS และ 1/4MS) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกอัตราการเกิดยอด อัตราการเกิดราก อัตราการเกิดจุดสีเขียว และจำนวนจุดสีเขียว วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT โดยแต่ละชนิดของอาหารทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

ผลการศึกษา

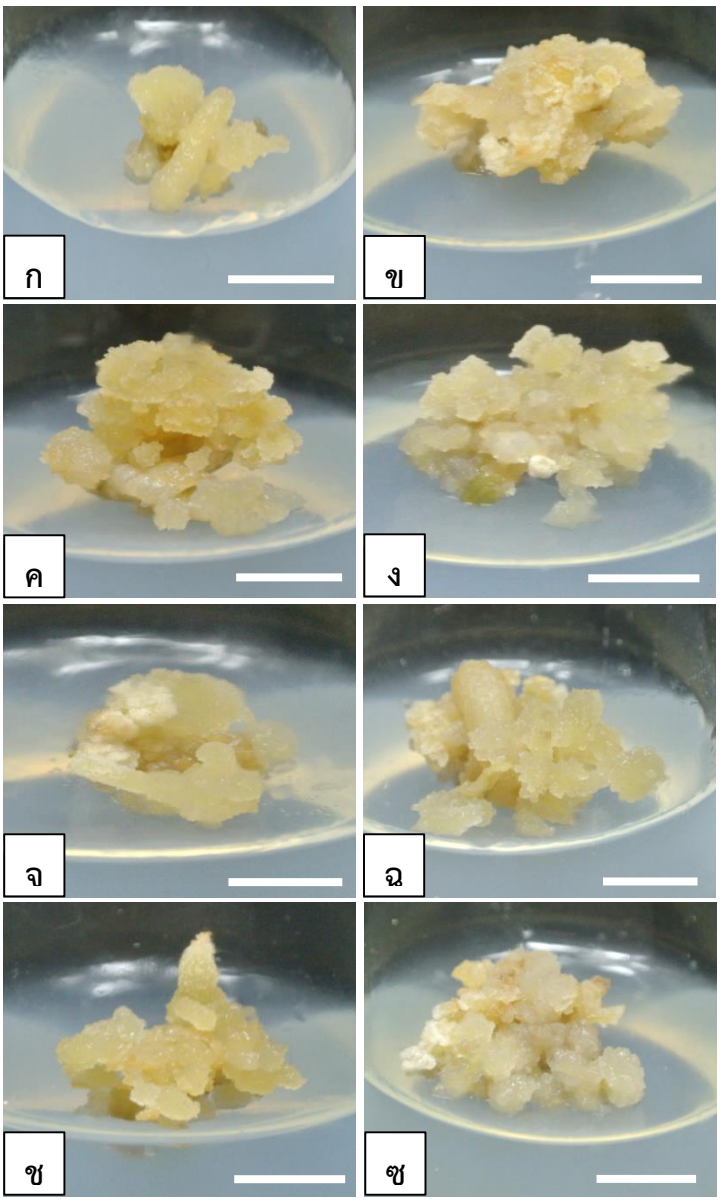
1. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดกระชายดำในหลอดทดลอง

จากการศึกษา พบว่า การนำชิ้นส่วนยอดกระชายดำผ่าครึ่งตามแนวยาว ขนาด 1.0 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 45 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดแคลลัสสูงสุด 1.32 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับสูตรอาหารอื่น ๆ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้ขนาดแคลลัส 1.06 0.74 และ 0.70 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแคลลัสที่ได้มีสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ (ตารางที่ 2.5 ภาพที่ 2.10)

ตารางที่ 2.5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D และ NAA) ต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดผ่าครึ่งตามแนวยาว ขนาด 1.0 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)	ลักษณะแคลลัส
2,4-D	NAA			
0.2	0.2	5	0.10cd	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.2	0.5	0	0.00d	ไม่เกิดแคลลัส
0.2	1.0	15	0.70abcd	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.5	0.2	45	1.32a	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.5	0.5	25	1.06ab	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.5	1.0	0	0.00d	ไม่เกิดแคลลัส
1.0	0.2	0	0.00d	ไม่เกิดแคลลัส
1.0	0.5	10	0.26cd	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
1.0	1.0	10	0.50bcd	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
2.0	0.2	20	0.40bcd	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
2.0	0.5	25	0.74abc	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
2.0	1.0	10	0.00d	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
F-test			**	
C.V. (%)			89.55	

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.10 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการชักนำบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)
ก: 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ข: 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค: 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ง: 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
จ: 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ฉ: 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
ช: 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซ: 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสกระชายดำในหลอดทดลอง

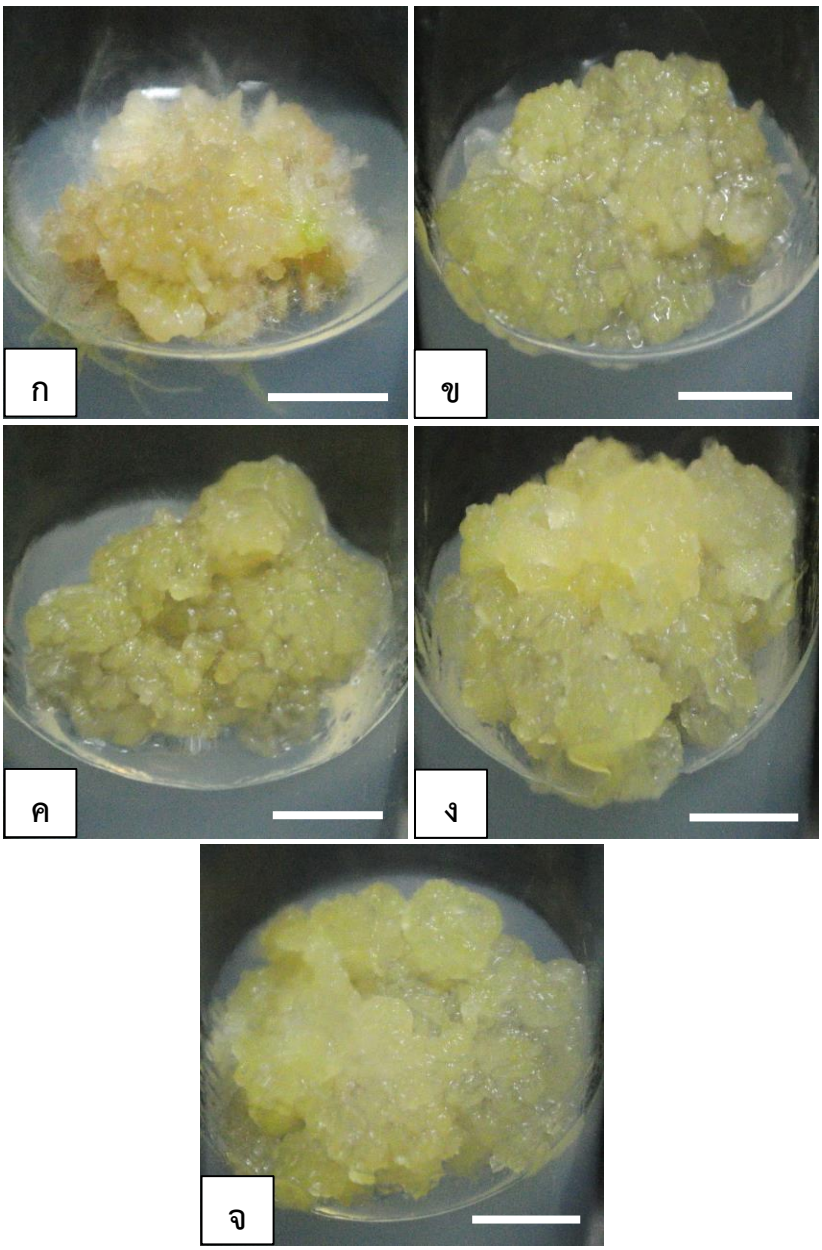
จากการศึกษาการนำแคลลัสกระชายดำจากสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 150 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้น ให้อัตราการเพิ่มแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้อัตราการเพิ่มแคลลัส 80 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของน้ำหนักสดแคลลัส พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด 1,127 มิลลิกรัม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้น้ำหนักสดแคลลัส 1,025 มิลลิกรัม รองลงมาคือ อาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้น้ำหนักแคลลัส 956 872 และ 754 ตามลำดับ แคลลัสที่ได้มีสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ.ในขณะที่การไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสที่ได้จะมีราก (ตารางที่ 2.6 ภาพที่ 2.11)

ตารางที่ 2.6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D และ NAA) ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสกระชายดำหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		การเพิ่มแคลลัส (%)	น้ำหนักสดแคลลัส (มิลลิกรัม)	ลักษณะแคลลัส
2,4-D	NAA			
0	0	80	754c	แคลลัสมีราก
0.1	0.1	100	872bc	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.1	0.5	100	956abc	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.2	0.1	100	1,127a	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
0.2	0.5	100	1,025ab	แคลลัสสีเหลือง เกาะกันอย่างหลวม ๆ
F-test			**	
C.V. (%)			13.76	

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.11 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)
ก: ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
ข: 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ค: 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ง: 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
จ: 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

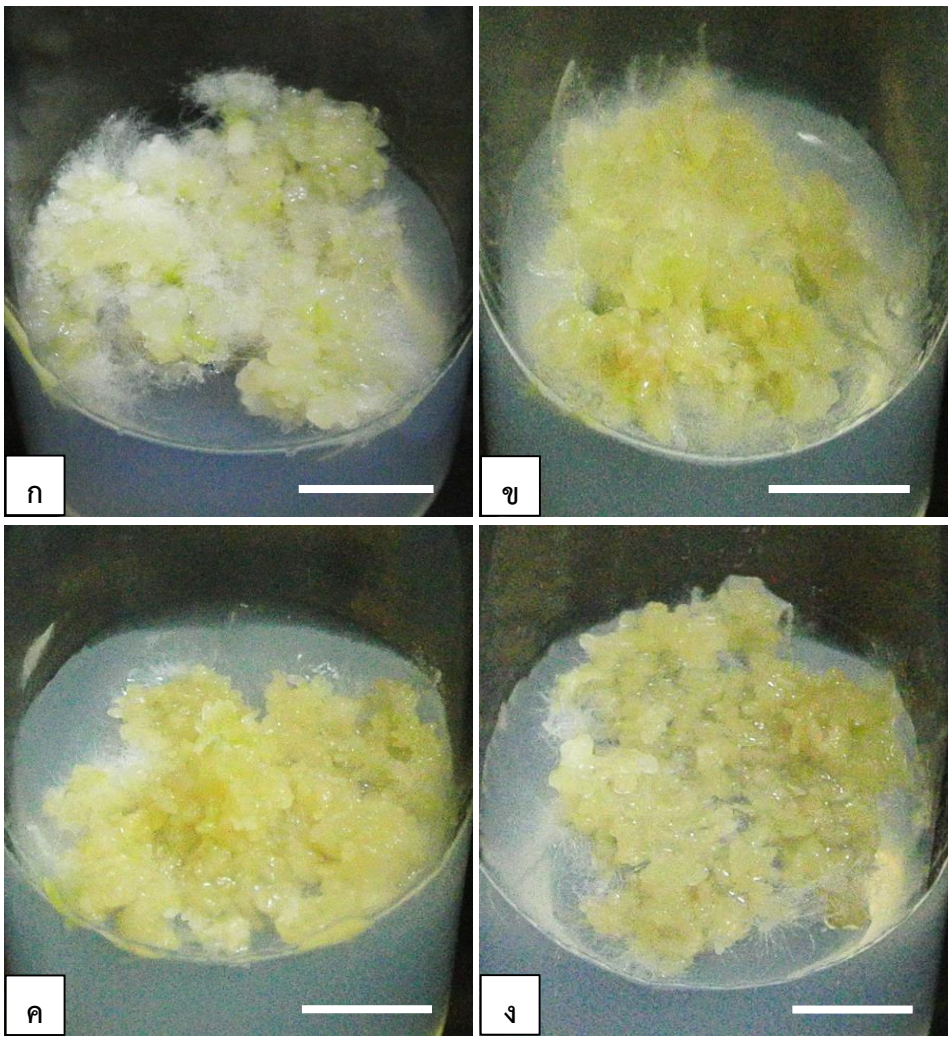
3. ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสกระชายดำในหลอดทดลอง

จากการนำแคลลัสกระชายดำจากสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 150 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหาร พบว่า อาหารสูตร full MS 1/2MS 1/3MS และ 1/4MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำยอดจากแคลลัสได้ แต่ทุกความเข้มข้นของสูตรอาหาร ให้อัตราการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของอัตราการเกิดจุดสีเขียว พบว่า อาหาร full MS และ 1/2MS ให้อัตราการเกิดจุดสีเขียวสูงสุด 65 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหาร 1/3MS และ 1/4MS ให้อัตราการเกิดจุดสีเขียว 45 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับจำนวนจุดสีเขียว พบว่า อาหารสูตร full MS ให้จำนวนจุดสีเขียวสูงสุด 1.65 จุด รองลงมาคือ อาหารสูตร 1/2MS 1/3MS และ 1/4MS ให้จำนวนจุดสีเขียว 1.50 1.30 และ 1.10 จุด ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2.7 ภาพที่ 2.12)

ตารางที่ 2.7 ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสกระชายดำหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นธาตุอาหาร	อัตราการเกิดยอด (%)	อัตราการเกิดราก (%)	อัตราการเกิดจุดสีเขียว (%)	จำนวนจุดสีเขียว (จุด)
full MS	0	100	65	1.65
1/2MS	0	100	65	1.50
1/3MS	0	100	45	1.30
1/4MS	0	100	35	1.10
F-test				ns
C.V. (%)				63.25

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 2.12 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง และปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก: full MS

ข: 1/2MS

ค: 1/3MS

ง: 1/4MS

วิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำแคลลัส เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิดหนึ่ง ที่สามารถขยายพันธุ์พืชได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งปัจจัยที่ช่วยในการชักนำแคลลัส มีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพการวางเลี้ยง เป็นต้น โดยในการศึกษานี้เป็นผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสกระชายดำจากชิ้นส่วนยอด พบว่า สูตรอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสกระชายดำได้ดีที่สุด 45 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม Zuraida และคณะ (2014a) ศึกษาการชักนำแคลลัสกระชายดำ โดยใช้ชิ้นส่วนของยอดเดี่ยววางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Saensouk (2011) ศึกษาการชักนำแคลลัสเปราะทองในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อน วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักแคลลัสสูงสุด 2.50 กรัม เช่นเดียวกับ Kar และคณะ (2014) รายงานการชักนำแคลลัสในขมิ้น โดยใช้ชิ้นส่วนฐานของยอด วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงสุด 80.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลอง และการรายงานการชักนำแคลลัสของพืชในตระกูลขิง เห็นได้ว่า ถึงแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่หากใช้ชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน ผลของการชักนำแคลลัส และระยะเวลาที่ใช้ชักนำแคลลัสก็แตกต่างกันด้วย ดังนั้นการชักนำแคลลัสในแต่ละครั้งควรเลือกชิ้นส่วนพืชที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เพื่อสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ง่าย และสามารถพัฒนาให้เป็นพืชต้นใหม่ได้ นอกจากนี้การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เช่น 2,4-D และ NAA ช่วยให้พืชมีการแบ่งเซลล์ การขยายตัว และส่งเสริมกระบวนการสร้างราก (El-Nabarawy *et al*., 2015) โดยเมื่อพืชได้รับออกซินทางบาดแผล ทำให้ชิ้นส่วนพืชตรงบริเวณที่เกิดบาดแผลมีการสะสมออกซิน ซึ่งออกซินมีผลทำให้พืชแบ่งเซลล์ และเกิดแคลลัสในที่สุด แต่ทั้งการใช้สารออกซินจะต้องคำนึงถึง พันธุ์พืช อายุพืช ชนิดของชิ้นส่วน สภาพการวางเลี้ยง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้การชักนำแคลลัสเกิดประสิทธิภาพสูงสุด รวมไปถึงลดค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการศึกษา

สำหรับการเพิ่มปริมาณแคลลัสกระชายดำ จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่มีการลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลงสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้เป็นอย่างดี เนื่องจากแคลลัสที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ อาจมีการสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในเซลล์พืชอยู่แล้วบางส่วน ซึ่งถ้าหากเราใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเท่าเดิมหรือมากกว่าเดิม อาจทำให้เซลล์ชะงักการเจริญเติบโต และตายในที่สุด ซึ่งการลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลงนอกจากสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีแล้ว ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายลงด้วย แต่อย่างไรก็ตาม การประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยการลดสารควบคุมการเจริญเติบโตลง ต้องคำนึงถึงอายุ ลักษณะ และสภาพการวางเลี้ยงควบคู่ไปด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของปริญา (2558) รายงานการชักนำแคลลัสโดยการใช้ dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่สุด แต่ใน

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีที่สุดใน 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งเห็นได้ว่ามีการลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลง แต่อย่างไรก็ตาม Zuraida และคณะ (2014b) รายงานการชักนำแคลลัสของ *Curcuma caesia* ได้ดีในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่า การวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีที่สุด โดยให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 921 มิลลิกรัม และน้ำหนักแห้ง 390 มิลลิกรัม โดยไม่ต้องเติม 2,4-D แต่อย่างใด

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อมี 2 ช่องทาง คือ การสร้างยอดหรือราก หรือทั้งยอดทั้งรากจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ด้วยการสร้างต้นอ่อน ซึ่งมีการสร้างยอดและรากเกิดขึ้นพร้อมกัน หรือพัฒนามาจากแคลลัส (สมปอง, 2539) สำหรับพืชวงศ์ขิง มีความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสหลายชนิด Zhang และคณะ (2011) รายงานการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *Curcuma soloensis* บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดจากแคลลัสสูงที่สุด 95.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอด 7.1 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 6.1 เซนติเมตร Raju และคณะ (2013) ศึกษาการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *Curcuma amada* Roxb. บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอด 62.93 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอด 54.52 ยอดต่อชิ้นส่วน Zuraida และคณะ (2014b) ศึกษาการย้ายเลี้ยงแคลลัสของ *Curcuma caesia* บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอด 53 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอด 15 ยอด Saensouk (2011) ศึกษาการย้ายเลี้ยงแคลลัสของเปราะทอง บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดจากแคลลัสสูงที่สุด 5.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอด 3.42 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 4.53 เซนติเมตร สำหรับการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารไม่สามารถชักนำการเกิดยอดได้ แต่สามารถชักนำการเกิดรากได้ในปริมาณมากเนื่องจากอาจมีการสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน จึงช่วยกระตุ้นการเกิดรากได้มากกว่าการเกิดยอด นอกจากนี้มีการเกิดจุดสีเขียวขึ้น แต่จุดสีเขียวที่เกิดขึ้นไม่สามารถยืนยันได้ว่าจะพัฒนาไปเป็นรากหรือยอดในอนาคต ดังนั้นเพื่อส่งเสริมการสร้างยอดควรเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินร่วมด้วย สำหรับการทดลองนี้อาจมีการปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินเพื่อช่วยเร่งการเกิดยอดต่อไป ทั้งนี้รากที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ต่อยอดในการตรวจสอบหาสารสำคัญในรากกระชายดำเพื่อประโยชน์ต่อไปในอนาคต

การทดลองที่ 3
ผลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้ชิ้นส่วนยอดของกระชายดำ
Effect of Colchicine on Chromosome Doubling Using Shoot of Black Galingale

บทนำ

กระชายดำ (Black galingal จัดเป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker กระชายดำจัดเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 20–30 เซนติเมตร เนื้อภายในเหง้ามีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม เนื้อใบมีสีม่วงเข้มเกือบดำ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับในระนาบเดียวกัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) ในประเทศไทยมีการปลูกกระจายอยู่ทั่วประเทศ เช่น จังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน กาญจนบุรี ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559) แต่นิยมปลูกกระชายดำมากที่สุดในเขตอำเภอนาแห้ว อำเภอด่านซ้าย และอำเภอภูเรือของจังหวัดเลย (สถาบันแพทย์แผนไทย, 2553) ในปัจจุบันความนิยมกระชายดำเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ราคากระชายดำอยู่ในเกณฑ์ดี สามารถปลูกเป็นอาชีพได้ แต่พันธุ์ที่ปลูกในปัจจุบันอาจเป็นพันธุ์ที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำการกลายพันธุ์เป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในกระชายดำ สำหรับการกลายพันธุ์ของพืชสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแต่เกิดได้น้อย ซึ่งเกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม (นพพร, 2543) หรืออาจเกิดจากการกระทำของมนุษย์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพหรือก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (ธีระ และวัชรินทร์, 2542) การชักนำการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในพืชหลายชนิด ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่นิยมใช้สารโคลชิซินในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งสารโคชิซินเป็นสารที่สกัดได้จากพืช *Colchicum autumnale* L. สูตรโครงสร้างเป็น $C_{22}H_{25}NO_6$ มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำเย็น คลอโรฟอร์ม และแอลกอฮอล์ สลายตัวได้ง่ายในที่มีแสงสว่างและความร้อน ในทางการแพทย์ยังใช้รักษาโรคเก๊าท์ โดยโคลชิซินจะไปยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ซึ่งทำหน้าที่ดึงเซนโทรเมียร์ไปยังขั้วเซลล์ โคลชิซินจะไปรวมกับโปรตีนของไมโครทิวบูล ทำให้ไม่สามารถต่อกับเส้นใยสปินเดิล โครโมโซมจึงไม่แยกจากกันในระยะเมทาเฟส เมื่อโครโมโซมไม่ถูกดึงในระยะแอนาเฟส ทำให้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งเซลล์ จึงได้เซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็นสองเท่า (เอกรินทร์, 2523 ; อมรา, 2536 ; คำนูณ, 2540 ; นิตยศรี, 2541) พืชที่มีการเปลี่ยนแปลงไปของชุดโครโมโซม มีลักษณะทางสรีรวิทยาเปลี่ยนไป เช่น ความหนาแน่นของเซลล์คุม ขนาดเซลล์คุม จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไป เช่น ใบ ดอก ผล ลำต้น มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าต้นปกติ ทั้งนี้ความสำเร็จในการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินต้องคำนึงถึงชิ้นส่วนพืช ระยะเวลาที่จุ่มแช่ ความเข้มข้นสารโคลชิซิน และสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการวางเลี้ยง

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาระยะเวลา และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม รวมไปถึงตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาของกระชายดำ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

การศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนยอดอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.13) ที่ได้จากจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และเติมวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที จากนั้นนำยอดมาตัดแต่งให้มีความยาว 1.0 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 2.13 ชิ้นส่วนยอดของกระชายดำ อายุ 6 สัปดาห์ ที่ผ่านการตัดแต่งก่อนนำไปใช้ในการเพิ่มชุดโครโมโซม (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนยอดกระชายดำ

นำชิ้นส่วนยอดอายุ 6 สัปดาห์ ที่ได้จากจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตัดแต่งให้มีความสูง 1 เซนติเมตร จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.00 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้สภาพมืด เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำยอดที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ความเข้มข้นวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิตและอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองทั้งหมด 5 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 10 ชิ้นส่วน โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 5×3 ในแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม

นำใบอ่อนกระชายดำในหลอดทดลองอายุ 6 สัปดาห์ ที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ มาสับในสายละลายบัฟเฟอร์ Tris $MgCl_2$ กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 44 ไมโครเมตร จากนั้นย้อมด้วยสี PI อินคูเบทเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้สภาพมืด ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องโฟลไซโตรเมทรี รุ่น Guava easyCyte HT และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม GuaSoft 3.1.1 บันทึกการอัตราการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอของกระชายดำที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละทรีตเมนท์ทำ 8 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น ๆ ละ 1 ใบ

3. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n

นำใบกระชายดำ อายุ 1 เดือนของต้นที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n มาศึกษาเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์คุม ขนาดเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมโดยนำใบมาลอกโดยใช้มีดโกนลอกทางด้านหลังใบตามแนวยาวให้บางที่สุด นำส่วนที่ลอกได้วางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่น 1- 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า วัดความหนาแน่นเซลล์คุมจาก 3 ต้น ๆ ละ 1 ใบ ๆ ละ 10 พื้นที่ ตรวจสอบขนาดของเซลล์คุมจาก 3 ต้น ๆ ละ 1 ใบ ๆ ละ 10 เซลล์คุม และสุดท้ายศึกษาจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมจาก 3 ต้น ๆ ละ 1 ใบ ๆ ละ 10 เซลล์คุม เปรียบเทียบกัน วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในสภาพแปลงปลูกของต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n

นำต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n ที่อนุบาลภายใต้สภาพในโรงเรือน ดูแลรักษาต้นกล้ากระชายดำด้วยการรดน้ำ ใส่ปุ๋ย และกำจัดวัชพืช เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำ เก็บข้อมูลและบันทึกผล อัตราการแตกหน่อ จำนวนหน่อ ความสูงต้น จำนวนใบต่อกอ ความกว้างใบ ความยาวใบ และความหนาใบ เปรียบเทียบกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 กระถาง ๆ ละ 1 ต้น

ผลการศึกษา

1. ผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนยอดกระชายดำ

จากการศึกษาการนำชิ้นส่วนยอด ที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นที่ให้อัตราการรอดชีวิตต่ำสุดคือ โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้อัตราการรอดชีวิต 40 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราการรอดชีวิตของยอดกระชายดำลดลงตามความเข้มข้นของโคลชิซินที่สูงขึ้น และระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นานขึ้น และทั้งสองปัจจัยนี้มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.8)

ตารางที่ 2.8 ผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนยอดกระชายดำ

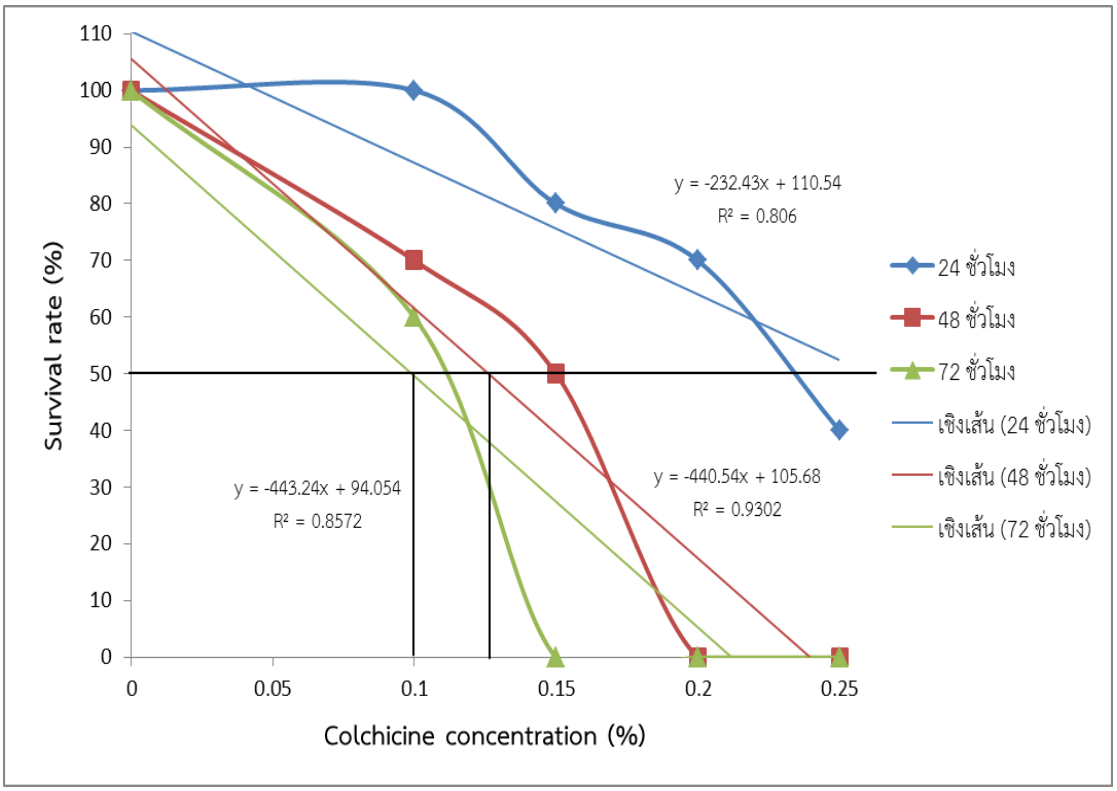
ความเข้มข้น	อัตราการรอดชีวิต (%)			เฉลี่ย
โคลชิซิน (%)	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	
0.00	100a	100a	100a	100.00A
0.10	100a	70ab	60b	76.67B
0.15	80ab	50b	0c	43.33C
0.20	70ab	0c	0c	23.33CD
0.25	40b	0c	0c	20.00D
เฉลี่ย	82A	44B	32B	
A	**			
B	**			
AxB	**			
C.V. (%)	57.87			

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์หรือแถวเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละปัจจัยด้วย วิธีDMRT

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์หรือแถวเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี DMRT

เมื่อวิเคราะห์หาค่าสมการถดถอย (regression analysis) พบว่า สารละลายโคลชิซินที่สามารถทำให้กระชายดำมีอัตราการรอดชีวิตลดลงครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) คือ โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.09 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.14 อัตราการรอดชีวิตของกระชายดำหลังจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

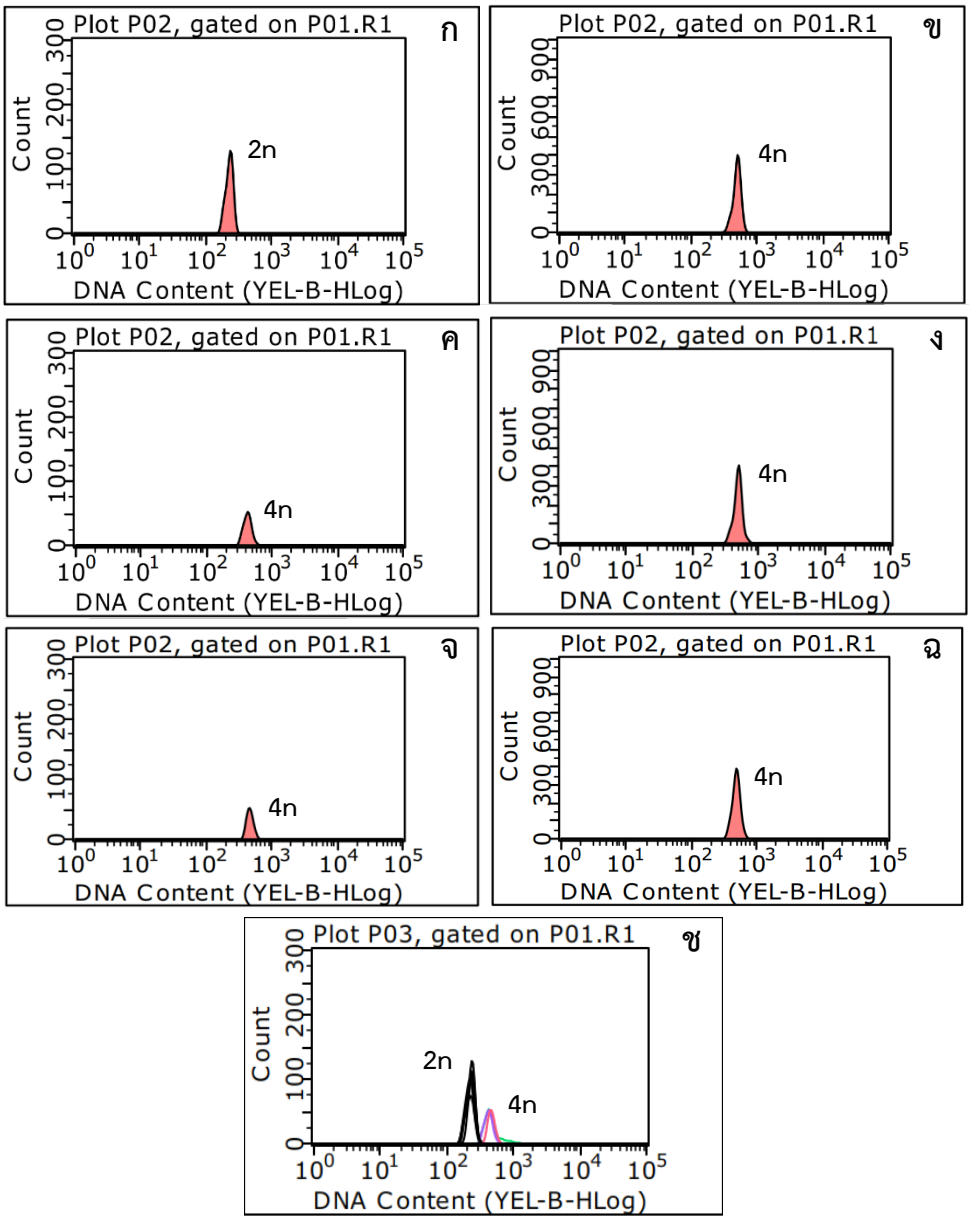
2. ผลของความเข้มข้นของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม

จากการนำใบอ่อนอายุ 6 สัปดาห์ ของกระชายดำที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลายโคลชิซิน 0.00 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง มาตรวจสอบปริมาณ DNA โดยใช้เครื่องโฟลไซโตรเมทรี รุ่น Guava easyCyte HT และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม GuaSoft 3.1.1 พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของโพลีพลอยด์ได้ 2 ระดับ คือ ดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ 85.94 และ 14.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทรีทเมนต์ที่สามารถเกิดเตตระพลอยด์ได้ดีที่สุดคือ กระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้อัตราการเกิดเตตระพลอยด์สูงสุด 37.5 เปอร์เซ็นต์ และทรีทเมนต์ที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชเตตระพลอยด์ได้คือ ทรีทเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทรีทเมนต์ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2.9) โดยต้นเตตระพลอยด์มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ (ภาพที่ 2.15)

ตารางที่ 2.9 ผลของความเข้มข้นของโคลชิซิน และระยะเวลาจุ่มแช่ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมททรี

โคลชิซิน (%)	ระยะเวลา	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	ชุดโครโมโซม	
			ดิพลอยด์	เตตระพลอยด์
0 (ชุดควบคุม)		8	100 (8)	0
0.10	24	8	100 (8)	0
	48	8	62.5 (5)	37.5 (3)
	72	8	87.5 (7)	12.5 (1)
0.15	24	8	75.0 (6)	25.0 (2)
	48	8	87.5 (7)	12.5 (1)
	72	0	0	0
0.20	24	8	100 (8)	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
0.25	24	8	75.0 (6)	25.0 (2)
	48	0	0	0
	72	0	0	0
รวม		64	85.94 (55)	14.06 (9)

ตัวเลขภายในวงเล็บคือจำนวนต้น



ภาพที่ 2.15 ฮีสโตรแกรมแสดงปริมาณดีเอ็นเอของกระชายดำหลังจุ่มแช่สารละลายโคลชิซิน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 1 ซม.)

ก: ชุดควบคุม

ข: โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ค: โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ง: โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จ: โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ฉ: โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ช: เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอระหว่างชุดควบคุมและโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ จากต้นที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า

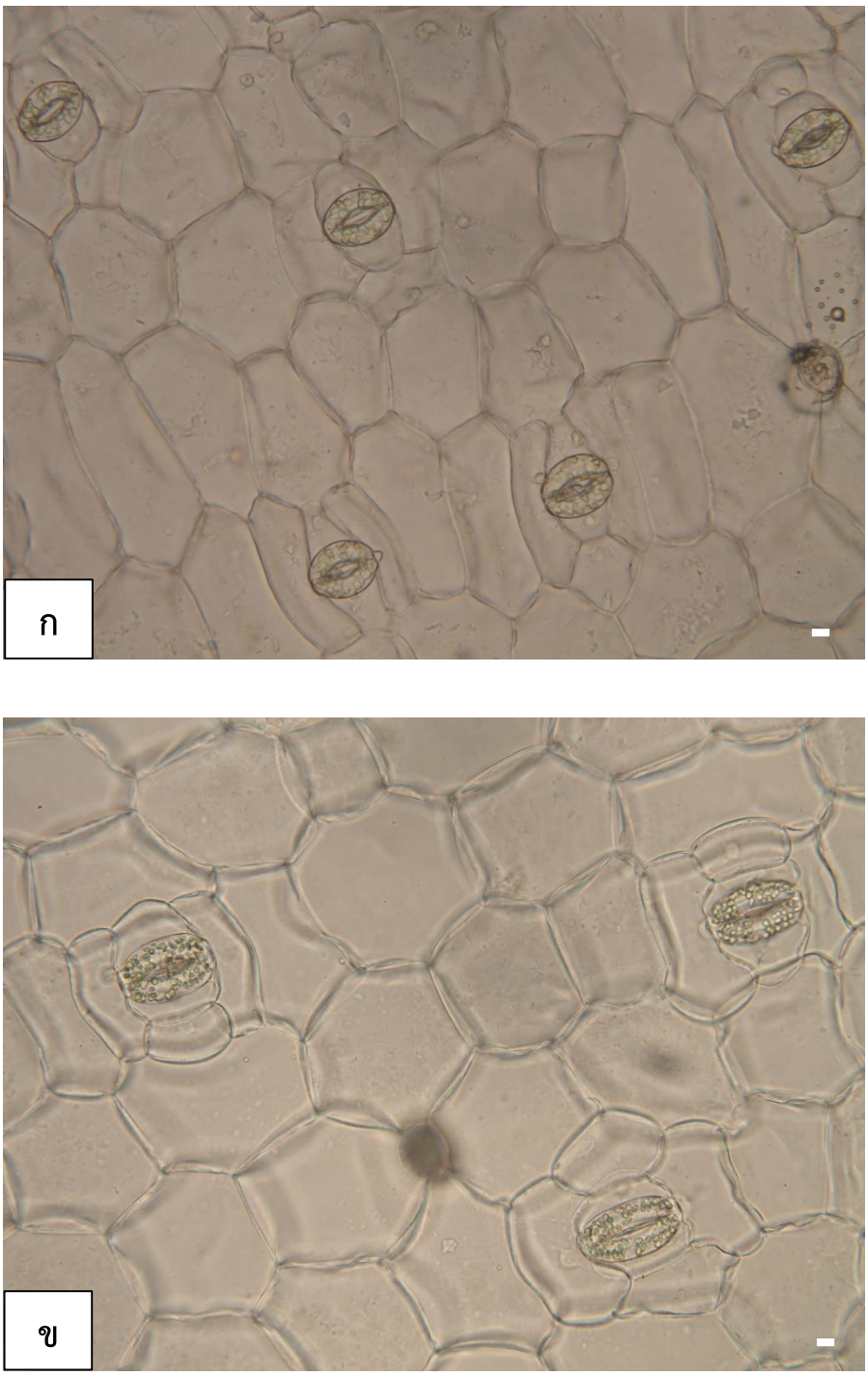
3. ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n

นำใบกระชายดำอายุ 4 สัปดาห์ ของต้นที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n มาศึกษาเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์คุม ขนาดเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุม พบว่า ต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n มีความหนาแน่นของเซลล์คุมมากกว่า ต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 4n โดยต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n ให้ความหนาแน่นเซลล์คุม 5.23 เซลล์ต่อตารางไมโครเมตร และต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n หนาแน่นเซลล์คุม 2.83 เซลล์ต่อตารางไมโครเมตร สำหรับขนาดของเซลล์คุม พบว่า ต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 4n มีขนาดเซลล์คุมที่ใหญ่กว่าต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n โดยต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 4n ให้ความกว้างเซลล์คุม 3.59 ไมโครเมตร และความยาวเซลล์คุม 6.05 ไมโครเมตร และต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n ให้ความกว้างเซลล์คุม 2.70 ไมโครเมตร และความยาวเซลล์คุม 4.18 ไมโครเมตร สำหรับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ พบว่า ต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 4n มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายเซลล์คุมที่มากกว่าต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n โดยต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 4n ให้จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายเซลล์คุม 51.90 คลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม และต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n ให้จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ 27.26 คลอโรพลาสต์ต่อเซลล์คุม โดยทุกการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n (ตารางที่ 2.10 ภาพที่ 2.16 และ 2.17)

ตารางที่ 2.10 ลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมเป็น 2n และ 4n หลังจากหลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดโครโมโซม	ความหนาแน่นเซลล์คุม (เซลล์คุมต่อตารางไมโครเมตร)	ขนาดเซลล์คุม (ไมโครเมตร)		ความหนาแน่นเม็ดคลอโรพลาสต์ (คลอโรพลาสต์เซลล์คุม)
		ความกว้าง	ความยาว	
2n	5.23	2.70	4.18	27.26
4n	2.83	3.59	6.05	51.90
T-test	**	**	**	**
C.V. (%)	48.75	21.20	26.72	45.36

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากการเปรียบเทียบโดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2.16 ความหนาแน่นเซลล์คุมของกระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X (บาร์ = 1 ไมโครเมตร)
ก: ต้นที่มีโครโมโซม 2n
ข: ต้นที่มีโครโมโซม 4n

ภาพที่ 2.17 ขนาดของเซลล์คุมและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของกระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X (บาร์ = 1 ไมโครเมตร)
ก: ต้นที่มีโครโมโซม 2n
ข: ต้นที่มีโครโมโซม 4n

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมเป็น 2n และ 4n หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 3 เดือน

นำต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n ที่อนุบาลภายใต้สภาพในโรงเรือน ดูแลรักษาต้นกล้ากระชายดำด้วยการรดน้ำ ใส่ปุ๋ย และกำจัดวัชพืช เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำ พบว่า ต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 4n ให้อัตราการแตกหน่อ จำนวนหน่อ ความสูงต้น จำนวนใบต่อกอ ความกว้างใบ ความยาวใบ และความหนาใบสูงกว่าต้นที่มีโครมโมโซมเป็น 2n โดยให้อัตราการแตกหน่อ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหน่อ 2.80 หน่อ ความสูงต้น 22.70 เซนติเมตร จำนวนใบต่อกอ 6.20 ใบ ความกว้างใบ 5.84 เซนติเมตร ความยาวใบ 13.89 เซนติเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และให้ความหนาใบ 0.35 มิลลิเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n (ตารางที่ 2.11 ภาพที่ 2.18)

ตารางที่ 2.11 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกระชายดำที่มีโครโมโซมเป็น 2n และ 4n หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 3 เดือน

ชุดโครโมโซม	อัตราการแตกหน่อ (%)	จำนวนหน่อ (หน่อต่อกอ)	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนใบ (ใบต่อกอ)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความหนาใบ (มิลลิเมตร)
2n	80	2.20	21.30	4.80	5.13	11.83	0.19
4n	100	2.80	22.70	6.20	5.84	13.89	0.35
T-test		ns	ns	ns	ns	ns	**
C.V. (%)	35.13	48.98	33.19	17.79	19.32	44.53	18.37

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากการเปรียบเทียบโดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2.18 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกระชายดำที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (บาร์ = 10 เซนติเมตร)
ก: ต้นที่มีโครโมโซม 2n
ข: ต้นที่มีโครโมโซม 4n

วิจารณ์ผลการทดลอง

เทคนิคการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยการใช้สารโคลชิซินประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด แต่สำหรับในกระชายดำการทดลองนี้เป็นการทดลองแรกที่ใช้โคลชิซินชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม จากการศึกษาการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมจากชิ้นส่วนยอดกระชายดำ โดยการใช้สารโคลชิซิน พบว่าอัตราการรอดชีวิตมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มสูงขึ้นในระยะเวลาที่สูงขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง โดยความเข้มข้นที่เริ่มทำให้ชิ้นส่วนยอดกระชายดำตาย คือ สารละลายโคลชิน ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สารละลายโคลชิน เข้มข้น 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Chen และคณะ (2011) ที่รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่เพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของหน้าวัวลดลง อย่างไรก็ตาม Leherer และคณะ (2008) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเมล็ด Japanese barberry ลดลง ซึ่งการทดลองใช้สารโคลชิซินเพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของสารโคลชิซิน หากใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกระชายดำ โดยจากการทดลองเมื่อนำยอดของกระชายดำที่ผ่านการจุ่มแช่สารละลายโคลชิซินมาวางเลี้ยง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ กระชายดำที่ได้รับสารโคลชิซินในปริมาณสูงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่ากระชายดำที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นในการทดลองควรเลือกความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน และระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่ที่เหมาะสม เพื่อลดความเป็นพิษของสารโคลชิซินต่อเซลล์ของกระชายดำหรือพืชอื่น ๆ ในทางตรงกันข้ามหากกระชายดำหรือพืชชนิดอื่น ๆ ได้รับสารในปริมาณน้อยเกินไปอาจทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม (Dhooghe *et al*., 2011) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการทดลองในครั้งนี้มีความแปรปรวนของข้อมูล ดังนั้นเพื่อความถูกต้องของข้อมูล ในการทำการทดลองแต่ละครั้ง ควรเลือกชิ้นส่วนที่มีความสม่ำเสมอทั้งอายุ ขนาด และควรมีซ้ำในการทดลองให้มากขึ้น เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่แน่ชัดและถูกต้อง (ณัฐพร, 2558)

การตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีเป็นวิธีการที่สามารถบ่งชี้การเพิ่มชุดโครโมโซมได้อย่างแม่นยำ สามารถทำได้ง่าย ตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมาก และรวดเร็วกว่าการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายรากเพราะไม่ต้องใช้ความชำนาญหรือสารเคมีที่จำเพาะเจาะจง Dolezel *et al*., 1989) Cai และ Kang (2011) ศึกษาการนำใบของ *Populus pseudosimonii* Kitag ที่ผ่านการชักนำโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซิน มาย้อมด้วยสี DAPI และตรวจสอบโดยใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี พบว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถแยกความแตกต่างของพืชดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ได้เช่นเดียวกับการใช้เทคนิคการนับจำนวนโครโมโซมปลายราก Dutt และคณะ (2010) รายงานว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโพลีพลอยด์ได้ โดยพบว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถแยกความแตกต่างของส้มที่เป็นต้นดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์ได้ Kaensaksiri และคณะ (2011) ศึกษาการนำใบแก่ของบัวบกมาสับ และตรวจสอบระดับโพลีพลอยด์ โดยการใช้เทคนิคโฟลไซโตรเมทรี พบว่าเทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถแยกความ

แตกต่างของโพลีพลอยด์ได้ 3 ระดับ คือ ดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ เช่นเดียวกับ Aina และคณะ (2012) รายงานว่า เทคนิคโฟลไซโตรเมทรีสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับโพลีพลอยด์ใน *Arachis paraguariensis* โดยสามารถแยกความแตกต่างของโพลีพลอยด์ได้ 3 ระดับ คือ ดิพลอยด์ เตตระพลอยด์ และมิกโซพลอยด์ แต่วิธีการนี้ก็อาจมีข้อเสียคือตัวเครื่องโฟลไซโตรเมทรีมีราคาแพง หากเราไม่มีเครื่องมือชนิดนี้ก็สามารถหาวิธีการอื่นในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมได้เช่นกัน

การตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซมสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ลักษณะทางสรีรวิทยาด้วยการนำต้นที่เป็นดิพลอยด์ และเตตระพลอยด์มาเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ เช่น ความหนาแน่นเซลล์คุม ขนาดเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ สามารถจำแนกความแตกต่างของชุดโครโมโซมได้อย่างแม่นยำเช่นกัน จากการทดลอง พบว่า เมื่อชุดโครโมโซมเพิ่มมากขึ้น ความหนาแน่นของเซลล์คุมลดลง สืบเนื่องมาจากเมื่อชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเซลล์คุมในชั้นเอพิเดอร์มิสมีการขยายตัวทำให้ขนาดเซลล์คุมเพิ่มมากขึ้น จึงต้องใช้พื้นที่มากขึ้นทำให้ความหนาแน่นของเซลล์คุมลดลง รวมไปถึงจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์คุมเพิ่มเป็นสองเท่าเมื่อชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ Sun และคณะ (2009) รายงานว่ายอดที่ได้จากใบอ่อนที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีขนาดของปากใบเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Chen และ Gao (2007) รายงานว่าตายอดของอึ่งคี้ที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุด และปากใบของต้นเตตระพลอยด์มีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน Gu และคณะ (2005) รายงานว่าปลายยอดของพุทราจีนที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถชักนำพืชเตตระพลอยด์ได้ และพืชเตตระพลอยด์ที่ได้ มีความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่ปากใบมีความกว้าง และความยาวเพิ่มมากขึ้นเมื่อปรียบเทียบกับต้นดิพพลอยด์ Yang และคณะ (2006) รายงานว่าโซมาติกเอมบริโอขององุ่นที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 วัน สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้ดีที่สุด และต้นเตตระพลอยด์ที่ได้มีความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่มีขนาดความกว้าง และความยาวของปากใบเพิ่มขึ้น Tang และคณะ (2010) พบว่า เอมบริโอเจนิคแคลลัสของต้นเจ้าหญิงที่จุ่มแช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุด ต้นเตตระพลอยด์ที่ได้มีจำนวนความหนาแน่นของปากใบลดลง แต่มีขนาดของปากใบและจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการทดลองและจากการรายงานในพืชหลายชนิดพบว่า พืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสารละลายโคลชิซินแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ พันธุ์พืช ชิ้นส่วนพืช ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มแช่ สำหรับวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา เป็นวิธีการที่เชื่อถือได้ในระดับหนึ่งที่สามารถยืนยันการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม และวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว และไม่ต้องใช้สารเคมีราคาแพง ทำให้ช่วยในการประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลอง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นลักษณะภายนอกของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล ซึ่งโดยทั่วไปพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย ดังนั้นลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยาจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ และช่วยจำแนกพืชที่มีโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปได้อีกวิธีหนึ่ง สำหรับในการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่า ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า มีอัตราการแตกหน่อ จำนวนหน่อ ความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้าง ความยาวใบ และความหนาของใบสูงกว่าต้นที่มีโครโมโซมปกติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อของกระชายดำมีขนาดเพิ่มขึ้นไปด้วย ดั้งนั้นเมื่อมีการเจริญเติบโต และพืชมีการแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาออกมา เราจึงใช้เกณฑ์นี้ในการช่วยคัดเลือกได้อีกวิธีหนึ่ง โดย Ye และคณะ (2010) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเตตระพลอยด์ของยี่เข่ง พบว่า ต้นเตระพลอยด์ของต้นยี่เข่งมีใบขนาดใหญ่ หนา สีเข้ม ละอองเรณู ดอก ผล และเมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ Liu และคณะ (2011) รายงานการชักนำการกลายพันธุ์ของ *Dendranthema nankingense* พบว่า ต้นที่เป็นเตตระพลอยด์มีขนาดของละอองเรณู ดอก ใบ ต้นเปลี่ยนแปลงไป และสามารถทนความเย็นได้มากว่าต้นดิพลอยด์ Chen และคณะ (2011) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้นเตตระพลอยด์ของหน้าวัว พบว่า ต้นเตตระพลอยด์ มีขนาดของใบใหญ่ หนา จานรองดอก และทรงพุ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ Abdoli และคณะ (2013) ศึกษาต้นเตตระพลอยด์ของ *Echinacea purpurea* (L.) พบว่า ต้นเตตระพลอยด์ มีละอองเรณู เมล็ด ดอก และใบขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่สารโคลชิซิน Yanhong และคณะ (2016) พบว่า ต้นเตตระพลอยด์ของดาวเรือง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป คือ ใบหนา ดอกใหญ่ และลำต้นเตี้ยกว่าต้นปกติ Omidbaigi และคณะ (2010) รายงานว่า ต้นเตตระพลอยด์ของโหระพา มีใบหนาสีเข้ม รูปร่างใบเปลี่ยนไป เมล็ด ละอองเรณู และใบมีขนาดใหญ่กว่าต้นปกติ สำหรับในกระชายดำความมุ่งหมายในการใช้สารละลายโคลชิซินในครั้งนี้ก็เพื่อเพิ่มผลผลิตเหง้ากระชายดำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำหนักมากขึ้น แต่ในขณะนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบไปจนถึงผลิตได้เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาถึง 12 เดือน ถึงจะเก็บข้อมูลผลผลิตได้ ดังนั้นเราจึงได้ใช้วิธีการที่กล่าวมาข้างต้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมเพื่อคัดเลือกต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมเพื่อใช้ทดสอบผลผลิตในอนาคต

ทั้งนี้การตรวจสอบการเพิ่มชุดโครโมโซม ไม่ควรใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งในการตรวจสอบ เพราะอาจทำให้ผลที่ได้คาดเคลื่อน ควรใช้หลาย ๆ วิธีการตรวจสอบ เพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำ ถูกต้อง และสามารถนำพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นอย่างเหมาะสมต่อไปในอนาคต

บทที่ 3
สรุป

สรุป

อาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดของกระชายดำ และอาหารเหลวสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง ในขณะที่อาหารสูตร 1/4MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำรากในหลอดทดลอง สำหรับการอนุบาลลงดินปลูกกระชายดำที่ได้จากหลอดทดลองมีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าหน่อนอกหลอดทดลอง

สำหรับการชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 45 เปอร์เซ็นต์ และให้ขนาดแคลลัสสูงสุด 1.32 เซนติเมตร ส่วนการเพิ่มปริมาณแคลลัส อาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด 1,127 มิลลิกรัม

สำหรับการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ จุ่มแช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำต้นเตตระพลอยด์ได้สูงสุด 37.5 เปอร์เซ็นต์ ต้นเตตระพลอยด์ของกระชายดำมีลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น ความหนาแน่นของเซลล์คุมลดลง ขนาดเซลล์คุม และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น จำนวนหน่อ ความสูงต้น จำนวนใบ ความหนาใบเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. สมุนไพรไทยและเครื่องเทศ. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2554. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุ์. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิราภรณ์ จิรานภาพันธุ์. 2554. การชักนำการเกิดโพลีพลอยด์ในแววมยุราพันธุ์ลูกผสม (*Torenia fournieri* × *Torenia baillonii*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไซนีย๊ะ สะมาลา. 2555. ผลของโคลชิซินและออรีซาลินต่อการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมในต้นอ่อนชุดที่ 2 ของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2553. กระชายดำ. เข้าถึงได้จาก: www.thaicrudedrug.com. (เข้าถึงเมื่อ 19 มกราคม 2016).

ณัฐพร เกิดสุวรรณ. 2553. ผลของโคลชิซินต่ออัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และเซลล์วิทยาของกล้วยไม้ช้างแดง (*Rhynchostylis gigantea* var. rubrum Sagarik. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิตยา สุขวรรณา และสุภาพร ภัสสร. 2559. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2: 64-75.

บุญยืน กิจวิจารณ์ 2547. เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช. ขอนแก่น: ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บุญหงส์ จงคิด. 2548. หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ปฐมาภรณ์ ทิลารักษ์ และสาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์. 2557. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้เหลืองจันทบูรดำเต็มคอ (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f var. oculatum). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 1: 61-68.

ปริญา สุคนธรัตน์. 2558. การขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยวิธีการเพเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่องอกนอกหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2559. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และวัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ. 2542. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นุชรัฐ บาลลา และธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์. 2560. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์จากเนื้อเยื่อมันเทศประดับด้วยสารละลายโคลชิซีนชนิดเม็ดในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2: 260-266.

นพพร สายัมพล. 2543. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรี แก้วภู่. 2553. การขยายพันธุ์สบู่ดำ (*Jatropha curcus* Linn.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเพิ่มชุดโคลโมโซมโดยใช้สารคอลชิซิน และออรีซาลิน. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชนี เพ็ชร์ช้าง. 2553. ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 29: 413-419.

วชิรพัฒน์ จิวานิจ. 2552. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้ม้าวิ่งให้เกิดพอลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถาบันแพทย์แผนไทย. 2553. คู่มือการปลูกสมุนไพรที่เหมาะสม. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

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

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2548. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสริมสกุล พจนการุณ และไชยยง รุจจนเวท. 2547. ผลของเหง้ากระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าแตกต่างกันต่อฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 32: 270-277

หทัยรัตน์ เลขสุข, พรทิพย์ จรรยา, มลิวรรณ์ เมืองมูล, วิไลลักษณ์ สาระพิน และอนุพันธ์ กงบังเกิด. 2555. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของต้นอ่อนกระเจียวส้มในหลอดทดลอง. พะเยาวิจัย ครั้งที่ 1 ปัญญาเพื่อความเข้มแข็งของมนุษย์ 12-13 มกราคม 2555 ณ อาคารเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร มหาวิทยาลัยพะเยา หน้า 128-135.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2559. กระชายดำ. เข้าถึงได้จาก: http://www.qsbg.org/. (เข้าถึงเมื่อ 2 มกราคม 2559).

Abbas, M.S., Taha, H.S., Aly, U.I., El-Shabrawi, H.M. and Gaber, E.I. 2011. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 9: 165-172.

Abdelmageed, A.H.A., Faridah, Z.Q., Norhana, A.M.F., Julia, A.A. and Kadir, A.M. 2011. Micropropagation of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. Journal of Medicinal Plants Research 51: 4465-4469.

Abdoli, M., Moieni, A. and Badi, H.N. 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Acta Physiologiae Plantarum 35: 2075-2083.

Adaniya, S. and Shirai, D. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber offcinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Scientia Horticulturae 88: 277-287.

Aina, O., Quesenberry, K. and Gallo, M. 2012. *In vitro* induction of tetraploids in *Arachis paraguariensis.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 111: 231-238.

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.

Banjerdpongchai, R., Suwannachot , K., Rattanapanone, V. and Sripanidkulchai, B. 2008. Ethanolic rhizome extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker induced apoptosis in HL- 60 cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 9: 595-600.

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

Blakesley, D., Allen, A., Pellny, T.K. and Roberts, A.V. 1937. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. Annals of Botany 90: 391-398.

Cai, X. and Kang, X.Y. 2011. *In vitro* tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag. Plant Cell Reports 30: 1771-1778.

Chen, L.L. and Gao S.L. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae 112: 339-344.

Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G. and Tian, L. 2011. Induction of *Anthurium andraeanum* ‘‘Arizona’’ tetraploid by colchicine *in vitro.* Euphytica 181: 137-145.

Chong, Y.H. , Khalafalla, M.M., Bhatt, A and Chan, L.K. 2012. The effects of culture systems and explant incision on *in vitro* propagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science 35: 863-874.

Das, A., Kesari, V. and Rangan, L. 2013. Micropropagation and cytogenetic assessment of *Zingiber species* of Northeast India. 3 Biotech 3: 471-479.

Dhooghe, E., Laere, K.V., Eeckhaut, T., Leus, L. and Huylenbroeck, J.V, 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 104: 359-373.

Dolezel, J., Binarova, P. and Lucretti, S, 1989. Analysis of Nuclear DNA content in plant cells by Flow cytometry. Biologia Plantarum 31: 113-120.

Dutt, M., Vasconcellos, M. and Song, K.J. 2010. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. Euphytica 173: 235-242.

El-Nabarawy, M.A., El-Kafafi, S.H., Hamza, M.A. and Omar, M.A. 2015. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. Annals of Agricultural Science 60: 1-9.

Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S. and Das, P.K. 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106: 485-493.

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

Głowacka, K. Jezowski, S. and Kaczmarek, Z. 2010. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. Industrial Crops and Products 32: 88-96.

Griesbach, R.J. 1985. Polyploid in Phalaenopsis orchids improvement. Thr Journal of Heredity 76: 74-75.

Gu, X.F., Yang, A.F., Meng, H. and Zhang, J.R. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Reports 24: 671-676.

Hawiset, T., Muchimapura, S., Wattanathorn, J. and Sripanidkulchai, B. 2011. Screening neuropharmacological activities of *Kaempferia parviflora* (Krachai Dam) in healthy adult male rats. American Journal of Applied Sciences 8: 695-702.

Jose, S. and Thomas, T.D. 2015. High-frequency callus organogenesis, large-scale cultivation and assessment of clonal fidelity of regenerated plants of *Curcuma caesia* Roxb., an important source of camphor. Agroforestry Systems 89: 779-788.

Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P., Soonthornchareonnon, N. and Prathanturarug, S. 2011. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107: 187-194.

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* L.). Journal of Plant Growth Regulation 72: 59-66.

Ketmaro, S., Taychasinpitak, Thunya., Mongkolchaiyaphrue, A. and Wongchaochant, S. 2012. Effect of colchicine on increasing pollen viability in a *Curcuma* hybrid (*Curcuma sparganifolia* × *C. parviflora*). Kasetsart Journal (Natural Science) 46: 363-370.

Leardkamolkarn, V., Tiamyuyen, S. and Sripanidkulchai, B. 2009. Pharmacological activity of *Kaempferia parviflora* extract against human bile duct cancer cell lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 10: 695-698.

Lehrer, J.M. Brand, M.H. and Lubell, J.D. 2008. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. atropurpurea) through exposure to colchicine and oryzalin. Scientia Horticulturae 119: 67-71.

Liu, S., Chen, S., Chen, Y., Guan, Z., Yin, D. and Chen, F. 2011. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. Scientia Horticulturae 127: 411-419.

Majdi, M. and Karimzadeh, G. 2010. Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. HortScience 45: 16-21.

Matthew, J.D. 1998. Colchicine. Virginia: Department of Medecinal Chemistry, Medical College of Virginia, Commonwealth University.

Mekjaruskul, C. and Sripanidkulchai, B. 2015. Pharmacokinetic interaction between *Kaempferia parviflora* extract and sildenafil in rats. Journal of Natural Medicines 69: 224-231.

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

Murata, K., Deguchi, T., Fujita, T. and Matsuda, H. 2013. Improvement in blood fluidity by *Kaempferia parviflora* rhizome. Journal of Natural Medicines 67: 719-724.

Nilanthi, D., Chen, X.L., Zhao F.C., Yang, Y.S. and Wu, H. 2009. Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009: 1-7.

Omidbaigia, R., Mirzaeea M., Hassanib, M.E. and Moghadam, M.S. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4: 1735-8043.

Prathanturaruga, S., Apichartbutraa, T., Chuakula, W. and Saralampa, P. 2015. Mass propagation of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker by *in vitro* regeneration. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 82: 179-183.

Rahman, M.M., Amin, N.M., Jahan, S.H. and Ahmed, R. 2004. *In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. a valuable spice plant in Bangladesh. Asian Journal of Plant Sciences 3: 306-309.

Rahman , M.Z., Sharoar, M.G., Matin, M.N., Rahman, M.H., Rahman, M.M. and Islam, M.R. 2006. High frequency plant regeneration of a dessert banana cv. Mehersagar for commercial exploitation. Biotechnology 5: 296-300.

Raju, S.C., 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.

Rego, M.M., Rego E.R., Bruckner, C.H., Finger, F.L. and Otoni, W.C. 2011. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107: 451-459.

Rujjanawate , C., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. and Pojanagaroon, S. 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. Journal of Ethnopharmacology 102: 120-122.

Saensouk, P. 2011. Callus induction and regeneration from leaf explants of *Cornukaempferia aurantiflora* Mood and Larsen. Pakistan Journal of Botany 43: 2415-2418.

Sae-Wong, C., Tansakul, P. and Tewtrakul, S. 2009. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology 124: 576-580.

Salvi, N.D., George, L. and Eapen, S. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 143-151.

Senarath, R. M. U. S., Karunarathna, B.M.A.C., Senarath, W.T.P.S.K. and Jimmy, G.C. 2017. *In vitro* propagation of *Kaempferia Galanga* (Zingiberaceae) and comparison of larvicidal activity and phytochemical identities of rhizomes of tissue cultured and naturally grown plants. Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering 2: 1-6.

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

Sharmin, S.A., Alam, M.J., Sheikh, M.M.I., Zaman, R., Khalekuzzaman, M., Mondal, S.C., Haque, M.A., Alam, M.F and Alam, I. 2013. Micropropagation and antimicrobial activity of *Curcuma aromatica* Salisb., a threatened aromatic medicinal plant. Turkish Journal of Biology 37: 698 - 708.

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

Soonthornkalump, S., Chuenboonngarm, N., Soontornchainaksaeng, P., Jenjittikul, T. and Thammasiri, K. 2014. In: Proceedings of the International Symposium on Orchids and Ornamental Plants, Chiang Mai, Thailand, 2014, p.89-92.

Shiga, I., Uno, Y., Kanechi, M. and Inagaki, N. 2009. Identification of polyploidy of *in vitro* anther-derived shoots of Asparagus officinalis L. by flow cytrometric analysis and measurement of stomatal length. Journal of Japanese Society for Horticultural Science 78: 103-108.

Singh, T.D., Singh, C.H., Nongalleima, K., Moirangthem, S. and Devi, H.S. 2013. Analysis of growth, yield potential and horticultural performance of conventional vs. micropropagated plants of *Curcuma longa* var. Lakadong. African Journal of Biotechnology 12: 1604-1608.

Stanly, C. and Keng, C.L. 2007. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith. Biotechnology 6: 555-560.

Swapna, S.T., Binitha, M. and Manju, T.S. 2004. *In vitro* multiplication in *Kaempferia galanga* Linn. Applied Biochemistry and Biotechnology 8: 233-241.

Sun, Q., Sun, H., LI, L. and Bell, R.L. 2009. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility'. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 84: 548-552.

Tang, Z.Q., Chen, D.L., Song, Z.J., He, Y.C. and Cai, D.T. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 213-220.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S. and Kummee, S. 2008. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. Journal of Ethnopharmacology 116: 191-193.

Yanhong, H., Yalin, S., Riru, Z., Ye, A., Zhe, C. and Manzhu, B. 2016. Induction of tetraploid male sterile *Tagetes erecta* by colchicine treatment and its application for interspecific hybridization. Horticultural Plant Journal 2: 284-292.

Yang, X.M., Cao, Z.Y., An, L.Z., Wang, Y.M. and Fang, X.W. 2006. *In vitro* tetraploid induction *via* colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica 152: 217-224.

Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W. and Li, G.R. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae 124: 95-101.

Yunus, M.F., Aziz, M.A., Kadir, M.A. and Rashid, A.A. 2012. *In vitro* propagation of *Etlingera elatior* (Jack) (torch ginger). Scientia Horticulturae 135: 145-150.

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

Zhou, H., Zeng, W. and Yan, H. 2017. *In vitro* induction of tetraploids in cassava variety 'Xinxuan 048' using colchicine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 128: 723-729.

Zuraida, R.A., Izzati, L.F.K., Nazreena, A.O. and Aziz, A. 2014a. Establishment and optimization growth of shoot buds-derived callus and suspension cell cultures of *Kaempferia parviflora*. American Journal of Plant Sciences 5: 2693-2699.

Zuraida, R.A., Izzati, L.F.K., Nazreena, A.O., Radziah, C.Z.M.C., Asyikin, N.S.G.S. and Sreermanan, S. 2014b. *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 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
Na_2EDTA	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Myoinositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine.HCl	0.50
Thiamine.HCl	0.10
pH	5.70

ผลงานตีพิมพ์

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำ ในหลอดทดลอง

Plant Regeneration of Black Galingale derived from Shoot Culture

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

Songklanakarin Journal of Plant Science

ปีที่ 5 ฉบับที่ 1
มกราคม-มีนาคม 2561
Volume 5 No. 1
January-March 2018
ISSN 2351-0846

SJPS

ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มีนาคม): 13-18, 2561
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 5, No. 1 (January-March): 13-18, 2018

Research article

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง

Plant Regeneration of Black Galingale derived from Shoot Culture

กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง[1] สมปอง เตชะโต[1] และ ทัศนี ขาวเนียม[1*]
Laipaitong, K.[1], Te-chato, S.[1] and Khawniam, T.[1*]

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
[1] Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hatyai District, Songkhla Province, 90112

** Corresponding author: tassanee.kh@psu.ac.th*
Received 18 September 2017; Revised 6 January 2018; Accepted 22 January 2018

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์จำนวนมากของพืชสมุนไพรกระชายดำที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยการนำชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของกระชายดำตัดแยกและวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) เติม Benzylaminopurine (BAP) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุด 3.75 และความยาวยอด 4.76 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สำหรับการเพิ่มปริมาณยอด โดยการนำชิ้นส่วนยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพอาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว พบว่า อาหารเหลวให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดสูงสุด 6.30 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด 3.94 เซนติเมตร เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอกย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกที่มีส่วนผสมของดิน พีทมอส และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 และอนุบาลในโรงเรือน เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้าทั้งสองแหล่งสามารถแตกหน่อใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้จำนวนหน่อสูงกว่า 3.67 หน่อต่อกอ จำนวนใบสูงกว่า 7 ใบต่อกอ และความสูงต้น 28 เซนติเมตร
คำสำคัญ: การชักนำยอด การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ กระชายดำ

Abstract

A simple and cost-effective protocol for large-scale propagation of Black galingale, a medicinal plant, has been studied. Shoot explants were excised and cultured on Murashige and Skoog (MS) (1962) medium supplemented with various concentrations of Benzylaminopurine (BAP) (1, 2, 3, 4 and 5 mg/L). The result showed that MS medium supplemented with 3 mg/L BA gave the highest percentage of shoot induction (95), number of shoots (3.75 shoots/explant) and shoot length (4.76 cm) after culture for 6 weeks. For shoot proliferation, shoots from previous study were excised and cultured on different types of culture media (solid, semi-solid and liquid MS medium supplemented with 3 mg/L BA). The highest percentage of shoot proliferation at 100, number of shoot at 6.30 shoots/explant and shoot length at 3.94 cm were obtained from liquid MS medium after culture for 6 weeks. For acclimatization, the regenerated plantlets and *ex vitro* spouting buds were transplanted singly in polyethylene pot containing soil, peat moss and coco peat (1:1:1) and kept in greenhouse for 9 weeks. The result showed that both source of plant can produced tiller at 100 percent, but *in vitro* plantlet gave higher number of tiller (3.67 tillers/clump), number of leaves (7 leaves/clump) and plant height (28 cm) than *ex vitro* spouting buds.
Keywords: shoot induction, plant regeneration, black galingale

บทนำ

กระชายดำ (Black galingale) จัดเป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker กระชายดำจัดเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 20–30 เซนติเมตร เนื้อภายในเหง้ามีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม เนื้อใบมีสีม่วงเข้มเกือบดำ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับในระนาบเดียวกัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) ในประเทศไทยมีชื่อเรียกที่หลากหลายเช่น กระชายดำ

Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

ว่านกระชายดำ กระชายม่วง และว่านเพชรดำ เป็นต้น เหง้าของกระชายดำมีสารประกอบที่สำคัญ ได้แก่ 3,5,7,30',40'-pentamethoxyflavone (PMF) 4',5,7,-trimethoxylflavone (TMF) Borrneol Sylvestrene 5,7-dimethoxyflavone (DMF) (Mekjaruskul and Sripanidkulchai, 2015) และในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์จากกระชายดำออกมาจำหน่ายในท้องตลาดอย่างหลากหลาย เช่น ชาชงกระชายดำ ลูกอมกระชายดำ ไวน์กระชายดำ และแคปซูลกระชายดำ เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) จึงทำให้กระชายดำเป็นสมุนไพรที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเหง้ากระชายดำ เช่น รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate *et al*., 2005) ต้านการอักเสบ (Sae-wong *et al*., 2009) แก้แพ้ (Tewtrakul *et al*., 2008) และป้องกันภาวะซึมเศร้า (Hawiset *et al*., 2011) ประเทศไทยนิยมปลูกกระชายดำในเขตอำเภอนาแห้ว อำเภอด่านซ้าย และอำเภอภูเรือของจังหวัดเลย (สถาบันแพทย์แผนไทย, 2553) และมีรายงานการเพาะปลูกในจังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน กาญจนบุรี ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559) ปัจจุบันการขยายพันธุ์กระชายดำแบบดั้งเดิมหรือการใช้เหง้าเป็นไปได้ยากเนื่องจากต้องใช้เหง้าแม่พันธุ์ที่ปลอดโรคปริมาณมาก โดยการขยายพันธุ์แต่ละครั้งต้องใช้เหง้าแก่อายุ 10–12 เดือน และการปลูกกระชายดำ 1 ไร่ ต้องใช้เหง้าแก่ 200 - 250 กิโลกรัมต่อไร่ ประกอบกับการปลูกกระชายดำมักเกิดโรคเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ซึ่งส่งผลให้กระชายดำเกิดอาการใบเหลือง ต้นเหี่ยวเน่า หัวเน่า และตายในที่สุด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556) ทำให้เกิดความเสียหายในการผลิตเหง้ากระชายดำ และอาจส่งผลทำให้ได้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทั้งนี้การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยขยายพันธุ์พืชได้รวดเร็วและปลอดโรค โดยมีการรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชตระกูลนี้หลายชนิดเช่น ดาหลา (Abdelmageed *et al*., 2011) ขมิ้น (Sharma *et al*., 2013) และเปราะหอม (Swapna *et al*., 2004) เป็นต้น สำหรับกระชายดำมีการรายงานการชักนำยอดโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มไซโตไคนิน คือ 6-Benzyl-adenine (BA) (Prathanturaruga *et al*., 2015) และการชักนำแคลลัสโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D) (Zuraida *et al*., 2014) สำหรับการเพิ่มปริมาณยอดกระชายดำยังไม่มีการรายงานการใช้ชนิดของอาหารที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่อจากเหง้าในสภาพปกติ

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกระชายดำ เพื่อให้ได้ต้นกระชายดำที่ปลอดโรคจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น เพียงพอต่อความต้องการของท้องตลาดในปัจจุบัน อีกทั้งยังเป็นแหล่งของต้นกล้าพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก และเป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชในการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของความเข้มข้นของ BAP ต่อการชักนำยอดรวมของกระชายดำ

นำยอดกระชายดำในหลอดทดลอง อายุ 6 สัปดาห์ ตัดแยกต้นเป็นยอดเดี่ยวๆ แล้วตัดชิ้นส่วนยอดออกให้มีความสูง 0.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) เติม Benzylaminopurine (BA) ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมล์ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกการชักนำยอดรวม จำนวนยอดรวม และความสูงของยอด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) แต่ละความเข้มข้นของ BAP ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

2. ศึกษาชนิดของอาหารต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของกระชายดำ

นำต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 6 สัปดาห์ ตัดส่วนยอดและรากออก ให้เหลือเฉพาะส่วนของยอดอ่อน มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพของอาหารแข็ง (ความเข้มข้นวุ้น 0.75%) อาหารกึ่งแข็ง (ความเข้มข้นวุ้น 0.375%) และอาหารเหลว (ไม่เติมผงวุ้น) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมล์ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอด วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT โดยแต่ละชนิดของอาหารทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด ๆ 1 ชิ้นส่วน

3. ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอก

นำต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสูง 7 เซนติเมตร อายุ 6 สัปดาห์ และหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอก ความสูง 7 เซนติเมตร อายุ 2 สัปดาห์ มาอนุบาลภายใต้สภาพในโรงเรือน โดยปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว กระถางละ 1 ต้น ด้วยวัสดุปลูก ดิน พีทมอส และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 และดูแลรักษาด้วยการรดน้ำ ใส่ปุ๋ย และกำจัดวัชพืช หลังจากนั้นตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อใหม่ จำนวนหน่อต่อกอ จำนวนใบต่อกอ และวัดความสูงต้น เมื่ออายุครบ 9 สัปดาห์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 ตัวอย่างด้วยวิธี t-test แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 กระถาง ๆ ละ 1 ต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของความเข้มข้นของ BAP ต่อการชักนำยอดรวมของกระชายดำ

จากการศึกษา พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดยอด 85 65 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของจำนวนยอด พบว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดสูงสุด 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 4 5 1 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด 3.00 2.93 2.85 2.38 และ 1.50 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สำหรับความยาวยอดพบว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวสูงสุด 5.34 เซนติเมตร รองลงมาคือ อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 3 0 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอด 4.81 4.78 4.60 4.31 และ 3.57 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1) (Figure 1) อย่างไรก็ตาม Abdelmageed และคณะ (2011) พบว่า การขยายพันธุ์ดาหลาในหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนตาที่ซอกใบวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.67 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ Sharma และคณะ (2013) ศึกษาการนำชิ้นส่วนปลายยอดของขมิ้นชันวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 88.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน เนื่องจาก BA เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารที่เติมไซโตไคนินในอัตราความเข้มข้นสูง จึงช่วยส่งเสริมการเกิดยอดแขนงจากตาด้านข้างในอัตราที่สูง นอกจากนี้ BA มีโมเลกุลขนาดเล็ก อยู่รวมกับอาหารได้อย่างดี จึงทำให้พืชดูดใช้ได้เป็นอย่างดีเมื่อเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มเดียวกัน และยังสลายตัวได้ยากเมื่อต้องอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม จึงเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวสำคัญที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ชักนำยอดในพืชชนิดต่าง ๆ (Rahman, 2006) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ BA ที่ใช้จะต้องขึ้นอยู่กับพันธุ์และชนิดพืชและความยากง่ายในการเกิดยอดของพืช เพราะพืชแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อความเข้มข้นของ BA ที่แตกต่างกัน

Table 1 Effect of BA concentrations on shoot induction of black galingale after culture for 6 weeks

BA concentrations (mg/L)	Shoot induction (%)	No. of shoots/explant	Plant height (cm)
0	80	1.50[b]	4.60
1	85	2.38[ab]	4.81
2	95	3.00[a]	5.34
3	95	3.75[a]	4.78
4	65	2.93[ab]	4.31
5	50	2.85[ab]	3.57
F-test		**	ns
C.V. (%)		29.75	31.22

[ns] not significant difference

** significant difference at $p \leq 0.01$

Means followed by the same letters within column are not significantly different according to DMRT.

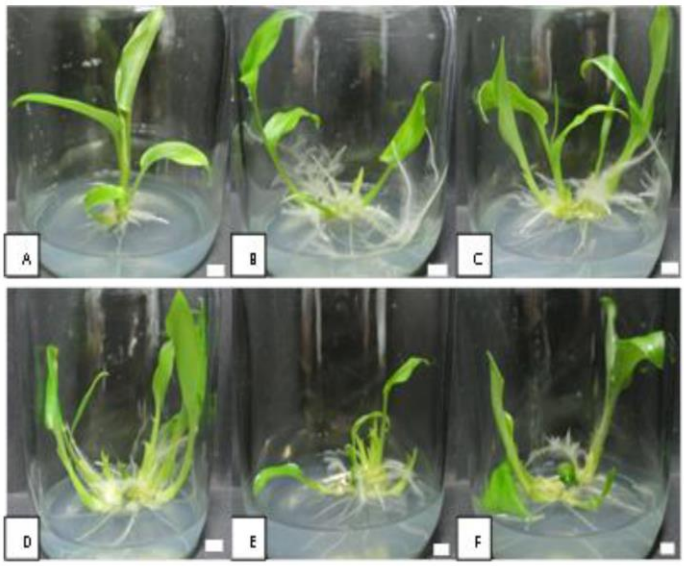


Figure 1 Characteristic of shoots on MS medium supplemented with different concentrations of BA after 6 weeks of culture (bar = 0.5 cm)
(A) control (B) 1 mg/L BA (C) 2 mg/L BA
(D) 3 mg/L BA (E) 4 mg/L BA (F) 5 mg/L BA

2. ผลของชนิดอาหารต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของกระชายดำ

MS ชนิดต่างๆ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารเหลวให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง ให้อัตราการเกิดยอด 95 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของจำนวนยอด อาหารเหลวให้จำนวนยอดสูงสุด 6.30 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง ให้จำนวนยอด 3.72 และ 3.23 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สำหรับความยาวยอด พบว่า อาหารแข็งให้ความยาวยอดสูงสุด 4.33 เซนติเมตร รองลงมาคือ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว ให้ความยาวยอด 4.21 และ 3.94 เซนติเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และจากการศึกษายังพบว่าต้นกระชายดำที่ได้จากมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง และมีการเกิดรากในทุกทรีทเมนต์ (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตาม Salvi และคณะ (2002) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของขมิ้นชัน ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 4.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 10.0 เซนติเมตร จากการรายงานของ Stanly และคณะ (2007) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของขมิ้นอ้อย และกระทือควาย ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 6.1 และ 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขมิ้นอ้อย และกระทือควาย ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Chong และคณะ (2012) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อของขมิ้นอ้อย ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดสูงสุด 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้หทัยรัตน์และคณะ (2555) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอ่อนของกระเจียวส้ม ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ยอดต่อชิ้นส่วน ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น เนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว มีการเจริญที่ดี และค่อนข้างเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคู่ไปด้วย เพราะการเขย่าจะช่วยให้ออกซิเจนละลายลงในอาหาร ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวมักเจริญเติบโตได้ช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (นิตยา และสุภาพร, 2559)

Table 2 Effect of media type on shoot multiplication of black galingale after culture for 6 weeks

Types of medium	Shoot proliferation (%)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
Solid medium	95	3.23[b]	4.33
Semi-Solid medium	95	3.72[b]	4.21
Liquid medium	100	6.30[a]	3.94
F-test		**	ns
C.V. (%)		30.07	19.20

[ns] not significant difference

** significant difference at $p \leq 0.01$

Means followed by the same letters within column are not significantly different according to DMRT.

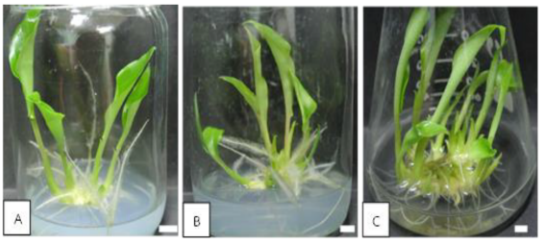


Figure 2 Effect of types of medium on shoot multiplication of Black galingale after culture for 9 weeks (bar=0.5 cm)
(A) Solid medium
(B) Semi-solid medium
(C) Liquid medium

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอก

จากการอนุบาลต้นกล้ากระชายดำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอก เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและและหน่อจากเหง้ากระชายดำ สามารถแตกกอใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้จำนวนหน่อ จำนวนใบ และความสูงของต้นสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอก โดยต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้จำนวนหน่อ 3.67 หน่อต่อกอ ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จำนวนใบ 7.00 ใบ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและความสูงของต้น 28 เซนติเมตร แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างทาง ในขณะที่หน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอกให้จำนวน

หน่อ 3 หน่อต่อกอ จำนวนใบ 1.67 ใบ และความสูงของต้น 18 เซนติเมตร (Table 3) (Figure 3) การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชที่ขยายพันธุ์ได้จากหลอดทดลองและพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบธรรมชาติ มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทำให้ทราบถึงศักยภาพการเจริญเติบโต และการปรับตัวของพืชในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติ หลังจากย้ายลงสู่สภาพธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากหลอดทดลอง และหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอกจะเห็นได้ว่ากระชายดำที่ได้จากในหลอดทดลองมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า เนื่องจากจากกระชายดำในหลอดทดลองมียอดและรากที่สมบูรณ์พร้อมที่จะดูดน้ำและธาตุอาหารเพื่อการเจริญเติบโตต่อไป แต่หน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอกเมื่อโดนตัดออกมาจากเหง้าอาจทำให้ไม่ได้รับอาหารสะสมจากเหง้า จึงทำให้มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า นอกจากนี้กระชายดำที่ได้จากในหลอดทดลองยังมีการสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินถึงแม้จะไม่ได้อยู่ในหลอดทดลอง ทำให้กระชายดำสามารถนำสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สะสมไว้มาใช้ในการเพิ่มจำนวนหน่อได้ดีกว่าหน่องอกที่ได้จากเหง้าถึงแม้จะอยู่ในสภาพธรรมชาติแล้วก็ตาม โดย Salvi และคณะ (2002) รายงานว่าต้นกล้าของขมิ้นชันที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง ให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ จำนวนใบ และความสูงต้นดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชันที่ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า โดยให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ 6.5 หน่อต่อต้น จำนวนใบ 11.9 ใบ และความสูง 92.2 เซนติเมตร หลังจากย้ายลงสู่แปลงปลูกเป็นเวลา 32 สัปดาห์ นอกจากนี้ Singh และคณะ (2013) พบว่า ขมิ้นชันพันธุ์ Lakadong ที่ขยายพันธุ์ในหลอดทดลองให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ จำนวนใบ และความสูงดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชันพันธุ์ Lakadong ที่ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า โดยให้จำนวนการแตกหน่อใหม่ 6.45 หน่อต่อต้น จำนวนใบ 12.30 ใบ และความสูง 94.75 เซนติเมตร หลังจากย้ายลงสู่แปลงปลูกเป็นเวลา 52 สัปดาห์ จากการศึกษาสรุปได้ว่า พืชต้นใหม่ที่ได้จากหลอดทดลองให้การเจริญเติบโตที่ดีกว่าหน่องอกนอกหลอดทดลอง แต่ต้องคำนึงถึงความสม่ำเสมอทั้งอายุและขนาดของต้นพืชที่นำมาศึกษาด้วย อีกทั้งในการศึกษานี้เก็บผลเพียงอายุ 9 สัปดาห์ หากมีการบันทึกผลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง หรือปริมาณสารสำคัญในเหง้าของกระชายดำก็จะทำให้รายงานสัมมนาในครั้งนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

Table 3 Effect of sources of explants on growth of black galingale after hardening for 9 weeks

Source of explants	Tiller formation (%)	Number of tillers (tillers /explant)	Number of leaves	Plant height (cm)
Ex vitro	100	3.00	1.67	18.67
In vitro	100	3.67	7.00	28.00
T-test	ns	ns	*	ns

ns not significant difference

* significant difference at p≤ 0.05

Figure 3 Growth of *ex vitro* (A) and *in vitro* (B) of black galingale under greenhouse plastic conditions after 9 weeks (bar = 10 cm)

สรุป

อาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมของกระชายดำในหลอดทดลอง และต้นกล้ากระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเมื่อนำมาอนุบาลลงดินสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าหน่องอกที่ได้จากสภาพภายนอก

กิตติกรรมประกาศ

1. โครงการผลิตและพัฒนาบุคลากรภายใต้ความร่วมมือระหว่างมูลนิธิชัยพัฒนา และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ทุนสนับสนุนสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2

3. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. สมุนไพรไทยและเครื่องเทศ. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร.

นิตยา สุขวรรณา และสุภาพร ภัสสร. 2559. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 64 - 75.

สถาบันแพทย์แผนไทย. 2553. คู่มือการปลูกสมุนไพรที่เหมาะสม. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

หทัยรัตน์ เลขสุข, พรทิพย์ จรรยา, มลิวรรณ์ เมืองมูล, วิไลลักษณ์ สาระพิน และอนุพันธ์ กงบังเกิด. 2555. ผลของสารควบคุมการ

เจริญเติบโตต่อการพัฒนาของต้นอ่อนกระเจียวส้มในหลอดทดลอง. พะเยาวิจัย ครั้งที่ 1 ปัญญาเพื่อความเข้มแข็งของมนุษย์ 12 - 13 มกราคม 2555 ณ อาคารเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร มหาวิทยาลัยพะเยา หน้า 128 - 135.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2559. กระชายดำ. เข้าถึงได้จาก: http://www.qsbg.org/. [เข้าถึงเมื่อ 2/1/59].

Abdelmageed, A.H.A., Q.Z. Faridah, F.M.A. Norhana, A.A. Julia and M.A. Kadir. 2011. Micropropagation of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. J. Med. Plant. Res. 51: 4465 - 4469.

Chong, Y.H., M.M. Khalafalla, A. Bhatt and L.K. Chan. 2012. The effects of culture systems and explant incision on *in vitro* propagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe. Pertanika J. Trop. Agric. Sci. 35: 863 - 874.

Hawiset, T., S. Muchimapura, J. Wattanathorn and B. Sripanidkulchai. 2011. Screening neuropharmacological activities of *Kaempferia parviflora* (Krachai Dam) in healthy adult male rats. Am. J. Applied Sci. 8: 695 - 702.

Mekjaruskul, C. and B. Sripanidkulchai. 2015. Pharmacokinetic interaction between *Kaempferia parviflora* extract and sildenafil in rats. J. Nat. Med. 69: 224 - 231.

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

Prathanturarug, S., T. Apichartbutraa, W. Chuakula and P. Saralampa. 2015. Mass propagation of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker by *in vitro* regeneration. J. Agr. Sci. Biotechnol. 82: 179 - 183.

Rahman, M.Z ., M.G. Sharoar, M.N. Matin, M.H. Rahman, M.M. Rahman and M.R. Islam. 2006. High frequency plant regeneration of a dessert banana cv. Mehersagar for commercial exploitation. Biotech. 5: 296 - 300.

Rujjanawate, C., D. Kanjanapothi, D. Amornlerdpison and S. Pojanagaroon. 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. J. Ethnopharmacol. 102: 120 - 122.

Sae-Wong, C., P. Tansakul and S. Tewtrakul. 2009. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. J. Ethnopharmacol. 124: 576 - 580.

Salvi, N.D., L. George and S. Eapen. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 68: 143 - 151.

Sharma, S.K., M. Sharma, A.K. Singh, V. Raina and A.M. Lal 2013. *In vitro* protocol standardization for turmeric multiplication in Jammu Division. Asian J. Hort. 7: 151 - 153.

Singh, T.D., C.H. Singh, K. Nongalleima, S. Moirangthem and H. S. Devi. 2013. Analysis of growth, yield potential and horticultural performance of conventional vs. micropropagated plants of *Curcuma longa* var. Lakadong. Afr. J. Biotechnol. 12: 1604 - 1608.

Stanly, C. and C.L. Keng. 2007. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* roscoe and *Zingiber zerumbet* smith. Biotech. 6: 555 - 560.

Swapna, T.S., M. Binitha and S.T. Manju. 2004. *In vitro* multiplication in *Kaempferia galanga* Linn. Appl. Biochem. Biotechnol. 8: 233 - 241.

Tewtrakul, S., S. Subhadhirasakul and S. Kummee. 2008. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. J. Ethnopharmacol. 116: 191 - 193.

Zuraida, A.R., K.F.L. Izzati, O.A. Nazreena and A. Aziz. 2014. Establishment and optimization growth of shoot buds-derived callus and suspension cell cultures of *Kaempferia parviflora*. Am. J. Plant. Sci. 5: 2693 - 2699.

SJPS-I-M02-4PSS-O010

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวกมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810620012

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจาก โครงการผลิตและพัฒนาบุคลากรภายใต้ความร่วมมือระหว่างมูลนิธิชัยพัฒนา และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2
3. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

กมลทิพย์ ไหลไผ่ทอง, สมปอง เตชะโต และทัศนี ขาวเนียม. 2561. การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกระชายดำในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 5(1): 13-18.