http://journal.rmutp.ac.th/

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และการชักนำเหง้าขนาดเล็กจากว่านชักมดลูกตัวเมีย (*Curcuma comosa* Roxb.)

ศิริรัตน์ พักปากน้ำ* ณัชชา ยูนชุ่ม มนัสวี เดชกล้า และ วชิราภรณ์ พิกุลทอง

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
1 ถนนอู่ทองนอก แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร

รับบทความ 20 มกราคม 2564 แก้ไขบทความ 27 กรกฎาคม 2564 ตอบรับบทความ 16 กันยายน 2564

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำหน่อของว่านชักมดลูกตัวเมีย (*Curcuma comosa* Roxb.) โดยนำหน่ออ่อนปลอดเชื้อความยาว 2 เซนติเมตร ผ่าครึ่งตามยาว แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนหน่ออ่อน จากนั้นทำการแยกหน่ออ่อนออกเป็นต้นเดี่ยว เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เพื่อให้อยู่ในสภาวะปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ 1) อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2) อาหาร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3) อาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ว่านชักมดลูกตัวเมียเกิดหน่อมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เฉลี่ย 2.11 หน่อต่อชิ้นส่วนพืช อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวหน่อเฉลี่ยสูงสุด 12.99 เซนติเมตร และอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ความยาวรากมากที่สุดเฉลี่ย 6.63 เซนติเมตร เช่นเดียวกับอาหาร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ย 6.16 และ 6.47 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำพืชไปศึกษาการเกิดเหง้าขนาดเล็ก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส ความเข้มข้น 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ว่านชักมดลูกตัวเมียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นที่มีความยาวลำต้นและความยาวรากมากที่สุด โดยทุกสูตรอาหารไม่สามารถชักนำให้เกิดเหง้าขนาดเล็กในขวดทดลองได้ แต่พบการสะสมแป้งที่บริเวณส่วนโคนลำต้นในสูตรอาหารที่เติมซูโครส 60 และ 90 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำต้นว่านชักมดลูกตัวเมียย้ายปลูกลงในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต พบว่า ต้นว่านชักมดลูกตัวเมียมีอัตราการรอดชีวิตถึง 66 - 100 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : ว่านชักมดลูกตัวเมีย ; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ; สารควบคุมการเจริญเติบโต ; เหง้าขนาดเล็ก

**** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +668 1553 3069, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: sirirat.ph@ssru.ac.th***

http://journal.rmutp.ac.th/

In vitro Micropropagation and Microrhizome Induction of *Curcuma comosa* Roxb.

Sirirat Phakpaknam* Natcha Yunchum Manusawee Dechkla and Vachiraporn Pikunthong

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University
1 U-Thong nok Road, Dusit, Bangkok 10300

Received 20 January 2021; Revised 27 July 2021; Accepted 16 September 2021

Abstract

This study was conducted to determine the effects of plant growth regulators on *in vitro* propagated plantlets and microrhizome inductions of *Curcuma comosa* Roxb. for an efficient development of plant regeneration. *In vitro* sprouted shoots (2 cm length) of *C. comosa* were incised in longitudinal section and subcultured on MS media supplemented with 3 mg/L BA for shoot multiplication and plant regeneration. Subsequently, the regenerated plants were transferred to MS medium with various concentrations of plant growth regulators; BA (1, 3, 5 mg/L), kinetin (1, 3, 5 mg/L) and TDZ (0.5, 1, 1.5 mg/L). The result showed that MS medium supplemented with 3 mg/L BA was the most effective in shoot induction with the significantly maximum average number of 2.11 shoot buds per responding explant. Moreover, MS medium supplemented with 1 mg/L BA produced the longest average of shoot bud explants (12.99 cm), while the basal MS medium induced the longest average of root multiplication (6.63 cm). Furthermore, microrhizome induction was produced under *in vitro* conditions derived young shoot buds upon transfer to MS medium containing various combinations of 1, 3 and 5 mg/L BA and 30, 60 and 90 g/L sucrose concentrations. The optimum combination in the induction of significantly highest average length of both stem (18.32 cm) and root (7.52 cm) multiplication was obtained on MS basal medium supplemented with 1 mg/L BA and 30 g/L sucrose for 4 weeks. Although microrhizome formation was not produced by the different amount of BA and sucrose in induction medium, starch accumulation was found at the base of the stem explants cultured on MS medium containing 60 and 90 g/L sucrose concentrations. Additionally, *in vitro* propagated *C. comosa* plantlets through microrhizome induction were grown under greenhouse conditions for 4 weeks and further developed into normal plants, resulting in successfully high survival rates of 66 – 100% in the cultivated *C. comosa*.

Keywords : *Curcuma comosa* Roxb ; Plant Tissue Culture; Plant Growth Regulator; Microrhizome

**** Corresponding Author. Tel.: +668 1553 3069, E-mail Address: sirirat.ph@ssru.ac.th***

1. บทนำ

ว่านชักมดลูก เป็นพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเกษตร มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอินโดนีเซีย แถบบริเวณเกาะบาหลี เกาะชวา แหลมมลายู และมีการแพร่กระจายพันธุ์มาจนถึงมาเลเซีย ไทย และอินเดีย [1] จากข้อมูลทางสถิติของระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร ในปี พ.ศ. 2560 รายงานว่าประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกว่านชักมดลูกรวมทั้งประเทศ 568 ไร่ มีการเพาะปลูกใน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดราชบุรี, จังหวัดลำปาง, จังหวัดสระบุรี และจังหวัดอุดรธานี โดยให้ผลผลิต เฉลี่ย 196 กิโลกรัมต่อไร่ ราคาที่เกษตรกรขายได้เฉลี่ย 51 บาทต่อกิโลกรัม ซึ่งจากการศึกษาและสำรวจว่านชักมดลูกที่ขายทั่วประเทศไทย [2] พบว่าว่านชักมดลูกตัวเมียเท่านั้น (*Curcuma comosa* Roxb.) ที่ให้ฤทธิ์เกี่ยวข้องกับสตรี โดยพบสารกลุ่มไฟโตเอสโตเจน ซึ่งเป็นสารจากพืชที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนที่พบในเพศหญิง โดยปัจจุบันมีการนำสารไฟโตเอสโตเจนมาใช้เพื่อทดแทนเอสโตเจนในหญิงวัยหมดประจำเดือน (Menopause) ทำให้ว่านชักมดลูกตัวเมียถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรสำหรับสตรี [3] ซึ่งส่วนของเหง้านั้นเป็นชิ้นส่วนสำคัญ เนื่องจากมีสารสำหรับเป็นตัวยาแผนโบราณตามภูมิปัญญาแพทย์แผนไทย การขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนเหง้าทำให้ได้จำนวนต้นต่อปีค่อนข้างน้อย และยังถูกคุกคามจากโรคพืช ศัตรูพืช เช่น เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าของเหง้า เชื้อแบคทีเรีย*Pseudomonas solanacearum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยว ไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne* spp.) ทำให้เกิดการเน่าของเหง้าในบริเวณที่เพาะปลูกได้ [4]

การใช้ต้นพันธุ์ที่ได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่มีข้อดีคือสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของต้นว่านชักมดลูกตัวเมียก่อนออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ จะทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีปริมาณมากตามความต้องการในระยะเวลาอันรวดเร็ว ปลอดโรค สามารถย่นระยะเวลาในการเพาะปลูก และลดพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ [5] โดย R. Watcharin [6] ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดของขมิ้นดำ และขมิ้นขาว พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอด คือ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.54 และ 2.56 ยอด และเหง้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ผลผลิตที่มากกว่าต้นที่ปลูกจากธรรมชาติ [7]

จากการรายงานกรมวิชาการเกษตร ได้มีการผลักดันให้เกษตรกรปลูกพืชสมุนไพร โดยว่านชักมดลูกเป็นหนึ่งในสมุนไพร 18 ชนิด ที่มีมูลค่าการส่งออกสูง และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทสำคัญในการขยายพันธุ์ หากสามารถชักนำให้เกิดเหง้าขนาดเล็กในขวดทดลองได้ จะทำให้ขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมาก ไม่ขึ้นกับฤดูกาลเพาะปลูก ได้พืชที่ปราศจากโรค [8] และยกระดับคุณภาพของสมุนไพรไทยให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล [9]

2. ระเบียบวิธีวิจัย

ตัวอย่างว่านชักดลูกตัวเมีย (*C. comosa*) จากโรงเรือนอนุบาลต้นพืช ศูนย์พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

2.1 ศึกษาการทำให้ต้นว่านชักมดลูกตัวเมียปลอดเชื้อ

นำหน่ออ่อนของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย แช่ลงในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนนำไปแช่ต่อในสารละลายคลอร็อกซ์® ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ร่วมกับ Tween®20 2 หยดต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใส่สารละลายคลอร็อกซ์® ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ

150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ผ่าหัวว่านชักมดลูกตัวเมีย ตามยาวเป็น 2 ส่วน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS [10] ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (PHILIP TLD 36W/54-756 cool Daylight) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 54 μmol/m^2/s เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำหน่อของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย

นำหน่ออ่อนของว่านชักมดลูกที่ได้จากการเพิ่มปริมาณหน่ออ่อน มาทำการแยกออกเป็นต้นเดี่ยว แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เพื่อให้อยู่ในสภาวะปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 54 μmol/m^2/s เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตดังนี้

1. อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. อาหาร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1,3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. อาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 54 μmol/m^2/s เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเหง้าขนาดเล็ก (Microrhizome) ของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย

นำหน่ออ่อนของว่านชักมดลูกตัวเมีย ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส (Ajax®) ความเข้มข้น 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 54 μmol/m^2/s เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.4 ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของต้นว่านชักมดลูกตัวเมียหลังออกปลูก

นำต้นว่านชักมดลูกตัวเมียที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำเหง้าขนาดเล็ก ออกปลูกลงบนวัสดุปลูกที่ผสมด้วย ทราย แกลบ และขุยมะพร้าว ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 ออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

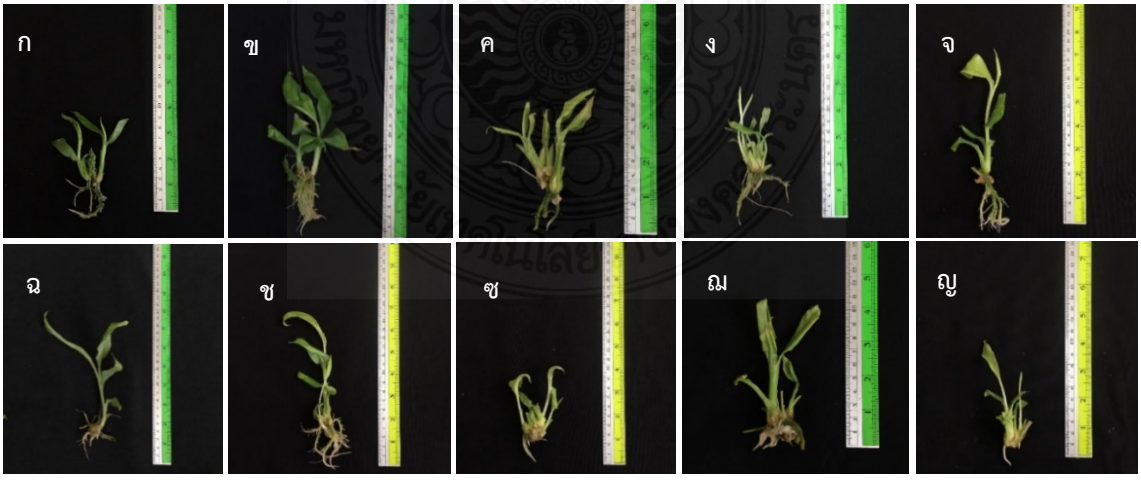
วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Version 23.0) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำซ้ำละ 3 ชิ้นส่วนพืช

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำหน่อของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย

จากการชักนำหน่อว่านชักมดลูกตัวเมียบนอาหาร MS เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ คือ 1) อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2) อาหาร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3) อาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า

ตาข้างของว่านชักมดลูกตัวเมียมีการเจริญแตกหน่อใหม่จำนวนมากที่สุดบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจำนวนหน่อเฉลี่ยเท่ากับ 2.11 หน่อต่อชิ้นส่วนพืช แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 1, รูปที่1,ค) จากการรายงานของ R. Khwanduean et al. [11] และ B. Phopgao et al. [12] ได้กล่าวว่า BA จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ที่มีผลต่อการกระตุ้นการแตกยอดใหม่ และการแบ่งเซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืชได้ดี เช่น ลำต้น และราก รวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินในระดับความเข้มข้นสูงจะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นยอดได้ นอกจากนี้ P. Kanika et al. [13] ได้กล่าวว่า มีรายงานจำนวนมากที่พบว่า BA สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีกว่า kinetin ทั้งนี้อาจเนื่องจาก BA มีฤทธิ์ (active) สูงกว่า Kinetin และโมเลกุลขนาดเล็กกว่าอาจทำให้พืชสามารถดูดซึมได้ง่าย สอดคล้องกับ R. Watcharin [6] ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดยอดสูงสุดโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.54 และ 2.56 ยอด สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านชักมดลูกตัวเมียในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากรรมวิธีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวหน่อสูงที่สุดเฉลี่ย 15.99 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจาก L.H. Nguyen et al. [14] ที่ได้ทำการชักนำให้เกิดยอดของ *C. zedoaria* ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA, Kinetin, IBA หรือ NAA พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงมีความยาวยอดได้ดีที่สุด 6.84 เซนติเมตร เช่นเดียวกับ N. Sanghamitra [7] ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *C. aromatica* พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดสูงกว่าอาหาร MS ที่เติม KN ส่วนความยาวรากว่านชักมดลูกตัวเมียบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 6.63 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างจากอาหาร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ความยาวรากเฉลี่ย 6.16 และ 6.47 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่1, รูปที่ 1, ก, ฉ และ ช) เช่นเดียวกับ C. Aphichat et al. [15] กล่าวว่า ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระชายดำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดรากที่มีความยาวมากที่สุด



รูปที่ 1 ว่านชักมดลูกตัวเมียหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA, kinetin และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) MS (ข) BA 1 มก/ล (ค) BA 3 มก/ล (ง) BA 5 มก/ล (จ) kinetin 1 มก/ล (ฉ) kinetin 3 มก/ล (ช) kinetin 5 มก/ล (ซ) TDZ 0.5 มก/ล (ฌ) TDZ 1 มก/ล (ญ) TDZ 1.5 มก/ล

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความยาวหน่อ จำนวนหน่อ และความยาวรากของต้นว่านชักมดลูกตัวเมียบนอาหาร MS ที่เติม BA, kinetin และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนหน่อ (หน่อต่อชิ้นส่วนพืช) Mean ± SD	ความยาวหน่อ (ซม.) Mean ± SD	ความยาวราก (ซม.) Mean ± SD
MS	0.88 ± 0.19^{ab}	12.05 ± 0.90^{e}	6.63 ± 0.11^{e}
MS + BA 1 mg/L	1.22 ± 0.19^{bc}	12.99 ± 1.16^{e}	4.57 ± 0.25^{cd}
MS + BA 3 mg/L	2.11 ± 0.19^{e}	7.94 ± 0.82^{bc}	4.49 ± 0.43^{cd}
MS + BA 5 mg/L	1.44 ± 0.19^{cd}	8.88 ± 0.49^{cd}	5.05 ± 0.78^{d}
MS + kinetin 1 mg/L	1.00 ± 0.00^{ab}	6.61 ± 1.31^{b}	1.37 ± 0.18^{a}
MS + kinetin 3 mg/L	1.66 ± 0.33^{d}	15.99 ± 0.87^{f}	6.16 ± 0.16^{e}
MS + kinetin 5 mg/L	0.66 ± 0.00^{a}	12.56 ± 0.97^{e}	6.47 ± 0.35^{e}
MS + TDZ 0.5 mg/L	0.88 ± 0.19^{ad}	9.88 ± 1.02^{d}	3.94 ± 0.15^{c}
MS + TDZ 1 mg/L	1.22 ± 0.19^{bc}	9.10 ± 0.50^{cd}	1.49 ± 0.43^{a}
MS + TDZ 1.5 mg/L	1.22 ± 0.19^{bc}	4.81 ± 0.81^{a}	2.65 ± 0.42^{b}

หมายเหตุ - ตัวอักษรพิมพ์เล็กใช้สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยภายในสดมภ์เดียวกัน
- อักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

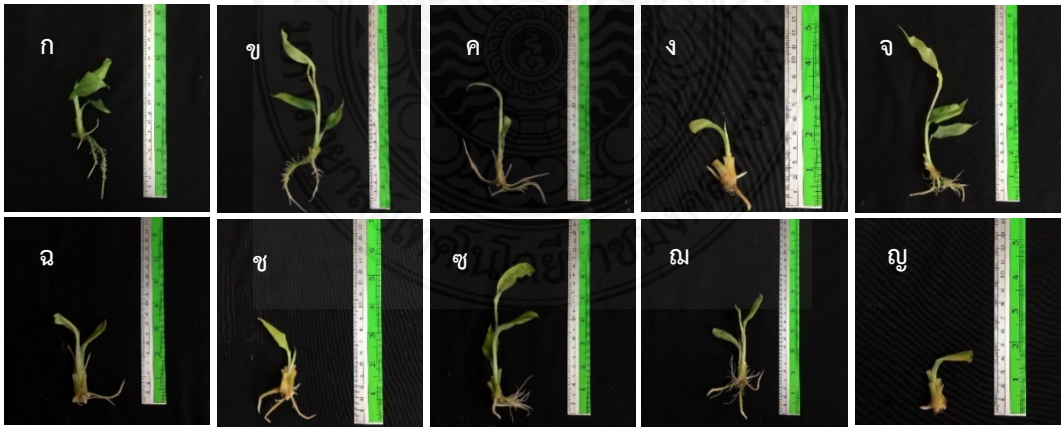
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความยาวลำต้น และความยาวรากของต้นว่านชักมดลูกตัวเมียบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ความยาวลำต้น (ซม.) Mean ± SD	ความยาวราก (ซม.) Mean ± SD
MS	12.35 ± 0.53^{cd}	6.83 ± 0.36^{ef}
MS + BA 1 mg/L + sucrose 30 g/L	18.32 ± 0.61^{e}	7.52 ± 0.65^{f}
MS + BA 1 mg/L + sucrose 60 g/L	11.80 ± 0.50^{c}	6.98 ± 0.78^{ef}
MS + BA 1 mg/L + sucrose 90 g/L	5.02 ± 0.24^{a}	1.80 ± 0.79^{b}
MS + BA 3 mg/L + sucrose 30 g/L	13.56 ± 1.89^{d}	6.51 ± 0.66^{d}
MS + BA 3 mg/L + sucrose 60 g/L	8.29 ± 0.46^{b}	4.57 ± 0.42^{cd}
MS + BA 3 mg/L + sucrose 90 g/L	5.83 ± 0.20^{a}	3.74 ± 0.19^{c}
MS + BA 5 mg/L + sucrose 30 g/L	17.04 ± 1.10^{e}	4.50 ± 0.25^{cd}
MS + BA 5 mg/L + sucrose 60 g/L	11.07 ± 0.34^{c}	5.26 ± 0.25^{d}
MS + BA 5 mg/L + sucrose 90 g/L	4.60 ± 0.34^{a}	0.68 ± 0.40^{a}

หมายเหตุ - ตัวอักษรพิมพ์เล็กใช้สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยภายในสดมภ์เดียวกัน
- อักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

3.2 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเหง้าขนาดเล็ก (Microrhizome) ของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย

หลังจากการชักนำเหง้าขนาดเล็กของว่านชักมดลูกตัวเมียบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกสูตรอาหารของการทดลองไม่พบการสร้างเหง้าขนาดเล็กในขวดทดลองได้ เมื่อนำชิ้นส่วนโคนลำต้นมาผ่าออก ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบการสะสมแป้งที่บริเวณส่วนโคนลำต้นของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส 60 และ 90 กรัมต่อลิตร โดยบริเวณโคนลำต้นมีลักษณะอวบอ้วน โดยเฉพาะในอาหารที่เติมซูโครส 60 (รูปที่ 2, ค, ฉ, ฌ) และ 90 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 2, ง, ช, ญ) และไม่พบการสะสมแป้งในสูตรอาหารที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (รูปที่ 3) ซึ่งการสะสมแป้งที่บริเวณที่ส่วนโคนลำต้นนั้นจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีปริมาณซูโครสในสูตรอาหารเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับ N. Sanghamitra [7] ที่ไม่พบการเกิดเหง้าขนาดเล็กของ *C. aromatica* ในสูตรอาหาร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โดย J. Chonthicha et al. [16] รายงานว่ามีอิทธิพลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแสง และซูโครสต่อการสร้างเหง้าขิง โดยการใช้แสงสีแดงจากหลอด LED สามารถชักนำให้เกิดเหง้าขิงได้ 100% และแสงสีแดงอาจมีผลต่อการเข้าสู่ระยะพักตัวของพืช เพื่อกระตุ้นการสะสมอาหารและสร้างเหง้า ซึ่งสูงกว่าการใช้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ จึงเป็นไปได้ว่าการทดลองครั้งนี้มีการให้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ทำให้ปัจจัยของแสงมีผลต่อการทดลอง จึงไม่พบการเกิดเหง้าขนาดเล็กของว่านชักมดลูกตัวเมียในขวดทดลอง และมีรายงานการวิจัยที่กล่าวถึงผลของแสงที่มีผลต่อการงอกเป็นต้นใหม่ รวมถึงผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาให้กลายเป็นอวัยวะที่จำเพาะ เช่น ส่วนสะสมอาหารของพืช (tuber, bulb, corm และrhizome) [4], [17] จากรายงานของ J. Chonthicha et al. [16] พบพืชสามารถสร้างเหง้าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน แตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพียง 4 สัปดาห์ แต่จากรายงานของ K. Chantana [5] ที่ศึกษาการสร้างเหง้าขนาดเล็ก พบว่า เมื่อครบ 12 สัปดาห์แล้ว

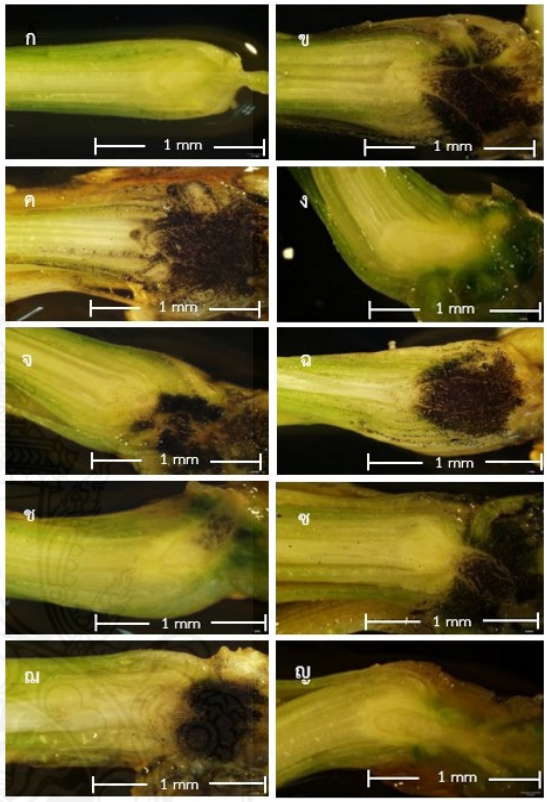


รูปที่ 2 ว่านชักมดลูกตัวเมียเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส ความเข้มข้น 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) MS (ข) BA 1 มก/ล+ซูโครส 30 ก/ล (ค) BA 1 มก/ล+ซูโครส 60 ก/ล (ง) BA 1 มก/ล+ซูโครส 90 ก/ล (จ) BA 3 มก/ล+ซูโครส 30 ก/ล (ฉ) BA 3 มก/ล+ซูโครส 60 ก/ล (ช) BA 3 มก/ล+ซูโครส 90 ก/ล (ซ) BA 5 มก/ล+ซูโครส 30 ก/ล (ฌ) BA 5 มก/ล+ซูโครส 60 ก/ล (ญ) BA 5 มก/ล+ ซูโครส 90 ก/ล

หน่อกะลาสามารถสร้างเหง้าขนาดเล็ก แต่ข่าไม่สามารถสร้างเหง้าขนาดเล็กได้ในทุกช่วงเวลาของการให้แสง ซึ่งอาจเกิดมาจากความแตกต่างของพันธุ์พืชที่ใช้ทดลอง จากการรายงานของ P. Waraporn [18] ได้กล่าวว่ามีปัจจัย ของแสง อาหาร การเติมสารกระตุ้น สภาวะในการเพาะเลี้ยง รวมถึงระยะการเจริญเติบโต มีผลต่อการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา รวมถึงการสร้างสารทุติยภูมิ โดย N. Sanghamitra [7] พบว่าการเกิดของไมโครไรโซม ถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของ BA และซูโครส ตลอดจนช่วงแสงระหว่างการเพาะเลี้ยง

ความยาวลำต้นว่านชักมดลูกตัวเมียเฉลี่ยสูงที่สุดบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ให้ความยาวลำต้นเฉลี่ย 18.32 และ 17.04 เซนติเมตร แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2, รูปที่ 2, ข) และมีความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 7.52 เซนติเมตร (ตารางที่ 2, รูปที่ 2, ข) สอดคล้องกับ K. Chantana [5] รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างรากที่มีความยาวมากที่สุด และ C. Rodjanacorn et al. [19] รายงานว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ช่วยให้พืชทดลองมีการเจริญได้ดีที่สุด โดยให้จำนวนยอด จำนวนราก และความยาวของรากมากที่สุด นอกจากนั้นการศึกษาครั้งนี้พบว่าความยาวและจำนวนรากลดลงเมื่อปริมาณซูโครสสูงขึ้น เช่นเดียวกับ K. Anupan and Y. Weerachon [20] ที่รายงานว่าปริมาณซูโครสมีผลต่อการเติบโตในขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำให้มีรากใหม่เพิ่มมากขึ้น และมีการเจริญเติบโตช้าลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ซึ่ง Y. Mehwish et al. [21] ให้เหตุผลว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ยอด และรากเจริญน้อยลงเป็นเพราะปริมาณซูโครสที่สูงเกินไปทำให้เกิดสภาวะเครียดในต้นพืช มีผลลดหรือยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ตลอดจนทำให้ค่าออสโมลาริตี (Osmolarity) ของอาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนแปลงไปจึงส่งผลต่อการดูดน้ำ และแร่ธาตุของพืชได้



รูปที่ 3 การสะสมแป้งที่บริเวณส่วนโคนลำต้นของว่านชักมดลูกตัวเมียในขวดทดลอง
(ก) BA 1 มก/ล+ซูโครส 30 ก/ล (ข) BA 1 มก/ล+ซูโครส 60 ก/ล (ค) BA 1 มก/ล+ซูโครส 90 ก/ล (ง) BA 3 มก/ล+ซูโครส 30 ก/ล (จ) BA 3 มก/ล+ซูโครส 60 ก/ล (ฉ) BA 3 มก/ล+ซูโครส 90 ก/ล (ช) BA 5 มก/ล+ซูโครส 30 ก/ล (ซ) BA 5 มก/ล+ซูโครส 60 ก/ล (ฌ) BA 5 มก/ล+ ซูโครส 90 ก/ล (ญ) MS

3.3 อัตราการรอดชีวิตของต้นว่านชักมดลูกตัวเมียหลังออกปลูก

เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและผ่านการชักนำเหง้าขนาดเล็ก ย้าย

ปลูกลงบนวัสดุปลูก ที่ผสมด้วย ทราย แกลบ และขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 อนุบาลต้นพืชเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นว่านชักมดลูกตัวเมียที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอัตราการรอดชีวิต 66 - 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้าที่รอดชีวิตทั้งหมดมีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์ มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนในสภาพธรรมชาติ การใช้วัสดุปลูกมีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของต้นกล้า ทั้งนี้ขุยมะพร้าวมีการอุ้มน้ำ ระบายน้ำ ระบายอากาศได้ดี โดย K. Srisunan and J. Yaowapa [22] กล่าวว่า วัสดุปลูกที่หาได้ง่ายในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ ขุยมะพร้าว ถ่าน แกลบ และแกลบนั้น จะมีคุณสมบัติที่ดีขึ้นเมื่อนำมาผสมกับทราย ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

4. สรุป

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการแตกหน่อของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย (*C. comosa*) ที่ดีที่สุด คือ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชักนำให้เกิดการแตกหน่อได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.11 หน่อต่อชิ้นส่วนพืช ส่วนการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเหง้าขนาดเล็กของต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย ไม่พบการสร้างเหง้าขนาดเล็กของการเพาะเลี้ยงต้นว่านชักมดลูกตัวเมียจากทุกสูตรอาหารของการทดลอง แต่ว่านชักมดลูกตัวเมียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นที่มีความยาวลำต้น และความยาวรากมากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสตั้งแต่ 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความยาวลำต้นและความยาวรากลดลง ลำต้นมีสีเหลือง ปลายใบเหลือง เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกตัวเมียที่ได้ผ่านการชักนำเหง้าขนาดเล็กมาปลูกลงวัสดุ ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 66 - 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นพืชมีความแข็งแรง สมบูรณ์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่ผิดปกติ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] W. Peerasak, *Plant Resources of South-East Asia No.9 : Plant yielding non-seed carbohydrate*, 2nd ed. Bangkok: Thailand Institute of Scientific and Technology Research Press, 2001.

[2] Department of Agriculture Extension. (2019, September 10). Survey Statistic Transplant of Wan Chak Mood Look. [Online]. Available: http://www.agriinfo.doae.go.th

[3] K. Rawiwan, "Secondary metabolite and biology activity of Wan Chak Mood Look distributed in Thai market," *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University,* vol. 19, no. 1, 2017.

[4] T. R. Sharma and B. M. Singh, "*In vitro* microrhizome induction in *Zingiber offcinale* Rosc.," *Plant Cell Rep*, vol. 15, 1995.

[5] K. Chantana, "Factors affecting *invitro* microrhizome induction of *Alpinia galanga* Swartz and *Alpinia nigra* Burrt," Research report, Dept. Science. Suan Sunandha Rajabhat Univ., Bangkok, Thailand, 2010.

[6] R. Watcharin, "Chromosomal Enrichment of *Curcuma longa* L. and *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe by Colchicine in aseptic Conditions," M.S. Thesis, Dept. Horticulture. Kasetsart Univ., Bangkok, Thailand, 2001.

[7] N. Sanghamitra, "*In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb.," *Plant Growth Regulation*, vol. 32, no. 1, 2000.

[8] P. Phattaraporn, S. Piyaporn and S. Surapon, "*Vitro* Propagation of *Globba marantina* L.," *KKU Research Journal*, vol. 19, no. 4, 2014.

[9] Department of Agriculture. (2019, September 15). Promote the cultivation of 18 GAP herbs. [Online]. Available:http://www.kaset1009.com

[10] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture," *Physiologia Plantrum*, vol. 15, 1962.

[11] R. Khwanduean, S. Supavee and M. Phukphon, "Effect of BA and NAA on *in Vitro* Culture of Young Leaves of *Caladium bicolor* Vent," *SDU Res. J*, vol. 10, no. 3, 2017.

[12] B. Phopgao, K. Chintana and U. Warut, "*In vitro* culture of *Hippeastrum johnsonnii* Bury and *Caladium bicolor* Vent," *Naresuan University Journal*, vol. 19, no. 1, 2011.

[13] P. Kanika, S. Therapas, C. Sripan, J. Torwut and S. Piti, "Effect of Kinetin on *in vitro* Growth of Jerusalem artichoke," Research Report, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi., Univ., Nonthaburi, Thailand, 2014.

[14] L.H. Nguyen, D.T. Doan, K. H. Tae and Y. S. Moon, "Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe.) a valuable medicinal plant," *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 81, 2005.

[15] C. Aphichat, N. Phongyuth and P. Pitak, "Effects of BA on Micropropagation of *Boesenbergia pandurate* Holtt.," *Journal of Agriculture*, vol 17, no. 2, 2001.

[16] J. Chonthicha, T. Siwaporn and S. Chamchuree, "Effects of Light Source and Sucrose on *in vitro* Microrhizome Formation of Ginger," *Agricultural Sci. J*, vol. 49, no. 1 (Suppl.), 2018

[17] V. Anushri, D. Vibha and P. S. Srivastava, "A protocol for *in vitro* mass propagation of asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture," *In vitro Cell. Dev. Biol*, vol. 36, 2000.

[18] P. Waraporn, *Plant tissue culture Technology: Foundation to application in pharmacy*, 1st ed. Khonkaen: Khonkaen-pimpattana Press, 2014.

[19] C. Rodjanacorn, C. Ngarmnij, K. Nutthawut , L. Rawit, N. Nattapon, M. Atchara, J. Thaya and S. Puangpaka, "*In Vitro* Propagation of *Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škornick., a Vulnerable Plant of Thailand," *SWU Sci. J*, vol. 35, no. 2, 2019.

[20] K. Anupan and Y. Weerachon, "Effects of Light, Sucrose and Plant Growth Retardants on *in vitro* Microrhizome Induction of *Curcuma longa* L.," *NU Science Journal*, vol. 2, no.1, 2005.

[21] Y. Mehwish, A. Touqeer, S. Gaurav, S. Alvaro and H. A. Ishfaq, "Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth

and development," *Molecular Biology Reports*, vol. 40, 2012.

[22] K. Srisunan and J. Yaowapa, "Effect of Substrates on Growth and Yield of Chinese Kale in Substrate Culture," *Thai Science and Technology Journal*, vol. 10, no. 2, 2002.