

การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นมณีกาญจน์
(*Curcuma lithophila* ŠkorniČk. & Soonthornk.)
พืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทยซึ่งมีศักยภาพสูงต่อการใช้เป็นไม้ประดับ
In vitro Propagation of *Curcuma lithophila* ŠkorniČk. & Soonthornk.,
an Endemic Species of Thailand with High Potential to be used
as Ornamental Plant

ศิริสร นาคแดง ไรจนกร เชิงปัญญา พชรวรรณ สอนโยธา อัจฉรา เมืองครุฑ ทยา เจนจิตติกุล
และ งามนิจ ชื่นบุญงาม*

Sirusthon Nakdang, Rodjanacorn Chuengpanya, Patcharawan Sornyotha, Atchara Muangkroot,

Thaya Jenjittikul and Ngarmnij Chuenboonngarm*

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

บทคัดย่อ

ต้นมณีกาญจน์ (*Curcuma lithophila* ŠkorniČk. & Soonthornk.) เป็นพืชวงศ์ขิงเฉพาะถิ่นของประเทศไทยซึ่งพบในจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น พืชชนิดนี้มีศักยภาพสูงต่อการนำมาใช้เป็นไม้ตัดดอกและไม้ประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่เนื่องจากมีก้านชูดอกยาวและช่อดอกมีสีส้มสวยงาม เหตุนี้จึงทำให้ต้นมณีกาญจน์ถูกเก็บจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติเพื่อนำมาค้าขาย ประกอบกับพื้นที่กระจายพันธุ์บางส่วนของผู้ชนิดนี้กำลังถูกรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์ ส่งผลให้ต้นมณีกาญจน์เป็นชนิดพันธุ์ที่กำลังถูกคุกคามและอาจสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณต้นมณีกาญจน์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์พืชชนิดนี้ เมล็ดของต้นมณีกาญจน์ถูกนำมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวก่อนนำไปเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) เมื่อเมล็ดงอกจนได้ยอดอ่อนในหลอดทดลองที่มีความสูง 6 – 7 เซนติเมตร จึงนำยอดปลอดเชื้อดังกล่าวมาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นสูง 1.5 เซนติเมตร ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีเบนซิลอะดีนีน (N^6 -benzyladenine: BA) หรือเมตาโทปอลิน (meta-Topolin) เข้มข้น 0 – 20 ไมโครโมลาร์ นาน 8 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ได้จำนวนยอดใหม่สูงสุด (6.90 ยอด/ชิ้นพืช) ต้นพืชที่เจริญจากอาหารสูตรนี้มีอัตราการรอดชีวิต 100% หลังจากนำออกปลูกนอกหลอดทดลองนาน 4 สัปดาห์ ผลที่ได้จากการศึกษานี้นอกจากจะสามารถนำไปใช้อนุรักษ์พืชถิ่นเดียวชนิดนี้แล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการเพาะปลูกเชิงเศรษฐกิจซึ่งจะช่วยลดการนำพืชชนิดนี้ออกมาจากป่าหรือนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าและส่งเสริมต้นมณีกาญจน์ต่อการเป็นไม้ประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: พืชวงศ์ขิง, พืชถิ่นเดียว, พืชมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์, การขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง, ไซโทไคนิน

ABSTRACT

Curcuma lithophila ŠkorniČk. & Soonthornk. is an endemic Zingiberaceous plant of Thailand that is found only in Kanchanaburi Province. According to its long peduncles coupled with colorful inflorescences, this plant has a high potential for becoming a new economic cut-flower or ornamental plant. For these reasons, *C. lithophila* is collected from its natural habitat for trading. In addition, some distribution areas of this plant are being disrupted by human activities, making this plant become a threatened and potentially extinct species in the future. Therefore, this research aimed to establish the propagation method using plant tissue culture to conserve this plant. Seeds of *C. lithophila* were subjected to a surface sterilization process before inoculating onto Murashige & Skoog (MS) medium. After seed germination until *in vitro* young shoots with a height of 6 – 7 cm were obtained; these axenic shoots were excised to obtain 1.5 cm high leafy-shoot bases. Then, these explants were cultured onto MS medium supplemented with 0 – 20 μM N^6 -benzyladenine (BA) or meta-Topolin for 8 weeks and later transferred to MS medium for another 4 weeks. The results revealed that MS medium supplemented with 10 μM BA produced the highest new shoots (6.90 shoots/explant). Plants regenerated

from this medium exhibited a 100% of survival rate after planting *ex vitro* for 4 weeks. These presented outcomes are not only helpful for the preservation of this endemic species but also could be applied for commercial cultivation, which will reduce the removal of plants from the forest. Moreover, it could be used for *C. lithophila* breeding, increasing its value and supporting this plant to become a new economic ornamental plant in Thailand.

KEYWORDS: Zingiberaceae, endemic plant, vulnerable plant, *in vitro* propagation, cytokinin

*Corresponding Author: ngarmnij.chu@mahidol.edu

Received: 18/04/2022; Revised: 30/10/2022; Accepted: 30/12/2022

1. บทนำ

พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่พบทั่วโลกประมาณ 120 ชนิด (Leong-Skornicková *et al.*, 2020) พืชสกุลนี้มีเขตการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคเขตร้อน (tropical) และกึ่งเขตร้อน (sub-tropical) นับตั้งแต่เอเชียใต้ เอเชียตะวันออก บางส่วนของประเทศออสเตรเลีย และบางส่วนของหมู่เกาะโอเชียเนีย สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นศูนย์รวมของเขตพืชพรรณที่สำคัญ 3 เขต ได้แก่ เขตพืชพรรณอินโด - พม่า (Indo-Burmese elements) พืชพรรณอินโด - จีน (Indo-Chinese elements) และพืชพรรณมาเลเซีย (Malesian elements) (Saensouk, 2011) ได้ถูกจัดให้เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของพืชสกุลขมิ้นสูงอีกแห่งหนึ่งของโลก (Larsen & Larsen, 2006) ปัจจุบันมีการค้นพบพืชสกุลขมิ้นในประเทศไทยไม่ต่ำกว่า 50 ชนิด (Leong-Skornicková *et al.*, 2021) อีกทั้งการสำรวจพรรณไม้เพื่อจัดทำหนังสือพรรณพฤกษชาติของไทย (Flora of Thailand) ภายในช่วงปี 2020 - 2021 นักพฤกษศาสตร์ได้พบพืชสกุลขมิ้นชนิดใหม่ของโลกซึ่งเป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (endemic plant) มากถึง 14 ชนิด (Leong-Skornicková *et al.*, 2020; 2021; Saensouk *et al.*, 2021; Soonthornkalump *et al.*, 2021) อีกทั้งยังมีแนวโน้มที่จะค้นพบพืชชนิดใหม่ในสกุลนี้ในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นการยืนยันถึงความหลากหลายของพืชสกุลนี้ในประเทศไทย

จากการที่ประเทศไทยมีความหลากหลายของพืชสกุลขมิ้นสูง จึงทำให้พืชสกุลนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นพืชประดับ เนื่องจากช่อดอกของพืชสกุลขมิ้นมีสีสันสดใสและมีลักษณะที่สวยงามแปลกตา ซึ่งดึงดูดความสนใจจากผู้พบเห็นได้เป็นอย่างดี เหตุนี้จึงทำให้พืชสกุลขมิ้นบางชนิดถูกนำไปใช้หรือพัฒนาเป็นพืชประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย โดยใช้เป็นไม้ตัดดอกหรือไม้กระถาง (Wannakrairoj, 2008) ซึ่งพุ่มมา (*C. alismatifolia*)

เป็นตัวอย่างของพืชสกุลขมิ้นที่พบในประเทศไทยซึ่งมีศักยภาพเชิงพาณิชย์สูงมากบนเวทีอุตสาหกรรมไม้ประดับโลก จนได้รับการขนานนามว่า “Siam Tulip” พุ่มมาสามารถสร้างมูลค่าเป็นจำนวนเงินถึง 30 - 40 ล้านบาท/ปี (Boonkorkaew *et al.*, 2013; Wannakrairoj, 2008) อย่างไรก็ตาม ตลาดพืชประดับทั้งในหรือต่างประเทศนั้นยังคงต้องการพืชสายพันธุ์ใหม่หรือพืชที่มีลักษณะน่าสนใจใหม่ ๆ อยู่ตลอดเวลา เพื่อเพิ่มความสามารถในการแข่งขันและดึงดูดความสนใจจากผู้บริโภค ดังนั้นการนำพืชพื้นถิ่น/พืชพื้นเมืองที่ยังไม่เป็นที่รู้จักแต่มีลักษณะน่าสนใจมาใช้หรือพัฒนาให้เป็นพืชประดับเศรษฐกิจ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของอุตสาหกรรมไม้ประดับไทยในระดับโลก (Wannakrairoj, 2008) ซึ่งต้นมณีกาญจน์ก็เป็นพืชสกุลขมิ้นอีกชนิดที่มีศักยภาพสูงต่อการนำมาใช้เป็นพืชประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทยเช่นกัน

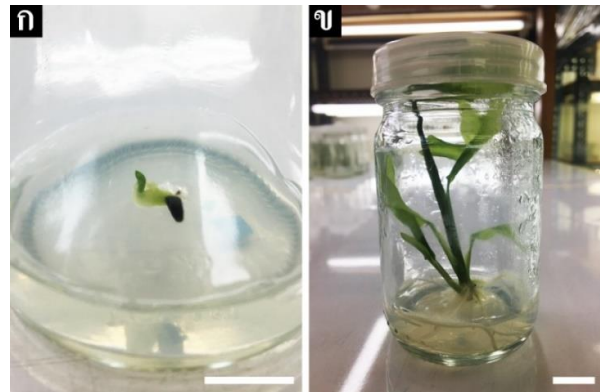
ต้นมณีกาญจน์หรือ *Curcuma lithophila* SkorniČk. & Soonthornk. นั้น มีการเก็บตัวอย่างครั้งแรกเมื่อ 90 ปีที่แล้ว โดยผู้เก็บได้เขียนระบุชื่อตัวอย่างพรรณไม้รักษาสภาพ (herbarium specimen) ไว้ว่า “กระเจียวหิน” เพื่ออิงตามลักษณะการเจริญของพืชชนิดนี้ที่พบในภูเขาหิน ต้นมณีกาญจน์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมากกับต้นบัวลาย (*Curcuma rhabdota* Sirirugsa & M.F.Newman) และต้นกระเจียวบัว (*Curcuma sparganiiifolia* Gagnep.) จึงทำให้ตัวอย่างพรรณไม้รักษาสภาพ ตลอดจนต้นพืชในธรรมชาติของต้นมณีกาญจน์ไม่ได้รับการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และกลับถูกระบุเป็นต้นบัวลายหรือต้นกระเจียวบัวมาเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม แม้จะไม่ได้การระบุชนิดที่ถูกต้อง พืชชนิดนี้ก็ถูกนำไปใช้ในแวดวงพืชสวนและเรียกกันว่า “มณีกาญจน์” ในเวลาต่อมา โดยใช้เป็นต้นพันธุ์สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืชหรือผลิตไม้ตัดดอกพันธุ์ผสม เนื่องจากพืชชนิดนี้มีช่อดอกที่สวยงาม (Soonthornkalump *et al.*, 2021; Wannakrairoj, 1996) จากการศึกษาเพิ่มเติม

ของ Soonthornkalump *et al.* (2021) ที่ได้ศึกษาทั้งจากพรรณไม้รักษาสภาพและต้นพืชในธรรมชาติ รวมถึงเปรียบเทียบเขตการกระจายพันธุ์ระหว่างต้นมณีกาญจน์ต้นบัวลาย และต้นกระเจียวบัว พบว่าต้นมณีกาญจน์มีลักษณะที่ต่างจากต้นบัวลายและต้นกระเจียวบัวหลายประการ โดยลักษณะที่ต่างไป คือ ช่อดอกของต้นมณีกาญจน์จะไม่มีใบประดับส่วนบน (coma bract) และใบประดับ (bracts) ปราศจากริ้วสีน้ำตาลแดง เกสรเพศผู้ที่มีลักษณะคล้ายกลีบดอกด้านข้าง (lateral staminodes) เป็นรูปไข่กว้าง (broadly ovate) ซึ่งมีความกว้างกว่ากลีบปาก (labellum) โดยทั้งสองส่วนนี้จะมีสีม่วงเหลืองปนแดง ต้นมณีกาญจน์มีเขตการกระจายพันธุ์แยกจากต้นบัวลายและต้นกระเจียวบัวอย่างชัดเจน โดยต้นมณีกาญจน์พบการกระจายพันธุ์เฉพาะในจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น (ท่าเสา ลุ่มสุม วังกระเจา เขาน้อย และวังดัง) คิดเป็นพื้นที่การกระจายพันธุ์ 387 ตารางกิโลเมตร ครอบคลุมบริเวณแนวเนินเขาหิน ป่าเบญจพรรณ ป่าไผ่ และป่าเหล่า (scrub forest) ที่ระดับความสูง 50 – 230 เมตร แต่ละแหล่งกระจายพันธุ์พบต้นมณีกาญจน์ประมาณ 40 – 320 ต้น พืชชนิดนี้ออกดอกในช่วงกรกฎาคม – ตุลาคม ติดเมล็ดในช่วงสิงหาคม และพักตัวในช่วงธันวาคม (Soonthornkalump *et al.*, 2021) ขณะที่ต้นบัวลายมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) และลาว (Sirirugsa *et al.*, 2007) ส่วนต้นกระเจียวบัวมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย (บริเวณตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้) ครอบคลุมถึงกัมพูชาและเวียดนาม (Sirirugsa *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2019) จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้น ต้นมณีกาญจน์จึงสมควรถูกระบุเป็นพืชชนิดใหม่ โดยได้รับคำระบุชนิด (specific epithet) เป็น lithophila ซึ่งมาจากคำภาษากรีกสองคำ คือ litho อันแปลว่า “หิน” และ philus อันแปลว่า “ซึ่งรักใคร่” เพื่อสื่อถึงลักษณะการเจริญของพืชชนิดนี้ที่สามารถเจริญได้ในแนวเนินเขาหิน (Soonthornkalump *et al.*, 2021)

ต้นมณีกาญจน์มีศักยภาพสูงต่อการใช้เป็นไม้ประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ เนื่องจากมีสีสันและลักษณะของช่อดอกที่สวยงามชวนดึงดูด (ภาพที่ 1ก) จึงทำให้มีศักยภาพสูงต่อการใช้ปลูกประดับสถานที่หรือปลูกชมความสวยงามในรูปแบบของไม้กระถาง ต้นมณีกาญจน์ยังมีก้านชูช่อดอกที่ยาว (ภาพที่ 1ข) ซึ่งเหมาะต่อการใช้เป็นไม้ตัดดอกอีกด้วย อย่างไรก็ตาม พืชชนิดนี้มีจำนวนต้นในธรรมชาติที่จำกัด อีกทั้งปัจจุบันยังพบว่าต้นมณีกาญจน์กำลังถูกเก็บออกจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติเพื่อนำมาขาย



รูปที่ 1 ช่อดอก (ก) และก้านชูช่อดอก (ข, ลูกศร) ของต้นมณีกาญจน์



รูปที่ 2 การงอกของต้นมณีกาญจน์เมื่อเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ก) และ 24 สัปดาห์ (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ประกอบกับพื้นที่การกระจายพันธุ์บางแหล่งของต้นมณีกาญจน์ไม่ได้อยู่ในเขตรักษาพันธุ์พืช จึงทำให้ถูกรบกวนจากการทำการเกษตร การพัฒนาเมือง ส่งผลให้พืชชนิดนี้ควรได้รับการประเมินสถานะเป็น “พืชที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์” (vulnerable plant) (Soonthornkalump *et al.*, 2021) อันเป็นข้อจำกัดอย่างยิ่งต่อการนำต้นมณีกาญจน์ไปใช้ในวงกว้างหรือในระดับอุตสาหกรรมที่ต้องการพืชปริมาณมากเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดหรือผู้บริโภค ทั้งนี้ต้นมณีกาญจน์อาจสูญพันธุ์ได้หากไม่มีแนวทางการอนุรักษ์พืชชนิดนี้ ดังนั้นการศึกษาวิธีการอนุรักษ์พันธุ์ควบคู่ไปกับศึกษาวิธีการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อนำไปใช้ประโยชน์โดยไม่รบกวนต้นพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ข้างต้นได้ เพราะวิธีการดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณพืชต้นใหม่ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาจำกัด (George *et al.*, 2008) อีกทั้งต้นพืชที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์และมีความสมบูรณ์แข็งแรงอีกด้วย (Das *et al.*, 2010)

จากประโยชน์ข้างต้นของวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงทำให้เทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้ขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้นหลายชนิดที่มีศักยภาพสูงต่อการนำมาใช้เป็นไม้ประดับ เช่น *C. aeruginosa* (Khumaida *et al.*, 2019) *C. amada*

(Das et al., 2010) *C. angustifolia* (Shukla et al., 2007) *C. caesia* (Bharalee et al., 2005) *C. soloensis* (Zhang et al., 2011) *C. xanthorrhiza* (Kusumastuti et al., 2014) และ *C. zedoaria* (Bharalee et al., 2005) หรือใช้เป็นกรรมวิธีเพื่ออนุรักษ์พันธุ์พืชสกุลขมิ้นที่จัดเป็นพืชหายากหรือชนิดพันธุ์ถูกคุกคาม เช่น *C. candida* (Chuengpanya et al., 2019) *C. inodora* (Yusuf et al., 2007) *C. karnatakensis* (Shanthala et al., 2020) และ *C. malabarica* (Tyagi et al., 2004) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นมณีกาญจน์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่หาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชมีค่าชนิดนี้

สารควบคุมการเติบโตของพืช (plant growth regulator) เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ถูกศึกษามากที่สุด เนื่องจากสารดังกล่าวมีผลควบคุมให้ต้นพืชมีการเจริญและพัฒนาไปในทิศทางที่ผู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องการ ไซโทไคนินเป็นกลุ่มสารที่ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลขมิ้นอย่างแพร่หลาย เพราะ ไซโทไคนินสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การชักนำให้เกิดยอดใหม่ ทำลายกระบวนการพักตัวของตา ช่วยสังเคราะห์โปรตีน RNA และคลอโรฟิลล์ กระตุ้นการทำงานและกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ และมีส่วนร่วมต่อการควบคุมและพัฒนาของอวัยวะใหม่ (George et al., 2008) ไซโทไคนินยังมีบทบาทส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์แสง (Catský et al., 1996; Fuadi et al., 2014) มีผลให้การแบ่งเซลล์สามารถเกิดได้นานขึ้น (Skalák et al., 2019) เบนซิลอะดีนีน (N^6 -benzyladenine: BA) เป็นไซโทไคนินที่ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลขมิ้นอย่างแพร่หลาย (Chuengpanya et al., 2019; Khumaida et al., 2019; Kusumastuti et al., 2014; Sharmin et al., 2013; Shanthala et al., 2020; Shukla et al., 2007; Yusuf et al., 2007; Tyagi et al., 2004) เนื่องจากเมื่อต้นพืชดูดซึม BA เข้าไป จะส่งผลให้ต้นพืชเกิดการสะสมสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไซโทไคนินในปริมาณที่สูงขึ้น ทำให้ปริมาณไซโทไคนินภายในต้นพืช (endogenous cytokinin) เพิ่มขึ้น โดยจะส่งผลต่อการเกิดยอดต่อไป (Auer et al., 1999) อีกทั้งยังมีรายงานว่าพืชไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous plant) สามารถตอบสนองต่อ BA ได้ดี โดยสามารถเจริญให้ยอดและรากที่แข็งแรง (Debergh & Zimmerman, 1991) ซึ่งพืชสกุลขมิ้นก็จัดเป็นพืชไม่มีเนื้อไม้เช่นกัน และอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ BA ถูกนำมาใช้ขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้นอย่างแพร่หลาย

เมตาโทพอลิน (meta-Topolin: mT) เป็นไซโทไคนินที่พบครั้งแรกจากใบของต้นปอปลาร์ (poplar tree) ซึ่งออกฤทธิ์ความเป็นไซโทไคนินได้สูง (Strnad et al., 1997) งานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายรายงานพบว่า mT ทำให้ขึ้นพืช (explant) หรือเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้ดีกว่าไซโทไคนินชนิดอื่น ๆ (Elayaraja et al., 2019; Erisen et al., 2020; Khanam et al., 2020; Kumari et al., 2017) ทั้งยังช่วยลดผลไม่พึงประสงค์ของไซโทไคนินต่อต้านพืชในหลอดทดลอง เช่น อาการน้ำเน่า (Abdouli et al., 2022) และการตายของเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot tip necrosis) (Teixeira da Silva et al., 2020) เป็นต้น นอกจากนี้ รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงบางชนิด เช่น ต้นมหาหงส์ (*Hedychium coronarium*) พบว่า การใช้ mT เป็นสารควบคุมการเติบโตส่งผลให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าการใช้ BA ทั้งยังช่วยลดผลกระทบของไซโทไคนินต่อการชักนำให้เกิดรากใหม่อีกด้วย (Behera et al., 2019) ดังนั้น ผลของ mT ต่อการขยายพันธุ์ต้นมณีกาญจน์ในหลอดทดลองจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาอย่างยิ่ง

จากข้อมูลข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาผลของ BA และ mT ต่อการเจริญของพืช เพื่อพิจารณาใช้เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นมณีกาญจน์ ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ หรือนำไปใช้เพื่อสนับสนุนต้นมณีกาญจน์ให้เป็นพืชประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ด้วยการเพิ่มปริมาณต้นให้ได้จำนวนมาก หรือนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อสนับสนุนการศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชชนิดนี้ต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ด การเพิ่มปริมาณพืชทดลอง และสภาวะที่ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เมล็ดของต้นมณีกาญจน์จากจังหวัดกาญจนบุรี ถูกนำมาล้างให้สะอาดก่อนจุ่มลงในเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 1 นาที จากนั้นนำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยน้ำกลั่นที่ผสมคลอโร็กซ์ (Clorox®, USA) เข้มข้น 20% และ 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นานอย่างละ 15 นาที ตามลำดับ ก่อนนำเมล็ดไปล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง นาน 5 นาที/ครั้ง เมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวแล้วถูกเพาะลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (Murashige & Skoog, 1962) บันทึกผล

การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์เมื่อเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อครบ 1 สัปดาห์

คลอรีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) เข้มข้น 6% (ปริมาตร/ปริมาตร) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใช้ตลอดการศึกษานี้มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร ผงวุ้น 7.3 กรัม/ลิตร มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 5.7 – 5.8 น้ำกลั่นที่ใช้ในกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดและอุปกรณ์ที่ใช้ตลอดการศึกษานี้ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที ขณะที่อาหารสังเคราะห์ทำให้ปลอดเชื้อด้วยกระบวนการเดียวกันแต่ใช้เวลาหนึ่งชั่วโมง นาน 15 นาที

เนื่องจากยอดปลอดเชื้อที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีจำนวนจำกัดซึ่งไม่เพียงพอต่อการดำเนินงานวิจัยการศึกษานี้จึงเพิ่มปริมาณพืชทดลองโดยนำยอดอ่อนที่มีขนาด 6 – 7 เซนติเมตร มาตัดให้เหลือเพียงส่วนโคนลำต้นสูง 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA (Sigma, USA) เข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ นาน 8 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS อีก 8 สัปดาห์ (ย้ายขึ้นพืชสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) ทั้งนี้สูตรอาหารและวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการพื้นฐานของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการเพิ่มปริมาณพืชทดลองให้เพียงพอต่อการทำงานวิจัย

เมล็ดหรือส่วนโคนลำต้นของต้นมณีกาญจน์ถูกเพาะและเลี้ยงในขวดแก้วโดยใช้ 1 เมล็ด หรือ 1 ชิ้นพืช/ขวดแก้วที่ใช้เลี้ยงพืชทดลองมีขนาด 120 มิลลิลิตร และบรรจุอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ขณะที่การชักนำให้เกิดรากใหม่และปรับสภาพต้นพืชให้พร้อมต่อการนำออกปลูกนอกหลอดทดลอง ใช้ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร และบรรจุอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้นมณีกาญจน์ถูกเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และได้รับแสงเข้มข้น 37 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวโทนเย็น (ฟิลิปส์, ประเทศไทย) นาน 16 ชั่วโมง/วัน

2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นมณีกาญจน์ในหลอดทดลอง

ยอดอ่อนปลอดเชื้อของต้นมณีกาญจน์ที่มีความสูง 6 – 7 เซนติเมตร ถูกตัดให้เหลือเพียงส่วนโคนลำต้นสูง 1.5 เซนติเมตร แล้วนำขึ้นพืชดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA หรือ mT (PhytoTech

Labs, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 2, 4, 6, 8, 10, 15 และ 20 ไมโครโมลาร์ เมื่อเลี้ยงส่วนโคนลำต้นบนอาหารที่เสริมด้วยไซโทไคนินจนครบ 8 สัปดาห์ (ย้ายขึ้นพืชสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) จึงย้ายขึ้นพืชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตของพืชต่ออีก 4 สัปดาห์ รวมระยะเวลาเลี้ยงขึ้นพืชนาน 12 สัปดาห์

2.3 การปรับสภาพและนำต้นมณีกาญจน์ออกปลูกนอกหลอดทดลอง

นำต้นมณีกาญจน์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้ามาล้างเศษวุ้นที่ติดบริเวณรากออกด้วยน้ำเปล่า จากนั้นจึงนำต้นพืชไปปลูกลงในถุงเพาะชำซึ่งบรรจุวัสดุปลูกที่เป็นส่วนผสมระหว่างดินปลูกสำเร็จรูปและกาบมะพร้าวสับในอัตราส่วน 3:1 คลุมถุงปลูกด้วยถุงพลาสติกใส จากนั้นนำชุดปลูกไปเก็บรักษาในบริเวณที่มีการพรางแสง 40% รดน้ำต้นพืชสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เมื่อต้นพืชออกปลูกครบ 4 สัปดาห์ จึงถอดถุงพลาสติกใสออก และบันทึกอัตราการรอดชีวิต จากนั้นนำต้นพืชที่ผ่านการปรับสภาพนี้ไปเก็บรักษาในโรงเรือนปลูกต้นไม้ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ฯ ต่อไป

2.4 การวางแผนการทดลอง มาตรฐานการวัดข้อมูล และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยใช้ 10 ชิ้นพืช/ชุดทดลอง และทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (รวม 30 ชิ้นพืช/ชุดการทดลอง) ข้อมูลจำนวนยอดและรากนับจากยอดและรากใหม่ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในแต่ละขวดทดลอง ขณะที่ความยาวของยอดและรากวัดจากยอดและรากใหม่ที่ยาวที่สุดของแต่ละขวดทดลอง ทั้งนี้ จากการที่ลำต้นเหนือดินของพืชวงศ์ชิงเป็นลำต้นเทียมซึ่งเรียกว่า leafy-shoot (Larsen & Larsen, 2006) ดังนั้นการวัดความยาวของยอดใหม่ในการศึกษานี้จึงวัดจากส่วนโคนลำต้นไปจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด ข้อมูลถูกนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way analysis of variance) และหากการทดสอบเอฟ (F-test) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบต่อด้วยวิธีการ Duncan's new multiple range test (DMRT) การศึกษานี้วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม PASW Statistics 18.0 ที่ระดับ $p < 0.05$ และแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: S.D.)

ตารางที่ 1 การเจริญของยอดใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นมณีกาญจน์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA และ mT เข้มข้นต่างกันนาน 8 สัปดาห์ ตามด้วยย้ายขึ้นพีชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ไมโครโมลาร์)	จำนวนยอดใหม่/ขึ้นพีช		ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)	
	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12
O (ชุดควบคุม)	1.20 ± 0.42 ^F	2.20 ± 1.03 ^{D-E}	4.79 ± 1.10 ^H	11.36 ± 0.73 ^{D-E}
BA 2	2.30 ± 0.48 ^{D-E}	2.50 ± 0.53 ^{D-E}	7.82 ± 1.20 ^{B-D}	14.42 ± 0.70 ^{A-B}
BA 4	2.80 ± 0.79 ^{B-D}	3.10 ± 0.74 ^D	8.06 ± 0.39 ^{B-C}	15.20 ± 1.06 ^A
BA 6	3.10 ± 0.88 ^{B-C}	4.70 ± 1.57 ^{B-C}	8.19 ± 0.65 ^B	14.75 ± 0.95 ^{A-B}
BA 8	3.40 ± 0.52 ^B	4.50 ± 0.85 ^{B-C}	8.43 ± 0.78 ^B	12.68 ± 1.27 ^C
BA 10	4.00 ± 0.94 ^A	6.90 ± 1.45 ^A	9.37 ± 0.85 ^A	12.50 ± 0.62 ^C
BA 15	3.00 ± 0.47 ^{B-D}	5.10 ± 1.37 ^B	8.32 ± 0.51 ^B	11.46 ± 1.11 ^D
BA 20	2.70 ± 0.48 ^{C-E}	3.00 ± 0.67 ^D	7.35 ± 0.71 ^{C-E}	10.46 ± 0.52 ^E
mT 2	1.40 ± 0.52 ^F	2.00 ± 0.47 ^E	5.99 ± 0.59 ^G	14.40 ± 0.80 ^{A-B}
mT 4	1.50 ± 0.53 ^F	2.20 ± 0.42 ^{D-E}	6.52 ± 0.99 ^{E-G}	13.97 ± 0.86 ^B
mT 6	2.10 ± 0.32 ^E	2.50 ± 0.53 ^{D-E}	6.81 ± 0.79 ^{E-F}	12.95 ± 0.99 ^C
mT 8	2.30 ± 0.67 ^{D-E}	2.70 ± 0.48 ^{D-E}	7.25 ± 0.47 ^{D-E}	12.43 ± 1.52 ^C
mT 10	2.50 ± 0.53 ^{C-E}	3.00 ± 0.94 ^D	8.15 ± 1.17 ^{B-C}	11.30 ± 1.01 ^{D-E}
mT 15	2.90 ± 0.74 ^{B-C}	4.20 ± 0.79 ^C	7.98 ± 1.05 ^{B-D}	11.24 ± 0.65 ^{D-E}
mT 20	2.60 ± 0.84 ^{C-E}	2.80 ± 0.63 ^{D-E}	6.90 ± 0.32 ^{E-F}	9.11 ± 0.73 ^F
F-Test	*	*	*	*

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก F-test ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามตารางแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 การเจริญของรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นมณีกาญจน์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA และ mT เข้มข้นต่างกันนาน 8 สัปดาห์ ตามด้วยย้ายขึ้นพีชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ไมโครโมลาร์)	จำนวนรากใหม่/ขึ้นพีช		ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)	
	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12
O (ชุดควบคุม)	6.70 ± 1.06 ^E	12.60 ± 2.17 ^D	5.60 ± 0.39 ^C	7.47 ± 0.56 ^{D-F}
BA 2	7.80 ± 0.79 ^{B-D}	14.30 ± 1.16 ^{B-C}	6.45 ± 0.55 ^{A-B}	9.10 ± 0.46 ^A
BA 4	9.50 ± 0.53 ^A	16.30 ± 0.95 ^A	6.60 ± 0.77 ^A	8.79 ± 0.55 ^{A-B}
BA 6	10.20 ± 1.23 ^A	16.70 ± 2.75 ^A	6.25 ± 0.49 ^{A-B}	8.50 ± 0.46 ^{B-C}
BA 8	8.30 ± 0.82 ^{C-E}	14.80 ± 1.81 ^B	6.15 ± 0.41 ^{A-C}	7.80 ± 0.26 ^D
BA 10	8.00 ± 0.82 ^{B-C}	14.40 ± 2.07 ^B	5.92 ± 0.23 ^{B-C}	7.65 ± 0.41 ^{D-E}
BA 15	7.40 ± 0.97 ^{C-E}	13.40 ± 1.90 ^{B-D}	4.94 ± 0.72 ^D	7.45 ± 0.50 ^{D-F}
BA 20	7.00 ± 0.67 ^{D-E}	12.70 ± 1.34 ^{C-D}	4.19 ± 0.33 ^E	7.38 ± 0.60 ^{D-F}
mT 2	7.50 ± 0.85 ^{B-E}	14.30 ± 1.16 ^{B-C}	6.40 ± 0.66 ^{A-B}	8.65 ± 0.59 ^{B-C}
mT 4	6.70 ± 1.06 ^E	13.90 ± 2.56 ^{B-D}	5.98 ± 0.83 ^{A-C}	8.26 ± 0.58 ^C
mT 6	4.00 ± 0.82 ^{F-G}	10.80 ± 1.40 ^E	5.55 ± 1.12 ^C	8.22 ± 0.34 ^C
mT 8	3.50 ± 1.08 ^{F-G}	10.10 ± 1.20 ^{E-F}	4.91 ± 0.73 ^D	7.26 ± 0.30 ^{E-G}
mT 10	3.20 ± 0.63 ^{F-G}	9.80 ± 0.92 ^{E-F}	4.25 ± 0.79 ^E	7.08 ± 0.23 ^{F-G}
mT 15	2.70 ± 0.67 ^H	8.90 ± 0.74 ^F	3.15 ± 0.63 ^F	6.89 ± 0.31 ^G
mT 20	2.30 ± 0.82 ^{G-H}	8.60 ± 1.07 ^F	2.77 ± 0.51 ^F	5.42 ± 0.38 ^H
F-Test	*	*	*	*

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก F-test ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามตารางแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ($p < 0.05$)

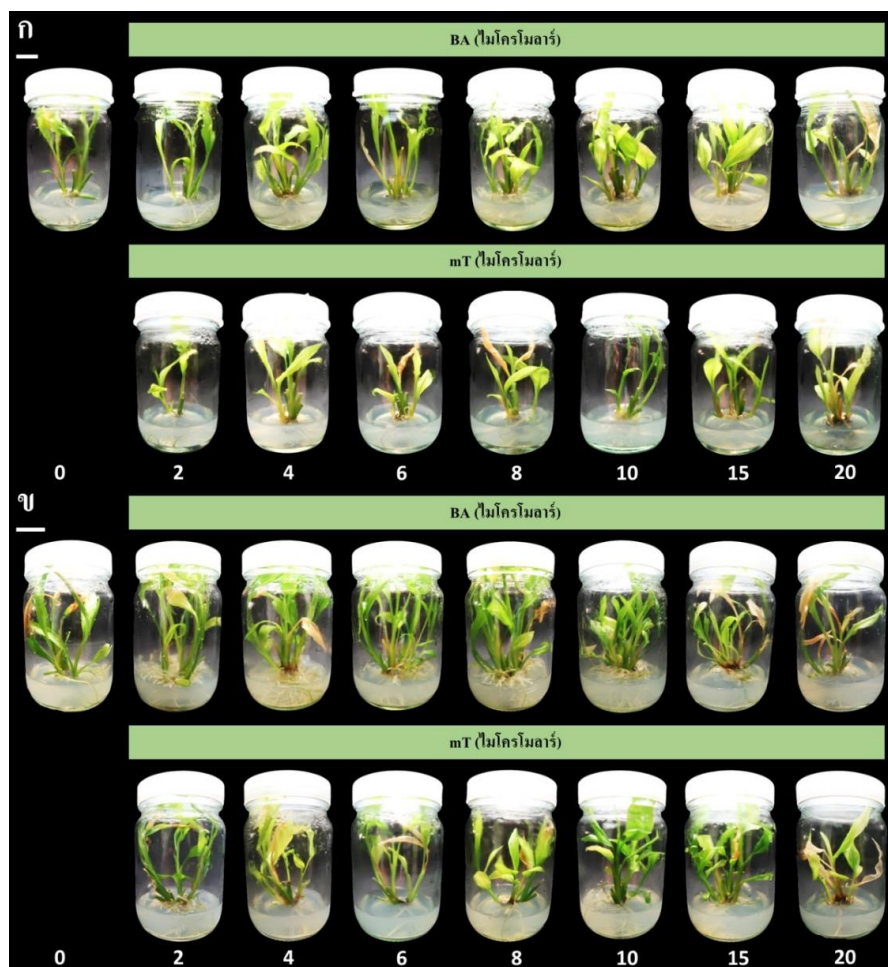
3. ผลการทดลอง

3.1 การฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ด และการชักนำให้เกิดยอดอ่อนปลอดเชื้อจากเมล็ดต้นมณีกาญจน์ในหลอดทดลอง
เมื่อนำเมล็ดที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อครบ 1 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ เมล็ดเริ่มงอกเป็นต้นกล้าขนาดเล็กเมื่อเพาะครบ 12 สัปดาห์ (รูปที่ 2ก) และพัฒนาเป็นต้นกล้าที่มีความสูง 6 – 7 เซนติเมตร เมื่อเพาะครบ 24 สัปดาห์ (รูปที่ 2ข) ซึ่งต้นกล้าดังกล่าวมีความสมบูรณ์แข็งแรง

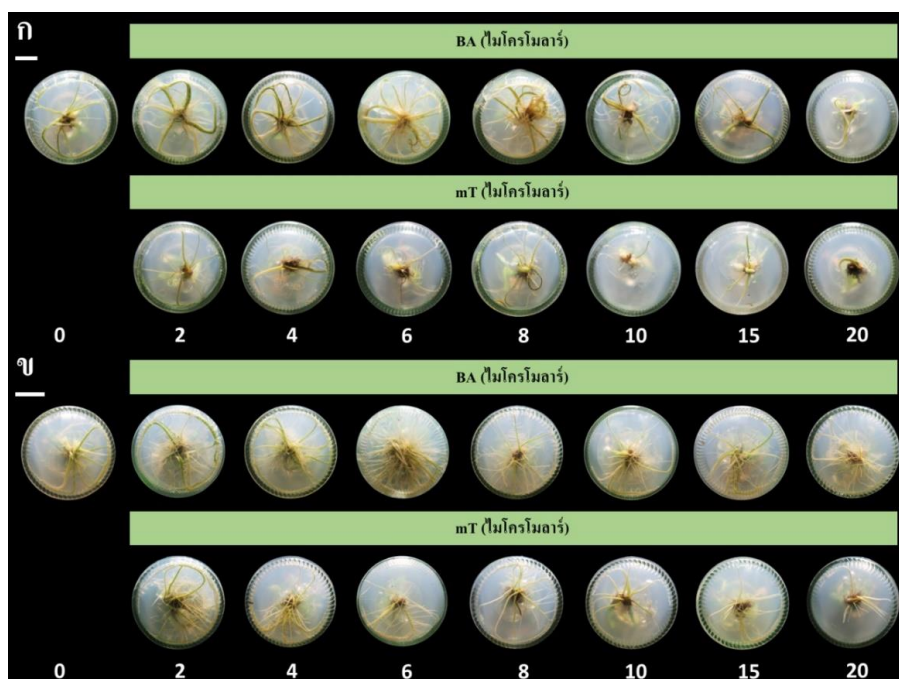
เหมาะสมต่อการนำไปใช้เพิ่มปริมาณพืชทดลองต่อไป ทั้งนี้ ในเวลา 24 สัปดาห์เมล็ดมีอัตราการงอกเพียง 30%

3.2 ผลของ BA และ mT ต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ในหลอดทดลองของต้นมณีกาญจน์

หลังจากเลี้ยงขึ้นพีชนาน 8 สัปดาห์ พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ด้วยจำนวนและความสูงที่แตกต่างกัน ขึ้นพีชบนสูตรอาหารชุดควบคุมให้จำนวน (1.20 ยอด/ขึ้นพีช) และความสูงของยอดใหม่ (4.79 เซนติเมตร) น้อยที่สุดและมีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองอื่น อาหารที่มี BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 3 การเจริญของยอดใหม่หลังจากนำส่วนโคนลำต้นของต้นมณีกาญจน์ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA หรือ mT เข้มข้นต่างกัน นาน 8 สัปดาห์ (ก) แล้วย้ายขึ้นพืชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์ (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตร ในภาพ ก และ 2 เซนติเมตร ในภาพ ข)



รูปที่ 4 การเจริญของรากใหม่หลังจากนำส่วนโคนลำต้นของต้นมณีกาญจน์ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA หรือ mT เข้มข้นต่างกัน นาน 8 สัปดาห์ (ก) แล้วย้ายขึ้นพืชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์ (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตรในภาพ ก และ 2 เซนติเมตรในภาพ ข)

ให้การเจริญของยอดใหม่ดีที่สุดในกลุ่มอาหารที่เติม BA (จำนวนยอดใหม่ 4.00 ยอด/ชิ้นพืช, ความสูงยอดใหม่ 9.37 เซนติเมตร) สำหรับกลุ่มอาหารที่เติม mT พบว่า mT ที่ความเข้มข้น 15 และ 10 ไมโครโมลาร์ พบจำนวน (2.90 ยอด/ชิ้นพืช) และความสูงของยอดใหม่ (8.15 เซนติเมตร) มากที่สุดตามลำดับ ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการใช้ BA และ mT ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า BA ให้จำนวนและความสูงของยอดใหม่มากกว่า mT ในทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 1, รูปที่ 3ก) ผลการทดลองในภาพรวมยังพบว่า BA มีค่าเฉลี่ยโดยรวมของจำนวนและความสูงยอดใหม่อยู่ที่ 3.04 ยอด/ชิ้นพืช และ 8.22 เซนติเมตร ขณะที่ mT มีค่าเฉลี่ยโดยรวมของจำนวนยอดใหม่ 2.19 ยอด/ชิ้นพืช และความสูงยอดใหม่ 7.09 เซนติเมตร

เมื่อย้ายชิ้นพืชมาเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเติบโตนาน 4 สัปดาห์ แต่ละสูตรอาหารพบการเจริญของยอดใหม่ทั้งในด้านจำนวนและความสูงที่เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 8 โดยชุดควบคุมพบจำนวนยอดใหม่ 2.20 ยอด/ชิ้นพืช และยอดใหม่มีความสูง 11.36 เซนติเมตร ผลการทดลองบางส่วนยังมีความคล้ายคลึงกับในสัปดาห์ที่ 8 กล่าวคือ ผลการทดลองในกลุ่มอาหารที่เติม BA พบว่าชิ้นพืชที่เคยถูกเลี้ยงบน BA ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 4 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวน (6.90 ยอด/ชิ้นพืช) และความสูง (15.20 เซนติเมตร) ของยอดใหม่สูงสุดในสูตรอาหารกลุ่มนี้ ตามลำดับ ขณะที่ชิ้นพืชซึ่งเคยถูกเลี้ยงบนอาหารที่เติม mT พบว่า mT ที่ความเข้มข้น 15 และ 2 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดใหม่ 4.20 ยอด/ชิ้นพืช และความสูงของยอดใหม่ 14.40 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งสูงสุดในอาหารกลุ่มนี้ ผลการทดลองยังพบว่า BA ยังคงแสดงผลการชักนำให้ชิ้นพืชเจริญให้ยอดใหม่ที่สูงกว่า mT ทั้งในระดับความเข้มข้นเดียวกันและในภาพรวม (ตารางที่ 1, รูปที่ 3ข) โดยชิ้นพืชที่เคยถูกเลี้ยงบนอาหารที่เสริมด้วย BA มีค่าเฉลี่ยรวมของจำนวนและความสูงของยอดใหม่อยู่ที่ 4.26 ยอด/ชิ้นพืช และ 13.07 เซนติเมตร ขณะที่ชุดทดลอง mT มีค่าเฉลี่ยรวมของจำนวนยอดใหม่ 2.77 ยอด/ชิ้นพืช และความสูงของยอดใหม่ 12.20 เซนติเมตร

3.3 ผลของ BA และ mT ต่อการเกิดรากใหม่ในหลอดทดลองของต้นมณีกาญจน์

ผลการทดลองที่ 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นพืชสามารถเจริญให้รากใหม่ได้เอง โดยชุดควบคุมมีจำนวนและความยาวของรากใหม่ที่ 6.70 ราก/ชิ้นพืช และ 5.60 เซนติเมตร สำหรับกลุ่มอาหารที่เติม BA พบว่าอาหารที่มี BA เข้มข้น

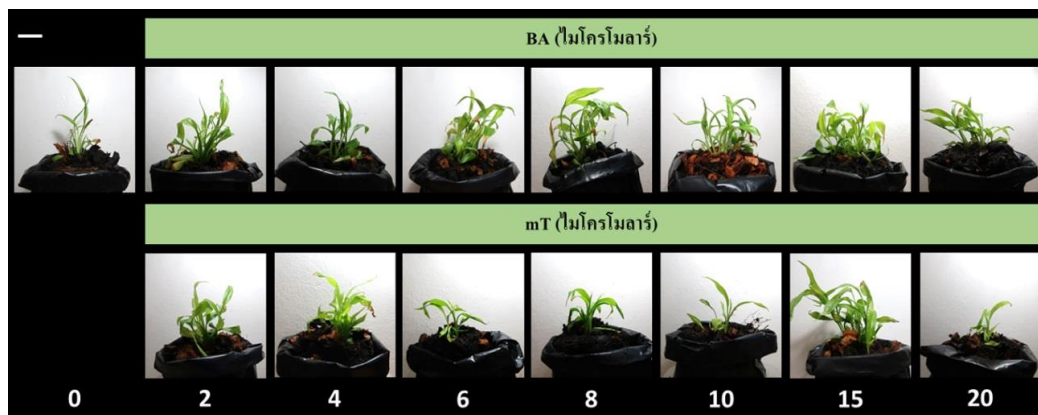
6 ไมโครโมลาร์ พบจำนวนรากใหม่สูงสุด (10.20 ราก/ชิ้นพืช) ขณะที่ความยาวรากใหม่สูงสุด (6.60 เซนติเมตร) พบจากยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BA เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองในกลุ่มอาหารที่เติม mT พบว่าอาหารที่มี mT เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้การเจริญของรากที่ดีที่สุด (จำนวนรากใหม่ 7.50 ราก/ชิ้นพืช, ความยาวรากใหม่ 6.40 เซนติเมตร) ผลการทดลองยังพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันนั้น ยอดที่เลี้ยงบนอาหารร่วมกับ BA พบการเจริญของรากใหม่ที่สูงกว่า mT ในทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 2, รูปที่ 4ก) นอกจากนี้ BA ยังมีค่าเฉลี่ยโดยรวมของจำนวนรากใหม่ (BA = 8.31 ราก/ชิ้นพืช mT = 4.27 ราก/ชิ้นพืช) และความยาวรากใหม่ (BA = 5.76 เซนติเมตร mT = 4.72 เซนติเมตร) ที่มากกว่า mT อีกด้วย

หลังจากย้ายชิ้นพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์ ชิ้นพืชมีการเจริญให้จำนวนและความยาวของรากใหม่เพิ่มสูงขึ้นจากสัปดาห์ที่ 8 ชุดควบคุมมีจำนวนรากใหม่ 12.60 ราก/ชิ้นพืช และรากใหม่มีความยาว 7.47 เซนติเมตร ในกลุ่มสูตรอาหารที่เสริมด้วย BA นั้น จำนวนรากใหม่ (16.70 ราก/ชิ้นพืช) และความยาวรากใหม่ (9.10 เซนติเมตร) สูงสุดพบจากชิ้นพืชที่เคยเลี้ยงบนอาหารที่มี BA เข้มข้น 6 และ 2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ขณะที่ชิ้นพืชซึ่งเคยถูกเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติม mT ร่วมด้วย พบว่า mT เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่มีผลกระทบต่อ การเจริญของรากใหม่น้อยที่สุดในอาหารกลุ่มนี้ เนื่องจากสามารถให้จำนวนและความยาวของรากใหม่ที่ 14.30 ยอด/ชิ้นพืช และ 8.65 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเจริญของรากใหม่ที่สูงที่สุดในกลุ่มอาหารที่เติม mT ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 12 ยังมีความคล้ายคลึงกับสัปดาห์ที่ 8 กล่าวคือ BA มีการเจริญของรากใหม่ที่ดีกว่า mT ในทุกความเข้มข้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (ตารางที่ 2, รูปที่ 4ข) อีกทั้ง BA ยังให้ค่าเฉลี่ยโดยรวมของจำนวนรากใหม่ (14.66 ราก/ชิ้นพืช) และความยาวรากใหม่ (8.10 เซนติเมตร) ที่สูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้ mT (จำนวนรากใหม่ 10.91 ราก/ชิ้นพืช, ความยาวรากใหม่ 7.40 เซนติเมตร)

ตารางที่ 3 การรอดชีวิตของต้นมณีกาญจน์จากอาหารแต่ละสูตรหลังนำออกปลูกลงนอกหลอดทดลองนาน 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ไมโครโมลาร์)	ร้อยละการรอดชีวิต
0 (ชุดควบคุม)	66.67 ± 15.28 ^B
BA 2	83.33 ± 28.87 ^{AB}
BA 4	93.33 ± 11.55 ^A
BA 6	100.00 ^A
BA 8	96.67 ± 5.77 ^A
BA 10	100.00 ^A
BA 15	96.67 ± 5.77 ^A
BA 20	100.00 ^A
mT 2	93.33 ± 5.77 ^A
mT 4	96.67 ± 5.77 ^A
mT 6	100.00 ^A
mT 8	100.00 ^A
mT 10	93.33 ± 5.77 ^A
mT 15	90.00 ± 10.00 ^A
mT 20	93.33 ± 5.77 ^A
F-test	*

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก F-test ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามตารางแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ($p < 0.05$)



รูปที่ 5 การนำต้นมณีกาญจน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเจริญบนอาหารสังเคราะห์แต่ละสูตร มาออกปลูกลงนอกหลอดทดลอง (บาร์ = 3 เซนติเมตร)

3.4 การนำต้นพืชออกปลูกลงนอกหลอดทดลอง

เมื่อนำต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาอนุบาลออกปลูกลงนอกหลอดทดลองครบ 4 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า ต้นพืชจากแต่ละสูตรอาหารมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 66.67 – 100% โดยชุดควบคุมพบอัตราการรอดชีวิตของต้นพืชเมื่อนำออกปลูกต่ำที่สุด (66.67%) อาหารที่เติม BA หรือ mT ร่วมด้วยพบว่าส่วนมากให้อัตราการรอดชีวิตของต้นพืชอยู่ที่ 90% แต่มีเพียงต้นพืชซึ่งผ่านการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์เท่านั้น ที่พบอัตราการรอดชีวิตของต้นพืชที่ 83.33% ทั้งนี้มีเพียงอาหารจำนวน 5 สูตรเท่านั้นที่สามารถทำให้ต้นพืชทุกต้นสามารถมีชีวิตรอดทั้งหมด (100%) เมื่อนำออกปลูกลงนอกหลอดทดลอง (ตารางที่ 3, รูปที่ 5) ผลการทดลองโดยรวมยังพบว่าต้นพืชที่ผ่านการเลี้ยงจากอาหารที่เสริมด้วย BA (95.71%) มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าชุดการทดลอง mT เล็กน้อย (95.24%)

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า BA เหมาะสมต่อการนำมาใช้ขยายพันธุ์ต้นมณีกาญจน์ในหลอดทดลองมากกว่า mT เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าและมีผลกระทบต่ออาการการเกิดรากน้อยกว่า ทั้งนี้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นมณีกาญจน์ในหลอดทดลอง เนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้ได้จำนวนยอดใหม่สูงที่สุดจากทุกชุดการทดลอง คือ 6.90 ยอด/ชิ้นพืช โดยยอดใหม่มีความสูง 12.50 เซนติเมตร ได้รากใหม่จำนวน 14.40 ราก/ชิ้นพืช และรากใหม่มีความยาว 7.65 เซนติเมตร อีกทั้งยังพบว่าต้นพืชที่เจริญจากอาหารสูตรนี้มีอัตราการรอดชีวิต 100% หลังจากนำออกปลูกลงนอกหลอดทดลองนาน 4 สัปดาห์

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำเมล็ดของต้นมณีกาญจน์ที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 1 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงบางชนิดที่พบผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน (Behera *et al.*, 2019; Chuengpanya *et al.*, 2020; 2022) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าต้นมณีกาญจน์มีก้านชูช่อดอกที่ยาว ทำให้ฝักและเมล็ดมีโอกาสสัมผัสกับดินที่ต่ำ อีกทั้งเมล็ดยังมีเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนาและแข็ง จึงทำให้สามารถใช้สารเคมีความเข้มข้นสูงร่วมกับเวลานานระหว่างขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้ ถึงแม้เมล็ดของต้นมณีกาญจน์จะเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นชิ้นพืชเริ่มต้นเนื่องจากไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ แต่เมล็ดมีอัตราการงอกเพียง 30% หลังจากเพาะในสภาพปลอดเชื้อนาน 24 สัปดาห์ โดยอาจเป็นผลจากการที่งานวิจัยนี้อาจใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นสูงหรือใช้ระยะเวลาการฟอกเมล็ดที่นานเกินไป (คลอโรกซ์เข้มข้น 20% ตามด้วย 15% ปริมาตร/ปริมาตร นานครั้งละ 15 นาที) ทั้งนี้ Vargas และ Flota (2005) ได้บ่งชี้ว่ากรรมวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวสามารถส่งผลกระทบต่อเจริญของเนื้อเยื่อหรือชิ้นพืชภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้ ดังนั้นหากไม่มีข้อจำกัดในการได้มาซึ่งตัวอย่างเมล็ด ควรมีการศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้มาซึ่งการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่ำและการงอกของเมล็ดต้นมณีกาญจน์ที่สูงภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ด นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดต้นมณีกาญจน์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเพิ่มเติมต่อไป ซึ่งการศึกษาในพืชวงศ์ขิงบางชนิด เช่น การเพาะเมล็ดของต้นมหาหงส์ในหลอดทดลองพบว่าการเติมสารควบคุมการเติบโตกรดจิบเบอเรลลิน (GA_3) ลงในอาหารสังเคราะห์สามารถกระตุ้นให้เมล็ดมีอัตราการงอกเพิ่มสูงขึ้น (Behera *et al.*, 2019) แม้การใช้เมล็ดเป็นชิ้นพืชเริ่มต้นนี้จะอาศัยระยะเวลาในการงอก แต่ก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตต้นพืชในระดับอุตสาหกรรมได้ดังที่พบในการขยายพันธุ์พืชวงศ์ขิงบางชนิด (Behera *et al.*, 2019; Chuengpanya *et al.*, 2022)

การศึกษานี้เลือกใช้ส่วนโคนลำต้นเป็นชิ้นพืชทดลอง เพราะสามารถตัดได้ง่าย รวดเร็ว ซึ่งตลอดการศึกษานี้พบว่ายอดใหม่เจริญจากบริเวณส่วนโคนของชิ้นพืชทดลองโดยตรงผ่านกระบวนการ direct organogenesis ซึ่งคล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *C. candida*

(Chuengpanya *et al.*, 2019) และพืชวงศ์ขิงบางชนิด (Chuengpanya *et al.*, 2020; 2022) เนื่องจากส่วนโคนของลำต้นเหนือดินของพืชวงศ์ขิงจะมีเนื้อเยื่อเจริญและตาข้างอยู่ จึงสามารถเจริญเป็นยอดใหม่ได้ (Larsen & Larsen, 2006) โดยข้อดีของการเกิดพืชผ่านกระบวนการนี้คือ ได้ต้นพืชที่ตรงตามพันธุ์ (Das *et al.*, 2010) ขณะที่ Mohanty *et al.* (2008) พบว่าการเกิดยอดใหม่ของต้น *C. aromatica* ที่เจริญผ่านกลุ่มเซลล์แคลลัสพบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) โดยยอดใหม่บางส่วนมีระดับพลอยดีที่ต่างไปจากต้นแม่ซึ่งเป็นพืช 2X เมื่อนำส่วนโคนลำต้นของต้นมณีกาญจน์ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ชุดควบคุม หรือเสริมด้วย BA และ mT นาน 8 สัปดาห์ ทุกสูตรอาหารชักนำให้เกิดยอดใหม่ในจำนวนและความสูงที่ต่างกันไป ซึ่งการพบยอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชที่เลี้ยงบนสูตรอาหารชุดควบคุมนี้ อาจเป็นเพราะชิ้นพืชมีการสะสมของสารต่าง ๆ รวมถึงสารควบคุมการเติบโตที่เพียงพอต่อการทำให้เกิดยอดใหม่ได้ (Chuengpanya *et al.*, 2022) ซึ่งต่างไปจากการทดลองในต้น *C. karnatakensis* ที่ไม่พบการเจริญของยอดใหม่เมื่อเลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเติบโต (Shanthala *et al.*, 2020) ผลการทดลองยังพบว่าจำนวนและความสูงของยอดใหม่ในสูตรอาหารที่เติม BA และ mT มีการเจริญของยอดใหม่ที่สูงกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้เป็นเพราะสารทั้งสองชนิดเป็นสารควบคุมการเติบโตของพืชในกลุ่มไซโทไคนิน จึงออกฤทธิ์โดยตรงต่อการส่งเสริมให้เกิดยอดใหม่ผ่านกระบวนการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การทำลายการพักตัวของตาข้าง การทำลายอิทธิพลการข่มของตายอดสู่ตาข้าง (George *et al.*, 2008) และเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ด้วยแสง (Fuadi *et al.*, 2014; Skalák *et al.*, 2019) หรือส่งเสริมให้เกิดการยืดยาวของยอดผ่านกระบวนการควบคุมและขยายขนาดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเจริญ (Skalák *et al.*, 2019) ถึงแม้ไซโทไคนินจะส่งเสริมการเจริญของยอดใหม่แต่ต้องใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพราะ การเพิ่มความเข้มข้นของ BA เกินกว่า 10 และ 4 ไมโครโมลาร์ หรือใช้ความเข้มข้นของ mT เกินกว่า 6 และ 2 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้จำนวนและความสูงของยอดใหม่ของต้นมณีกาญจน์ลดลงตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายรายงานทั้งในกรณีของ BA (Bharalee *et al.*, 2005; Chuengpanya *et al.*, 2019; 2020; 2022; Das *et al.*, 2010; Khumaida *et al.*, 2019; Shanthala *et al.*, 2020; Sharmin *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2004; Yusuf *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011)

หรือ mT (Behera *et al.*, 2019; Elayaraja *et al.*, 2019; Erisen *et al.*, 2020; Khanam *et al.*, 2020) การใช้ความเข้มข้นของโซโทโคตินสูงเกินกว่าระดับที่เหมาะสม นอกจากจะทำให้ต้นพืชอยู่ในสภาวะเครียดแล้ว ยังยับยั้งการแบ่งเซลล์ได้ (Carimi *et al.*, 2003) เหตุเหล่านี้จึงทำให้โซโทโคตินที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ยับยั้งหรือชะลอการชักนำให้เกิดยอดใหม่ (George *et al.*, 2008) ขณะเดียวกันโซโทโคตินมีฤทธิ์ทำให้ต้นพืชเกิดการสร้างก๊าซเอทิลีนขึ้นในหลอดทดลอง (Lledo *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซโทโคตินในอาหารเลี้ยงส่งผลให้มีปริมาณก๊าซเอทิลีนในหลอดทดลองเพิ่มสูงขึ้น ซึ่ง Brar *et al.* (1999) พบว่าการเติมสารยับยั้งการสร้างก๊าซเอทิลีนลงในอาหารสังเคราะห์ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *Vigna unguiculata* ทำให้ต้นพืชมีความสูงที่มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่ ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าการเกิดก๊าซเอทิลีนในหลอดทดลองส่งผลกระทบต่อความสูงและการยืดยาวของต้นพืชได้

โดยปกติแล้วโซโทโคตินมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดรากเนื่องจากเป็นสารที่ออกฤทธิ์ตรงข้ามกับออกซินซึ่งเป็นสารควบคุมการเติบโตของพืชที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดราก (George *et al.*, 2008) แต่ผลการทดลองที่สัปดาห์ที่ 8 พบว่าต้นพืชสามารถเกิดรากได้เอง จึงอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของโซโทโคตินที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่ยับยั้งการเจริญของราก ทั้งนี้พืชวงศ์ชิงหลายชนิดก็พบผลการทดลองในลักษณะนี้เช่นกัน (Behera *et al.*, 2019; Chuengpanya *et al.*, 2019; 2020; 2022; Bharalee *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2010; Kusumastuti *et al.*, 2014; Shanthala *et al.*, 2020; Yusuf *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้พบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของ BA เกินกว่า 6 และ 4 ไมโครโมลาร์ หรือใช้ความเข้มข้นของ mT เกินกว่า 2 ไมโครโมลาร์ ส่งผลทำให้จำนวนและความยาวของรากใหม่มลดลง ซึ่งคล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ชิงหลายรายงาน (Behera *et al.*, 2019; Chuengpanya *et al.*, 2019; 2020; 2022; Kusumastuti *et al.*, 2014; Shanthala *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2007) เป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซโทโคตินมีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดรากได้ (Bianco *et al.*, 2013) และยังสามารถเป็นไปได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซโทโคตินในอาหารสังเคราะห์ส่งผลต่อสมดุลความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตภายในต้นพืชให้มีระดับของโซโทโคตินที่สูงกว่าออกซิน จึงเป็นผลให้รากใหม่เจริญลดลง (George *et al.*, 2008)

จากการที่ต้นมณีกาญจน์สามารถเกิดรากได้เองแม้ถูกเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วยโซโทโคติน ดังนั้นอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเติบโตของพืช จึงถูกนำมาใช้เพื่อให้รากมีการพัฒนามากยิ่งขึ้น และเป็นการปรับสภาพต้นพืชให้พร้อมต่อการนำออกปลูกนอกหลอดทดลอง โดย George *et al.* (2008) ได้กล่าวว่าการใช้อาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเติบโตของพืชเป็นการช่วยปรับสมดุลของสารควบคุมการเติบโตภายในต้นพืช และช่วยลดผลกระทบจากสารควบคุมการเติบโตที่ต้นพืชได้รับจากขั้นตอนก่อนหน้า ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ชิงหลายชนิดก็ได้ใช้วิธีการเช่นเดียวกันนี้ในการชักนำรากใหม่ระหว่างการขยายพันธุ์ต้นพืชในหลอดทดลอง (Chuengpanya *et al.*, 2019; 2022; Lo-Apirukkul *et al.*, 2012) ผลการศึกษาเมื่อเลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโตครบ 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์แต่ละสูตรให้ผลการเจริญของยอดและรากใหม่เพิ่มมากขึ้น หากแต่มีจำนวนหรือความยาวของยอดหรือรากใหม่ที่แตกต่างกันไปในอาหารแต่ละสูตร โดยจำนวนยอดใหม่ ความสูงยอดใหม่ จำนวนรากใหม่ และความยาวรากใหม่ที่สูงที่สุดในทั้ง 15 ชุดการทดลอง พบจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 10, 4, 6 และ 2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ทั้งยังพบว่าการเจริญของยอดและรากใหม่มลดลงเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ BA ไปจากระดับข้างต้น หรือเปลี่ยนไปใช้ mT ผลการทดลองนี้เป็นข้อบ่งชี้ว่าโซโทโคตินสามารถส่งผลกระทบต่อผลการเจริญของต้นพืชได้เป็นระยะเวลาหนึ่งภายหลังเลิกใช้ ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ชิงบางชนิดที่พบผลการทดลองในทำนองเดียวกัน (Chuengpanya *et al.*, 2019; 2022) ดังนั้นการพิจารณาเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของโซโทโคตินให้เหมาะสมระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง

ผลการทดลองตลอดทั้ง 12 สัปดาห์ พบว่า BA ส่งผลให้เกิดการเจริญของยอดและรากใหม่ของต้นมณีกาญจน์ดีกว่า mT ทั้งในระดับความเข้มข้นเดียวกันหรือที่ระดับภาพรวม ซึ่งต่างไปจากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดที่พบว่า mT ช่วยปรับปรุงการเกิดยอดและรากใหม่ได้ (Behera *et al.*, 2019; Elayaraja *et al.*, 2019; Erisen *et al.*, 2020; Khanam *et al.*, 2020; Kumari *et al.*, 2017) โดยทั่วไปแล้ว เมื่อ mT ถูกย่อยสลายจะสามารถให้โซโทโคตินที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (free base cytokinin) ในปริมาณที่สูงกว่า BA (Abdouli *et al.*, 2022) อีกทั้งผลิตภัณฑ์หลักหลังถูกย่อยสลายของ

mT คือ *O*-glucosides ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็นไซโทโคนินที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า 9-glucosides ที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักหลังถูกย่อยสลายของ BA (Bairu *et al.*, 2011; Werbrouck *et al.*, 1996) นอกจากนี้ mT ยังมีส่วนช่วยทำให้ปริมาณของคลอโรฟิลล์ (Aremu *et al.*, 2012) และอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น (Catský *et al.*, 1996) ด้วยเหตุเหล่านี้ จึงทำให้ mT มีคุณสมบัติต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่า BA ทั้งนี้ การที่ mT ช่วยลดหรือป้องกันลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ระหว่างการขยายพันธุ์พืชได้ดีกว่า BA อันประกอบด้วยการปรับปรุงการออกรากใหม่ (Behera *et al.*, 2019) ลดการตายของเนื้อเยื่อปลายยอด (Teixeira da Silva *et al.*, 2020) และลดการฉ่ำน้ำ (Abdouli *et al.*, 2022) อาจเป็นเพราะ mT เมื่อถูกย่อยสลายแล้วจะมีปริมาณของไซโทโคนินในต้นพืชโดยรวม (whole plant total cytokinin pool) และไซโทโคนินที่ไม่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (inactive cytokinin) จำพวก N-glucosides เช่น 7- หรือ 9-glucosides ที่ต่ำกว่า BA มาก (Abdouli *et al.*, 2022; Bairu *et al.*, 2011) ทำให้มีไซโทโคนินตกค้างในเนื้อเยื่อของต้นพืชไม่มากจนเกินไป ต้นพืชจึงไม่มีสภาวะเครียดและสามารถเจริญได้ตามปกติ อย่างไรก็ตาม พืชแต่ละชนิดมีลักษณะทางพันธุกรรมและมีความสามารถในการทนต่อฤทธิ์ของไซโทโคนินที่แตกต่างกัน การที่ mT จัดเป็นไซโทโคนินที่ออกฤทธิ์แรง และสามารถเพิ่มปริมาณไซโทโคนินที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายในต้นพืชได้สูงกว่า BA นั้น อาจทำให้พืชบางชนิดรวมถึงต้นมณีกาญจน์ไม่สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ ซึ่งความเข้มข้นของไซโทโคนินในเนื้อเยื่อพืชที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งหรือชะลอการเกิดอวัยวะใหม่ (George *et al.*, 2008) และมีผลเป็นพิษต่อเซลล์พืชได้ (Carimi *et al.*, 2003) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดที่พบว่าการใช้ BA สามารถชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่ได้ดีกว่าการใช้ไซโทโคนินฤทธิ์แรง เช่น 2iP (Sharmin *et al.*, 2013) หรือ TDZ (Chuengpanya *et al.*, 2022)

จากการที่ปากใบของต้นพืชในหลอดทดลองมีการทำงานและรูปร่างที่ผิดปกติไปจากสภาวะธรรมชาติ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นสภาวะที่มีความชื้นสูง ประกอบกับความเข้มแสงที่ใช้ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นความเข้มที่ต่ำกว่าแสงจากดวงอาทิตย์ ดังนั้นการปรับสภาพต้นพืชเพื่อให้สามารถรอดชีวิตได้หลังจากนำมาออกปลูกลงหลอดทดลองจึงเป็นสิ่งสำคัญ (Chandra *et al.*, 2010) การศึกษานี้จึงคลุมถุงเพาะชำที่ปลูกลงต้นมณีกาญจน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย

ถุงพลาสติกใสเพื่อปรับสภาพการทำงานของปากใบให้กลับมาเป็นปกติ ควบคู่ไปกับการเก็บชุดปลูกในโรงเรือนที่มีการพร่างแสง 40% เพื่อให้ต้นพืชมีการปรับสภาพและสามารถใช้ความเข้มแสงที่สูงขึ้นในการดำรงชีวิตต่อไปได้ หลังจากนำต้นมณีกาญจน์ไปออกปลูกลงดินปลูกสำเร็จรูปที่ผสมก้ามมะพร้าวสับเพื่อเสริมความร่วนซุยและช่วยในการระบายของน้ำและอากาศนาน 4 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชที่เจริญมาจากแต่ละสูตรอาหารมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน โดยมีเพียงอาหารจำนวน 5 สูตรเท่านั้นที่ทำให้ต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิต 100% ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการออกปลูกในต้น *C. candida* ที่พบว่าต้นพืชจากแต่ละสูตรอาหารให้อัตราการรอดชีวิตหลังนำออกปลูกที่แตกต่างกัน (Chuengpanya *et al.*, 2019) โดยอาจเป็นเพราะสารควบคุมการเติบโตของพืชสามารถส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและการพัฒนาของเนื้อเยื่อลำเลียง (vascular tissue) และการเชื่อมต่อกันของเนื้อเยื่อลำเลียงระหว่างส่วนยอดและรากได้ (Roberts *et al.*, 1998) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดตลอดจนความเข้มข้นของสารควบคุมการเติบโตระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่แตกต่างกันสามารถส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของเนื้อเยื่อลำเลียงหรือการเชื่อมติดกันของเนื้อเยื่อลำเลียงระหว่างส่วนยอดและรากได้ จึงทำให้ต้นพืชจากแต่ละสูตรอาหารมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่างกันเมื่อออกปลูกลงนอกหลอดทดลอง

5. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ต้นมณีกาญจน์ในหลอดทดลอง ซึ่งใช้ระยะเวลา 40 สัปดาห์ (การเพาะต้นกล้าจากเมล็ดปลอดเชื้อ 24 สัปดาห์ การขยายพันธุ์ต้นพืชในหลอดทดลอง 12 สัปดาห์ และการนำออกปลูกลงหลอดทดลอง 4 สัปดาห์) ผลการศึกษาพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ เนื่องจากสามารถชักนำให้ต้นมณีกาญจน์เกิดยอดใหม่จำนวนมากที่สุด (6.90 ยอด/ชิ้นพืช) โดยมีผลกระทบเล็กน้อยถึงปานกลางต่อความสูงของยอดใหม่และการเจริญของรากใหม่ อีกทั้งต้นพืชที่ได้จากอาหารสูตรนี้ยังมีอัตราการรอดชีวิต 100% เมื่อนำออกปลูกลงหลอดทดลอง ผลการศึกษายังบ่งชี้ว่า BA สามารถชักนำให้ต้นมณีกาญจน์เกิดยอดและรากใหม่ได้มากกว่า ทั้งยังมีผลกระทบต่อการทำงานของต้นพืชที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ mT ดังนั้นวิธีการขยายพันธุ์ต้นมณี

กาญจน์ให้ได้จำนวนมากจากการศึกษานี้จึงเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนการผลิตพืชไม่สูง เพราะ BA เป็นสารควบคุมการเติบโตของพืชที่สามารถหาได้ง่ายและมีราคาไม่แพง วิธีที่ได้จากการศึกษานี้ นอกจากจะใช้เป็นเครื่องมือเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ต้นแม่กาญจน์แล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อส่งเสริมต่อการผลักดันให้เป็นไม้ประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย หรือประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านปรับปรุงพันธุ์อันจะเป็นการเพิ่มคุณค่าของพืชชนิดนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยมหิดล และทุนสนับสนุนบางส่วนจากโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย)

เอกสารอ้างอิง

- Abdouli, D., Placková, L., Doležal, K., Bettaieb, T., & Werbrouck, S. P. (2022). Topolin cytokinins enhanced shoot proliferation, reduced hyperhydricity and altered cytokinin metabolism in *Pistacia vera* L. seedling explants. *Plant Science*, 322, 111360. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111360>
- Aremu, A. O., Bairu, M. W., Szűcsová, L., Doležal, K., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2012). Assessment of the role of meta-topolins on *in vitro* produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' banana. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 2265–2273
- Auer, C. A., Motyka, V., Brezinová, A., & Kamínek, M. (1999). Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. *Physiologia Plantarum*, 105(1), 141–147.
- Bairu, M. W., Novák, O., Doležal, K., & Van Staden, J. (2011). Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 105–114.
- Behera, S., Kar, S. K., Rout, K. K., Barik, D. P., Panda, P. C., & Naik, S. K. (2019). Assessment of genetic and biochemical fidelity of field-established *Hedychium coronarium* J. Koenig regenerated from axenic cotyledonary node on meta-topolin supplemented medium. *Industrial Crops and Products*, 134, 206–215.
- Bharalee, R., Das, A., & Kalita, M. C. (2005). *In vitro* clonal propagation of *Curcuma caesia* Roxb and *Curcuma zedoaria* Rosc from rhizome bud explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14(1), 61–63.
- Bianco, D. M., Giustini, L., & Sabatini, S. (2013). Spatiotemporal changes in the role of cytokinin during root development. *New Phytologist*, 199(2), 324–328.
- Boonkorkaew, P., Suksathan, P., & Yangkhamman, P. (2013). *Development of Globba for Commercial Purpose and Agricultural Technology*. National Research Council of Thailand. (in Thai)
- Brar, M. S., Moore, M. J., Al-Khayri, J. M., Morelock, T. E., & Anderson, E. J. (1999). Ethylene inhibitors promote *in vitro* regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35(3), 222–225.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., & Schiavo, F. L. (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216(3), 413–421.
- Catský, J., Pospíšilová, J., Kamínek, M., Gaudinová, A., Pulkrábek, J., & Zahradníček, J. (1996). Seasonal changes in sugar beet photosynthesis as affected by exogenous cytokinin N⁶-(m-hydroxybenzyl) adenosine. *Biologia plantarum*, 38(4), 511–518.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32(9), 1199–1205.
- Chuangpanya, R., Chuenboonngarm, N., Kongtook, N., Longsaward, R., Nopporncharoenkul, N., Muangkroot, A., Jenjittikul, T., & Soonthornchainaksaeng, P. (2019). *In vitro* propagation of *Curcuma candida* (Wall.) Techapr., & Škornick., a vulnerable plant of Thailand. *Srinakharinwirot Science Journal*, 35(2), 31–50. (in Thai)
- Chuangpanya, R., Karoojee, S., Lekbamroong, M., Muangkroot, A., & Chuenboonngarm, N. (2020). Effect of N⁶-benzyladenine on *in vitro* propagation of *Hedychium coccineum* Buch.-Ham. ex Sm. and *Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm. *Srinakharinwirot Science Journal*, 36(2), 91–107. (in Thai)
- Chuangpanya, R., Muangkroot, A., Jenjittikul, T., Thammasiri, K., Umpunjun, P., Viboonjun, U., & Chuenboonngarm, N. (2022). *In vitro* propagation and genetic fidelity assessment of *Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker, a vulnerable Zingiberaceous plant of Thailand. *Current Applied Science and Technology*, 22(6), 21. <https://doi.org/10.55003/cast.2022.06.22.012>
- Das, A., Kesari, V., & Rangan, L. (2010). Plant regeneration in *Curcuma* species and assessment of genetic stability of regenerated plants. *Biologia Plantarum*, 54(3), 423–429.
- Debergh, P. C., & Zimmerman, R. H. (1991). *Commercial micropropagation in Asia*. Kluwer Academic Publishers.
- Elayaraja, D., Subramanyam, K., Vasudevan, V., Sathish, S., Kasthurirengan, S., Ganapathi, A., & Manickavasagam, M. (2019). Meta-Topolin (mT) enhances the *in vitro* regeneration frequency of *Sesamum indicum* (L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101320>
- Erisen, S., Kurt-Gür, G., & Servi, H. (2020). *In vitro* propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants. *Industrial Crops and Products*, 157, 112892. <https://doi.org/10.1016/j.indcro.2020.112892>
- Fuadi, M., Mohamed, M. T. M., Salleh, N. S., Anwar, M. P., Awang, Y., & Fauzi, R. M. (2014). Effect of different concentrations of benzyladenine and frequency of watering on growth and quality of *Dracaena sanderiana* and *Codiaeum variegatum*. *Journal of Environmental Biology*, 35(6), 1047–1052.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture – Volume 1 The Background* (3rd ed). Springer.
- Khanam, M. N., Javed, S. B., Anis, M., & Alatar, A. A. (2020). Meta-Topolin induced *in vitro* regeneration and metabolic profiling in *Allamanda cathartica* L. *Industrial Crops and Products*, 145, 111944. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111944>
- Khumaida, N., Ardie, S. W., Setiadi, A., & Artiningsih, L. N. (2019). *In vitro* multiplication and acclimatization of black galingale (*Curcuma aeruginosa* Roxb.). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(4), 110–116.
- Kumari, A., Baskaran, P., & Van Staden, J. (2017). *In vitro* regeneration of *Begonia homonyma* – a threatened plant. *South African Journal of Botany*, 109, 174–177.

- Kusumastuti, M. Y., Bhatt, A., Indrayanto, G., & Keng, C. L. (2014). Effect of sucrose, benzylaminopurine and culture condition on *in vitro* propagation of *Curcuma xanthorrhiza roxb.* and *Zingiber aromaticum* val. *Pakistan Journal of Botany*, 46(1), 280–289.
- Larsen, K., & Larsen, S. (2006). *Ginger of Thailand*. Queen Sirikit Botanic Garden, The Botanical Garden Organization.
- Leong-Škornicková, J., Soonthornkalump, S., & Suksathan, P. (2020). *Curcuma cinnabarina* and *C. eburnea* (Zingiberaceae: Zingiberoideae), two new species from Thailand. *Edinburgh Journal of Botany*, 77(3), 391–402.
- Leong-Škornicková, J., Soonthornkalump, S., & Thongbai, W. (2021). Four new *Curcuma* species (Zingiberaceae) from Thailand. *Blumea*, 65, 244–253.
- Lledo, M. D., Crespo, M. B., & Amo-Marco, J. B. (1995). The role of cytokinins and ethylene inhibitors on lenticel hypertrophy generation and ethylene production in *in vitro* cultures of *Populus euphratica* Olivier. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43(4), 339–345.
- Lo-Apirukkul, S., Jenjittikul, T., Saralamp, P., & Prathanurag, S. (2012). Micropropagation of a Thai medicinal plant for women's health, *Curcuma comosa* Roxb., via shoot and microrhizome inductions. *Journal of Natural Medicines*, 66(2), 265–270.
- Mohanty, S., Panda, M. K., Subudhi, E., & Nayak, S. (2008). Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. *Biologia Plantarum*, 52, 783–786.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473–497.
- Roberts, L. W., Gahan, P. B., & Aloni, R. (1988). *Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators*. Springer-Verlag.
- Saensouk, S. (2011). Endemic and rare plants of ginger family in Thailand. *KKU Research Journal*, 16(3), 306–329. (in Thai)
- Saensouk, S., Boonma, T., & Saensouk, P. (2021). Six new species and a new record of *Curcuma* L. (Zingiberaceae) from Thailand. *Biodiversitas*, 22, 1658–1685.
- Shanthala, A. A., Dilkalal, A., & Umesh, T. G. (2020). An efficient *in vitro* approach for direct and callus mediated regeneration of *Curcuma karnatakensis* – an endemic plant of Karnataka. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 3, 229–241.
- Sharmin, S. A., Alam, M. J., Sheikh, M. M. I., Zaman, R., Khalekuzzaman, M., Mondal, S. C., Haque, M. A., Alam, M. F., & Alam, I. (2013). Micropropagation and antimicrobial activity of *Curcuma aromatica* Salisb., a threatened aromatic medicinal plant. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 698–708.
- Shukla, S. K., Shukla, S., Koche, V., & Mishra, S. K. (2007). *In vitro* propagation of tikur (*Curcuma angustifolia* Roxb.): a starch yielding plant. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 274–276.
- Sirirugsa, P., Larsen, K., & Maknoi, C. (2007). The genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae): distribution and classification with reference to species diversity in Thailand. *Gardens' Bulletin Singapore*, 59, 203–220.
- Skalák, J., Vercruyssen, L., Claeys, H., Hradilová, J., Cerný, M., Novák, O., Placková, L., Saiz-Fernández, I., Skaláková, P., Coppens, F., & Dhondt, S. (2019). Multifaceted activity of cytokinin in leaf development shapes its size and structure in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 97(5), 805–824.
- Soonthornkalump, S., Puangpairote, T., Niwesrat, S., & Leong-Škornicková, J. (2021). *Curcuma lithophila* and *C. rufostriata* (Zingiberaceae), two new species from Thailand, and additional notes on *C. papilionacea*. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, 49(1), 32–43.
- Strnad, M., Hanuš, J., Vanek, T., Kamínek, M., Ballantine, J. A., Fussell, B., & Hanke, D. E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* Moench., cv. Robusta). *Phytochemistry*, 45(2), 213–218.
- Teixeira da Silva, J. A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., Márton, L., & Landin, M. (2020). Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta*, 252, 47. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>
- Tran, T. L., Cao, N. G., Tran, M. N., Nguyen, M. K., Ha, V. L., & Ly, N. S. (2019). First record of *Curcuma sparganiiifolia* Gagnep. (Zingiberaceae) from Vietnam. *Bioscience Discovery*, 10(1), 10–15.
- Tyagi, R. K., Yusuf, A., Dua, P., & Agrawal, A. (2004). *In vitro* plant regeneration and genotype conservation of eight wild species of *Curcuma*. *Biologia Plantarum*, 48(1), 129–132.
- Vargas, V. M., & Flota, F. V. (2005). *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press.
- Wannakraioj, S. (1996). *Curcuma: Ornamentals*. Amarín Printing & Publishing Public Co. (in Thai).
- Wannakraioj, S. (2008). Status of ornamental plants in Thailand. *Acta Horticulturae*, 788, 29–36.
- Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Van Onckelen, H. A., & Debergh, P. C. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 98, 291–297.
- Yusuf, N. A., Khalid, N., & Ibrahim, H. (2007). Establishment of tissue culture for selected medicinal *Curcuma* spp. *Malaysian Journal of Science*, 26(1), 85–91.
- Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G., & Wu, G. (2011). Direct and callus-mediated regeneration of *Curcuma soloensis* Valetton (Zingiberaceae) and *ex vitro* performance of regenerated plants. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 899–905.