NU Science Journal 2006; 2(2): 183 - 201

ผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว

อนุพันธ์ กงบังเกิด* และพันธิตรา กมล

Effect of Cytokinins and Auxins on Development of *Curcuma parviflora* Wall. Cultured *in vitro*

Anupan Kongbangkerd* and Panthitra Kamol

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

*Corresponding author. E-mail: anupank73@hotmail.com

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นที่ปลอดเชื้อของกระเจียวขาวพันธุ์ป่าบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน BAP Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดได้มากที่สุด คือ 2.7 ยอดต่อชิ้นส่วน และในการทดลองชักนำให้เกิดรากจากต้นใหม่ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน NAA, IAA และ IBA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากได้สูงสุดคือ 8.06 รากต่อชิ้นส่วน สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA (0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ BAP (0, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงสุด (2.88 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด (8.33 รากต่อชิ้นส่วน) ทั้งนี้ไม่พบการสร้างแคลลัสขึ้นบนชิ้นส่วนใดๆ และพืชต้นใหม่ที่มีขนาดต้นสูงประมาณ 5-10 เซนติเมตร ที่ได้จากการทดลอง สามารถย้ายออกปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมปกติ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไซโตไคนิน ออกซิน กระเจียวขาว

Abstract

In vitro shoot culture of *Curcuma parviflora* Wall. was conducted on Murashige and Skoog (MS) (1962) basal medium supplemented with various concentrations (0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 mg/l) of BAP, Kinetin and TDZ for 6 weeks. The results indicated that the highest number of shoots (2.7 shoots per explant) could obtain when cultured on medium with 0.5 mg/l TDZ. *In vitro* rooting of regenerated shoots was performed on medium with various auxins (NAA, IAA and IBA) at 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 mg/l for 6 weeks. The results revealed that the highest root induction number (8.06 roots per shoot) was received when cultured on medium with 2.0 mg/l NAA. *In vitro* morphogenesis of cultured shoots was also performed on MS medium with a combination of NAA (0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/l) and BAP (0, 1.0, 2.0, and 5.0 mg/l) for 6 weeks. The results showed that the highest shoot number (2.88 shoots per explant) were obtained when cultured on medium with 5.0 mg/l BAP only whereas the highest root induction number (8.33 roots per shoot) were found on medium with 0.5 mg/l NAA alone. However, no callus formation was observed in all culture medium. Complete plants with 5-10 centimeters in length could be transferred to grow well under normal environment with a highest percentage of survival (78.3 %) after 4 weeks of transplantation.

Keywords: Tissue culture, Cytokinins, Auxins, *Curcuma parviflora* Wall

บทนำ

กระเจียวขาว (*Curcuma parviflora* Wall.) โดยทั่วไปมีอายุหลายปี ลำต้นมีเหง้ารูปกลมอยู่ใต้ดิน ใบ มี 2 แบบ แบบแรกเป็นกาบใบที่ซ้อนกันขึ้นมาเป็นลำต้นเทียม ส่วนแบบที่สองเป็นใบเดี่ยว มี 4 ใบ ซึ่งจะออกจากเหง้าขึ้นมาพร้อมกัน 2 ใบ อีก 2 ใบจะออกพร้อมช่อดอก ใบรูปขอบขนาน กว้าง 5-7 เซนติเมตร ยาว 20-25 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนกลมมน ก้านใบยาว 10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตั้งที่ยอด ก้านช่อยาว 15-23 เซนติเมตร ช่อดอกจะประกอบไปด้วยกาบดอกหรือใบประดับรูปกรวยที่เรียงซ้อนกันแน่นเป็นช่อ สูง 5-10 เซนติเมตร โคนช่อมีสีเขียว ปลายช่อสีขาวและมีขนาดของใบประดับยาวกว่าเล็กน้อย ดอกเป็นหลอดรูปกรวยสีขาวออกตามซอกใบประดับบริเวณโคนช่อ ปลายดอกแยกเป็น 3 กลีบ มีสีม่วงอมน้ำเงินหรือสีม่วงและมีเส้นสีม่วงหรือสีแดงพาดตามความยาวที่โคนกลีบด้านใน 2-3 เส้น ขอบกลีบหยักถี่ ออกดอกในราวเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนสิงหาคม

มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบมากในแถบมาเลเซีย ไทย พม่า เกาะสุมาตรา และเขตอินโดจีน

ในปัจจุบันมีการส่งเสริมให้ปลูกกระเจียวขาวเพื่อการค้ามากขึ้น ตลาดต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกาและโปรตุเกส โดยมีชื่อทางการค้าคือ “เทพรำลึก” (*C. parviflora* “white angle”) ดอกกระเจียวขาวมีลักษณะดอกสวยงาม ก้านดอกยาวพอประมาณ กลีบดอกแข็งคงทน สามารถใช้เป็นไม้ดอกไประดับได้ดี การส่งออกกระเจียวขาวจะอยู่ในรูปของหัวพันธุ์ เหง้าและตัดดอกส่งต่างประเทศ การขยายพันธุ์โดยทั่วไปจะปลูกโดยนำเหง้าปลูกในดินร่วนปนทราย แต่ปัญหาที่พบคือ โรคเหี่ยวเน่า ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Rolstonia solanacearum* โรคนี้สามารถแพร่ระบาดและสร้างความเสียหายอย่างมาก ซึ่งพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมีการแนะนำไม่ให้เกษตรกรใช้ที่ดินปลูกกระเจียวขาวหรือพืชอื่นที่เป็นตระกูลใกล้เคียงเช่น พริก มะเขือ ยาสูบ เป็นต้น ระยะเวลาตามธรรมชาติจะต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตนานและในหนึ่งหัวให้จำนวนต้นไม่แน่นอน ดังนั้นการขยายพันธุ์กระเจียวโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีที่ให้จำนวนต้นเป็นจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้นโดยใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยและต้นที่ได้มีความสมบูรณ์ ปราศจากโรค จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับขยายพันธุ์กระเจียวขาว

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดย Skoog และคณะ (1957) พบว่า การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นหรือรากขึ้นอยู่กับความสมดุลของฮอร์โมนระหว่างออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (Cytokinin) ซึ่งจากพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับอิทธิพลของฮอร์โมนต่อการเจริญเติบโตของพืชจึงนำมาสู่การควบคุมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อตามที่เราต้องการได้ ดังนั้นในปัจจุบัน ฮอร์โมนพืชได้เข้ามามีบทบาทที่สำคัญอย่างมากสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืช ฮอร์โมนพืชที่นิยมนำมาใช้คือ ไซโตไคนิน และออกซิน ดังมีตัวอย่างรายงานการวิจัยหลายฉบับเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ฮอร์โมนดังกล่าว เช่น งานวิจัยของ Hosoki และ Sagawa (1977), Iden และคณะ (1988), Balachandran และคณะ (1990), Dekkers และคณะ (1991) และ Chin-Yi Lu (1993) เป็นต้น สำหรับการทดลองเกี่ยวกับผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชสกุลกระเจียว หรือ *Curcuma sp.* นั้น พบมีรายงานบ้าง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของฮอร์โมนต่างๆ โดยตรงที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ กระเจียวขาวนั้นยังมีไม่มากนัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนไซโตไคนินและออกซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของกระเจียวขาว รวมทั้งศึกษาถึงผลของไซโตไคนินร่วมกับออกซิน ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของกระเจียวขาวในหลอดทดลอง อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทดลองต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเหง้ากระเจียวขาว

นำเหง้าของกระเจียวขาวที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก มาล้างน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตัดรากออก แล้วแช่ทิ้งไว้ในสารละลายผสมเบนเลท 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเหง้าที่ได้มาล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา 10-15 นาที ลอกกาบชั้นนอกสุดของเหง้าออก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้น แช่ลงในสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วย้ายลงแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 10-15 นาที ตามด้วยการแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) อีก 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 4-5 ครั้ง

ทำการตัดย้ายเฉพาะส่วนของตาเหง้าของกระเจียวขาววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมฮอร์โมน ทำการเลี้ยงในสภาพมีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส แสงสว่างจากหลอดไฟเรืองแสงสีขาว (white light fluorescence) ความเข้มแสงประมาณ 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่ โดยยอดใหม่ของกระเจียวขาวที่แตกออกจากตาเหง้าที่ได้ จะนำไปใช้สำหรับการทดลองต่างๆ ต่อไป

การทดลองที่ 1 ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว

นำชิ้นส่วนต้นกระเจียวขาวที่แตกออกจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงตาเหง้า มาตัดใบและรากออกให้มีความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ BA, Kinetin และ TDZ ซึ่งแปรผันความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ผลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดรากจากต้นกระเจียวขาว

ตัดแยกต้นกระเจียวขาวที่ชักนำให้เกิดขึ้นจากการทดลองที่ 1 โดยคัดให้มีขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็งครึ่งสูตรและเต็มสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ IAA, IBA และ NAA แปรผันความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 ผลของไซโตไคนินร่วมกับออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยากระเจียวขาว

นำชิ้นส่วนต้นกระเจียวขาวที่ได้จากการชักนำจากตายอดบนเหง้า ทำการตัดรากและใบออกให้มีความยาวประมาณ 1 - 1.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 4 ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของต้นกระเจียวขาวที่ย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติ

แบ่งต้นกระเจียวขาวที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเกิดรากออกเป็น 3 ขนาด ได้แก่ ต้นที่มีขนาดความยาวน้อยกว่า 3-5 เซนติเมตร (ต้นขนาดเล็ก) ต้นที่มีขนาดความยาวประมาณ 5-10 เซนติเมตร (ต้นขนาดกลาง) และต้นที่มีขนาดความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร (ต้นขนาดใหญ่) ลงปลูกลงดินผสมในสภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ การสร้างยอดและรากใหม่ และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ โดยข้อมูลในการทดลองที่ 1 - 3 มีจำนวน 30 ซ้ำต่อหน่วยการทดลอง ส่วนการทดลองที่ 4 มีจำนวน 50 ซ้ำต่อหน่วยการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (Complete Randomized Design, CRD) ทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS

ผลการทดลอง

จากการนำชิ้นส่วนต้นกระเจียวขาวขนาดยาวประมาณ 1 - 1.5 เซนติเมตร ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงตาเหง้าในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) (1962) และย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนไซโตไคนิน 3 ชนิด ได้แก่ BA, Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงไว้ในที่ให้ได้รับแสง 8 ชั่งโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ที่ 2 สัปดาห์แรกของการทดลองในทุกสูตรอาหารมีการพัฒนาเกิดยอดใหม่และอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน โดยจะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด และจำนวนใบที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่อาหารที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด และที่ TDZ ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดจำนวนตายอดสูงสุด ซึ่งจากการสังเกตจะพบว่ายอดที่เกิดขึ้นใหม่บนทุกสูตรอาหารจะมีลำต้น

ใบและราก สมบูรณ์ดี แต่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นจะมีอัตราการการเจริญของรากน้อยที่สุด ลักษณะของรากที่เจริญ จะมีขนาดเล็ก ตรง สีเขียวจากโคนจนถึงปลายราก และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารทุกสูตรมีการสร้างยอดใหม่เพิ่มมากขึ้นกว่าที่ 2 สัปดาห์ โดยสูตรที่เติม Kinetin และ TDZ มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดตายอดลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ BA จะชักนำให้เกิดตายอดได้เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น อย่างไรก็ตามสูตรที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดยอดใหม่สูงกว่าสูตรอื่นๆ ในขณะที่สูตรที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด และ การเติม Kinetin ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนรากเฉลี่ยและตายอดเฉลี่ยมากที่สุด โดยมีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งยอดใหม่ที่เกิดบนทุกสูตรอาหารมีลักษณะปกติคือ ลำต้นมีสีเขียว ก้านใบยาว ใบมีสีเขียวและเห็นเส้นใบชัดเจน สำหรับตายอดใหม่ที่ยังไม่เจริญพ้นอาหารโดยเฉพาะอาหารสูตรที่เติม TDZ จะมีลักษณะอวบ ใหญ่ สีเขียวตรงปลายยอด มีสีขาวที่โคนยอดและยังพบว่ามีการเจริญของรากไม่ดี รากที่พบมีลักษณะผอม เล็ก สีเขียวจากโคน ในขณะที่ลักษณะของรากในอาหารสูตรที่เติม Kinetin และ BA มีลักษณะปกติคือ ยาว เรียวสีเขียวจากโคน ปลายสีขาว รากมีการแตกแขนงและรากที่อยู่เหนืออาหารมีขนรากสีขาว โดยอาหารที่เติม Kinetin ทุกความเข้มข้นจะมีขนรากมากกว่ารากที่แตกแขนง

และเมื่อทำการเลี้ยงจนครบ 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.70 ยอดต่อชิ้นส่วน และTDZ ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดตายอดใหม่เฉลี่ยมากสุดคือ 1.11 ตาต่อชิ้นส่วน และมีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (ตาราง 1) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.80 เซนติเมตรและ 2.91 ใบต่อชิ้นส่วน โดยที่ Kinetin ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ค่าจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 6.00 รากต่อชิ้นส่วน และจากการสังเกตพบว่า อาหารสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยสูงสุด เหมือนในสัปดาห์ที่ 4 และชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้มีจำนวนใบและความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด เหมือนในสัปดาห์ที่ 4 เช่นกัน โดยยอดที่เกิดขึ้นใหม่นั้นพัฒนามาจากตายอดที่แตกขึ้นมาจากส่วนโคนต้นและพัฒนาต่อเนื่องเป็นต้นใหม่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

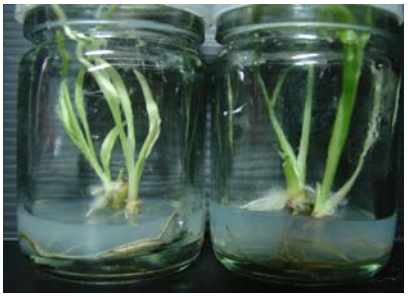
นอกจากนี้ยังพบการเกิดแคลลัสบนอาหารสูตรที่เติม BA ทุกความเข้มข้น แต่มีจำนวนที่เกิดน้อยมากและพบว่าชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงบางชิ้นส่วนมีอาการบวมน้ำตายอีกด้วย ส่วนลักษณะของยอดใหม่ที่เกิดจากการชักนำบนอาหารสูตรเติม TDZ ทุกความเข้มข้น มีลักษณะอวบ ไม่มีก้านใบ ทำให้เมื่อเวลาใบคลี่ออกมักติดอยู่กับลำต้น มีการเจริญของรากไม่ดีเมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่มีการเติม Kinetin

และ BA ในขณะที่อาหารสูตรที่เติม Kinetin และ BA ทุกความเข้มข้นนั้น รากมีการยืดยาวออก มีสีเขียวจากโคน ปลายสีขาว รากที่อยู่ใต้อาหารมีการแตกรากแขนงมากขึ้นเมื่อเทียบจากสัปดาห์ที่ 4 และรากที่อยู่เหนืออาหารมีขนรากสีขาว ยกเว้นสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า รากสั้น มีขนรากอยู่ใต้อาหารและรากมีการแตกแขนงบ้างเล็กน้อย (รูป 1 ก-ค)

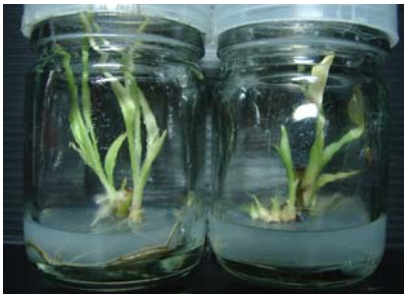
ตาราง 1 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์

Cytokinin (mg/l)		จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (cm)	จำนวนใบเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย	จำนวนตายอดเฉลี่ย
Control		2.03±0.07^{abc}	2.38 ±0.31^{defg}	1.46±0.17^{de}	3.08±0.58^{d}	0.00±0.00^{c}
Kn	0.5	2.21±0.30^{abc}	3.34±0.30^{bc}	1.74±0.17^{cde}	5.16±0.59^{ab}	0.26±0.15^{bc}
	1.0	1.29±0.16^{d}	4.80±0.56^{a}	2.90±0.21^{a}	5.36±0.63^{ab}	0.36±0.20^{bc}
	2.0	1.35±0.13^{d}	3.89±0.38^{b}	2.38±0.20^{ab}	4.70±0.47^{abc}	0.25±0.01^{bc}
	5.0	2.20±0.23^{abc}	3.15±0.26^{bcd}	2.14±0.15^{bc}	6.00±0.61^{a}	0.15±0.08^{c}
BA	0.5	1.80±0.20^{bcd}	3.01±0.28^{bcde}	1.87±0.20^{cde}	5.10±0.58^{abc}	0.65±0.18^{a}
	1.0	1.87±0.29^{bcd}	3.05±0.47^{bcde}	1.93±0.31^{bcd}	4.27±0.75^{bcd}	0.20±0.11^{bc}
	2.0	2.00±0.24^{abcd}	2.77±0.00^{cdef}	1.26±0.22^{e}	4.06±0.62^{bcd}	0.28±0.14^{bc}
	5.0	2.11±0.21^{abc}	2.71±0.30^{cdef}	1.76±0.20^{cde}	3.56±0.60^{cd}	0.17±0.17^{bc}
TDZ	0.5	2.70±0.33^{a}	2.01±0.21^{fg}	1.64±0.16^{cde}	0.50±0.14^{e}	0.10±0.02^{c}
	1.0	2.40±0.20^{ab}	2.20±0.21^{efg}	1.77±0.06^{cde}	0.60±0.20^{e}	0.20±0.01^{bc}
	2.0	2.47±0.25^{ab}	1.64±0.14^{g}	1.58±0.22^{cde}	0.53±0.16^{e}	0.42±0.21^{bc}
	5.0	1.58±0.14^{cd}	2.00±0.14^{fg}	1.37±0.17^{de}	0.42±0.19^{e}	1.11±0.24^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test


1ก

1ข


1ค

รูป 1 (ก-ค) แสดงการเจริญเติบโตของกระเจียวขาว ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติม Kinetin (1ก) BA (1ข) และ TDZ (1ค) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ขวามือ) เปรียบเทียบกับสูตรควบคุม (ซ้ายมือ) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

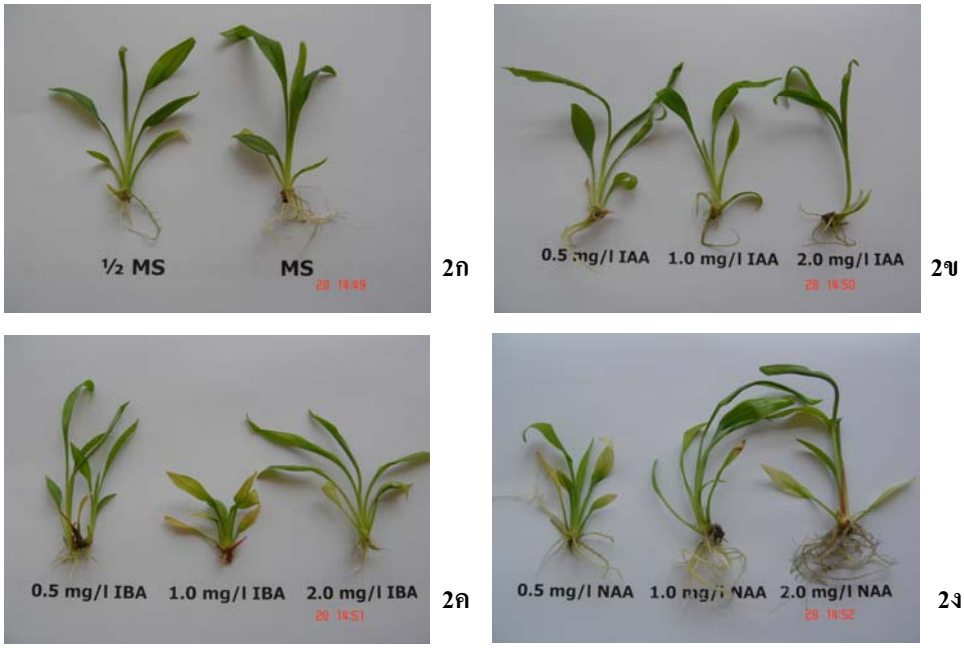
ในการนำต้นกระเจียวขาวขนาดยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ที่ทวีจำนวนขึ้นจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินชนิดต่างๆ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมและ/หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ IAA, IBA และ NAA แปรผันความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ที่กล่าวมา มีการเจริญเติบโตและยืดยาวออก และมีการพัฒนาส่วนต้นและรากใหม่เกิดขึ้น โดยในสัปดาห์ที่ 4 นั้นพบว่า ต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุดคือ 7.0 รากต่อต้น และ 3.73 ใบต่อต้น ตามลำดับ แต่การชักนำให้เกิดรากนั้น มีลักษณะแตกต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหาร กล่าวคือ ต้นที่เลี้ยงบนอาหารครึ่งสูตร MS จะพบว่ามีการสร้างรากอยู่เหนือผิวของอาหาร มีขนราก และรากที่จมอยู่ใต้อาหารมีการแตกแขนงดี ส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นจะให้รากที่มีลักษณะอวบ ใหญ่ สีเขียวบริเวณโคน โดยปลายรากมีสีขาว และมีขนรากเกิดขึ้นกับรากที่อยู่ใต้อาหาร และที่ IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า รากที่อยู่เหนืออาหารมีความยาวมากกว่ารากที่อยู่ใต้อาหาร ในขณะที่ต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ปลายรากมีสีดำและไม่มีการแตกแขนงของรากที่อยู่ใต้อาหาร

ลักษณะของรากเล็ก เรียว ยาว แต่ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้รากที่จมอยู่ใต้อาหารนั้นแตกแขนง และรากแขนงมีลักษณะเรียว ยาว สีเขียวจากโคน และ NAA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้รากมีความยาวเท่าๆกัน และไม่พบรากที่อยู่เหนืออาหาร ส่วนต้นที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม IAA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น พบว่า รากแตกออกมาจากส่วนโคนต้นตรงกาบใบและมีขนรากสีขาวจำนวนมาก โดยที่ IAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบสีของลำต้นมีสีแดงและรากที่เกิดมีลักษณะปกติ เมื่อทำการเลี้ยงถึงสัปดาห์ที่ 6 พบว่า ต้นที่เลี้ยงบนทุกสูตรอาหารมีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดและความยาวยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม IBA และ NAA มีแนวโน้มทำให้จำนวนยอดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (ตาราง 2) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้ค่าความยาวยอด และจำนวนรากเฉลี่ยเฉลี่ยสูงสุดคือ 6.74 เซนติเมตร และ 3.02 รากต่อต้น ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนใบและจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดคือ 4.82 ใบต่อต้น และ 8.06 รากต่อต้น ตามลำดับ

ตาราง 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของกระเจียวขาว ในสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

Auxin (mg/l)		จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (cm)	จำนวนใบเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย	ความยาวรากเฉลี่ย (cm)
1/2MS		1.53±0.21^{a}	4.88±0.40^{b}	3.37±0.29^{bc}	4.06±0.89^{cb}	2.02±0.31^{bc}
MS		1.69±0.27^{a}	5.28±0.33^{b}	2.90±0.30^{c}	4.44±0.52^{bcd}	1.47±0.13^{bcd}
IAA	0.5	1.55±0.17^{a}	5.68±0.43^{ab}	3.83±0.25^{bc}	5.00±0.58^{bcd}	1.85±0.25^{ab}
	1.0	1.33±0.17^{a}	6.74±0.76^{a}	4.06±0.38^{ab}	5.67±0.83^{abcd}	3.02±0.54^{a}
	2.0	2.24±0.60^{a}	4.88±0.49^{b}	3.20±0.33^{bc}	6.41±1.05^{abc}	2.27±0.38^{ab}
IBA	0.5	1.26±0.17^{a}	5.41±0.30^{ab}	3.26±0.26^{bc}	5.42±0.72^{abcd}	1.53±0.21^{bcd}
	1.0	1.41±0.21^{a}	5.52±0.24^{ab}	3.38±0.20^{bc}	3.35±0.87^{d}	0.67±0.17^{bc}
	2.0	1.94±0.46^{a}	5.35±0.33^{b}	3.50±0.36^{bc}	6.56±0.78^{abc}	1.12±0.14^{cd}
NAA	0.5	1.95±0.33^{a}	5.26±0.40^{b}	3.14±0.27^{bc}	6.16±1.02^{abcd}	1.54±0.28^{bcd}
	1.0	2.00±0.25^{a}	5.25±0.47^{b}	3.61±0.33^{bc}	7.05±0.71^{ab}	2.25±0.28^{ab}
	2.0	2.13±0.33^{a}	4.60±0.60^{b}	4.83±0.45^{a}	8.06±1.14^{a}	1.90±0.38^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test



รูป 2 (ก-ง) แสดงการชักนำให้เกิดรากจากการย้ายเลี้ยงต้นอ่อนลงบนอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน (2ก) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่มีการเติมฮอร์โมน IAA (2ข) IBA (2ค) และ NAA (2ง) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ในการนำชิ้นส่วนของต้นกระเจียวขาวขนาดยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจากการเลี้ยงส่วนของตาเหง้าในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซิน คือ NAA ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ มีการเจริญเติบโต และเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นอวัยวะคล้ายต้น และราก รวมทั้งมีการแตกตายอดเกิดขึ้นบริเวณโคนชิ้นส่วนเมื่อเลี้ยงไปได้ 2 สัปดาห์ ต้น ราก ที่เกิดขึ้นใหม่มีการเจริญเติบโตและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้มีความยาวยอดเฉลี่ย และจำนวนรากสูงสุด และในสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมฮอร์โมนจะให้จำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด สำหรับชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA นั้น โดยทั่วไปมีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดยอดได้น้อยกว่าสูตรที่มีการเติมเฉพาะ BA เพียงอย่างเดียว ในทำนองเดียวกันพบว่า ความยาวยอดเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยจะ

ลดลง เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนรากที่สร้างขึ้นจากชิ้นส่วนต้นในสัปดาห์ที่ 3 จะพบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติมเฉพาะ NAA เพียงอย่างเดียว มีแนวโน้มจะชักนำให้เกิดรากได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติมเฉพาะ BA เพียงอย่างเดียว จะมีจำนวนรากลดลง เมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA มีแนวโน้มที่จะให้จำนวนรากลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มมากขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีสัดส่วนความเข้มข้นของ NAA เพิ่มมากขึ้นด้วยก็ตาม อย่างไรก็ตามลักษณะของลำต้นและใบที่ชักนำให้เกิดขึ้นบนอาหารสูตรที่มี BA ร่วมกับ NAA พบว่ามีลักษณะปกติ คือ ลักษณะของลำต้นมียอดที่สมบูรณ์ ตรงโคนต้นมีสีแดงเกิดขึ้นเป็นบางต้น กาบใบมีสีเขียวอ่อน ตายอดที่เกิดใหม่มีสีขาวขุ่น ในขณะที่รากที่ชักนำให้เกิดขึ้นบนทุกสูตรอาหารในการทดลอง มีลักษณะเหมือนกันคือ รากที่อยู่ใต้อาหารจะแตกแขนงปลายรากมีสีขาวขุ่น โคนสีเขียวอ่อน ส่วนรากที่อยู่เหนืออาหารจะมีขนราก สีขาว นอกจากนี้ในทุกสูตรอาหาร จะพบว่ามีบางต้น ที่มีลักษณะของการแตกรากทะลุออกมาจากส่วนโคนต้นตรงกาบใบและมีขนรากสีขาว แตกออกมาเป็นจำนวนมาก

และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA เพียงอย่างเดียว มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดยอดได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มมากขึ้น โดยที่ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.88 ยอดต่อชิ้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน จะให้จำนวนยอดน้อยกว่า (1.08 ยอด) แต่ให้ค่าความยาวยอดเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุดคือ 7.58 เซนติเมตรต่อชิ้นและ 3.31 ใบต่อชิ้นตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม NAA เพียงอย่างเดียว จะให้ค่าจำนวนยอดมากกว่าสูตรควบคุม แต่ให้ค่าจำนวนยอดที่น้อยกว่าสูตรที่เติม BA ทุกความเข้มข้น เมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA จะพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดจะเพิ่มมากขึ้น ตามความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่เพิ่มขึ้น ยกเว้นสูตรที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ ที่พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ BA มากขึ้นเป็น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น จะทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดลดลง (1.44 ยอด) และจากการสังเกตผลการทดลอง พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA ทุกสูตร นั้น จะให้ค่าเฉลี่ยความยาวยอดน้อยกว่าสูตรควบคุม ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด (7.58 เซนติเมตร) อาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของ BA กับ NAA มากขึ้น จะให้ค่าความยาวยอดเฉลี่ยลดลง สำหรับจำนวนใบเฉลี่ยที่เกิดขึ้นใหม่จากชิ้นส่วนต้นเพาะเลี้ยงนั้น พบว่า มีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของ BA และ/หรือ NAA เพียงอย่างเดียวที่เติมลงในอาหารเพิ่มมากขึ้น โดยชิ้นส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุมที่ไม่มีการเติมฮอร์โมนจะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนใบสูงที่สุด และอาหารสูตรที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว จะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนรากมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเติม BA เพียงอย่างเดียวมีแนวโน้ม

จะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนรากลดลง ซึ่งอาหารสูตรที่ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด (8.33 รากต่อชิ้นส่วน) คือ สูตรอาหารที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าเฉลี่ยจำนวนรากมีแนวโน้มลดลง เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA ในอัตราส่วนที่เพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น และจากการทดลอง พบว่า ไม่มีสูตรอาหารใดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ตาราง 3)

ตาราง 3 แสดงผลของฮอร์โมน BA ร่วมกับ NAA ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Hormone (mg/l)		จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย	จำนวนใบเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย
NAA	BA		(cm)		
0.0	0.0	1.08 ± 0.08^{d}	7.58 ± 0.45^{a}	3.31 ± 0.24^{a}	2.46 ± 0.62^{ef}
	1.0	2.13 ± 0.33^{abc}	5.07 ± 0.51^{cd}	2.04 ± 0.20^{abcd}	6.88 ± 1.18^{abc}
	2.0	2.16 ± 0.27^{abc}	4.07 ± 0.32^{cde}	1.62 ± 0.12^{bcd}	4.53 ± 0.59^{bcdef}
	5.0	2.88 ± 0.40^{a}	3.21 ± 0.43^{ef}	1.42 ± 0.10^{d}	3.94 ± 0.65^{cdef}
0.5	0.0	1.45 ± 0.17^{bcd}	6.53 ± 0.44^{ab}	3.09 ± 0.16^{ab}	2.05 ± 0.20^{f}
	1.0	1.93 ± 0.30^{abcd}	4.87 ± 0.45^{cd}	2.18 ± 0.23^{abcd}	4.00 ± 0.54^{cdef}
	2.0	2.05 ± 0.30^{abcd}	4.11 ± 0.38^{cde}	2.30 ± 0.13^{abcd}	4.26 ± 0.50^{bcdef}
	5.0	1.44 ± 0.78^{bcd}	4.44 ± 0.39^{cde}	1.83 ± 0.18^{bcd}	2.89 ± 0.35^{def}
1.0	0.0	1.64 ± 0.41^{bcd}	5.38 ± 0.88^{bc}	2.91 ± 0.46^{abc}	2.82 ± 0.50^{def}
	1.0	2.09 ± 0.55^{abcd}	4.15 ± 0.71^{cde}	1.72 ± 0.24^{bcd}	5.00 ± 0.54^{bcdef}
	2.0	2.22 ± 0.49^{abc}	3.72 ± 0.65^{def}	1.59 ± 0.29^{cd}	7.00 ± 1.48^{ab}
	5.0	2.47 ± 0.35^{ab}	3.15 ± 0.39^{ef}	1.64 ± 0.22^{bcd}	5.47 ± 0.82^{bcde}
2.0	0.0	1.40 ± 0.18^{cd}	4.38 ± 0.53^{cde}	2.14 ± 0.25^{abcd}	8.33 ± 1.59^{a}
	1.0	1.79 ± 0.21^{bcd}	3.73 ± 0.37^{def}	2.99 ± 1.25^{abc}	5.84 ± 1.15^{abcd}
	2.0	2.00 ± 0.38^{abcd}	4.16 ± 0.37^{cde}	2.20 ± 0.23^{abcd}	5.07 ± 1.13^{bcdef}
	5.0	2.50 ± 0.37^{ab}	2.54 ± 0.32^{f}	1.32 ± 0.25^{d}	3.94 ± 1.02^{cdef}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

จากการนำต้นกระเจียวขาวที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเกิดราก ที่มีขนาดความสูงของต้นที่แตกต่างกัน 3 ขนาด คือ ต้นที่มีความสูง น้อยกว่า 5 เซนติเมตร (ต้นขนาดเล็ก) ต้นที่มีความสูง ตั้งแต่ 5-10 เซนติเมตร (ต้นขนาดกลาง) และต้นที่มีความสูงขนาด ประมาณ

10-15 เซนติเมตร (ต้นขนาดใหญ่) ปลูกลงดินในสภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) เมื่อย้ายปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นกระเจียวขาวทุกขนาดมีการเจริญเติบโตดีและมีการเจริญเติบโตทางลำต้น โดยมีการแตกของใบใหม่เกิดขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปได้ประมาณ 1 สัปดาห์ ซึ่งช่วงเวลาที่ใบใหม่คลี่กางออกนั้น สังเกตพบการแตกออกของรากใหม่เกิดขึ้นด้วย และพบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 1 หลังจากมีการย้ายปลูก ต้นขนาดเล็กเริ่มมีการตายเกิดขึ้น และต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า ต้นขนาดเล็กดังกล่าวมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น ทำนองเดียวกับต้นขนาดกลางเริ่มที่เริ่มมีการตายเกิดขึ้นเช่นกัน อัตราการตายของต้นกระเจียวขาวทุกขนาด มีจำนวนมากขึ้น เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ดังตาราง 4

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกระเจียวขาว ที่ย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ขนาดของต้นกระเจียวขาว ที่ออกปลูก	% การรอดชีวิต			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
ต้นขนาดเล็ก (< 5 เซนติเมตร)	100	100	87.5	75.0
ต้นขนาดกลาง (5-10 เซนติเมตร)	100	99.1	95.7	78.3
ต้นขนาดใหญ่ (10-15 เซนติเมตร)	94.8	82.8	65.5	61.0

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ปัจจุบันสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหรือฮอร์โมนถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มจำนวนการสร้างยอดใหม่ได้ดีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สำคัญและนิยมใช้ในการทดลองคือ ฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินและกลุ่มออกซิน ฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินมีคุณสมบัติเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ การเจริญของกิ่งและลำต้น เร่งการแตกตาข้างและช่วยชะลอการแก่ของพืช ส่วนฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายตัวออกของเซลล์ ทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญยืดยาวขึ้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ออกซินที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์และช่วยกระตุ้นให้เกิดราก (root initiation) และถ้ามีการใช้ออกซินในปริมาณที่สูงมากเกินไป อาจจะไปยับยั้งกระบวนการพัฒนาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พืช (morphogenesis) ได้ จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ฮอร์โมนพืชถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อวัตถุประสงค์แตกต่างกันออกไป (George and Sherrington, 1984)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประสบความสำเร็จมากมายในพืชวงศ์ขิง ข่า (Keng and Hing, 2004; Sharma and Singh, 1995; Sharma and Singh, 1997; Pandey *et al*., 1997; Rahman *et al*., 2004

and Khatun *et al*., 2003) รวมทั้งพืชในสกุล *Curcuma* ซึ่งมีรายงานการศึกษาถึงผลของปัจจัยบางประการต่อการชักนำให้เกิดสัณฐานวิทยาเป็นแคลลัสและเกิดเป็นพืชต้นใหม่ เช่น ผลของ แสง (Nayak, 2000) น้ำตาล (Shirgurkar *et al*., 2001) ผลของฮอร์โมนทั้งในกลุ่มไซโตไคนิน (Sato *et al*., 1987; Balachandran *et al*., 1990; Nayak, 2000; Prathanturarug *et al*., 2003) และผลของออกซินร่วมกับไซโตไคนิน (Mukhri and Yamaguchi, 1986; Salvi *et al*., 2000; Prathanturarug *et al*., 2003; สุพัตรา และกอบเกียรติ, 2548) เป็นต้น

ในการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนต้นกระเจียวขาวบนอาหารสูตรที่เติมฮอร์โมนไซโตไคนิน ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ Kinetin, BA และ TDZ เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุมซึ่งเป็นสูตรที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน พบว่า อาหารสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่ำ (0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด มากกว่าสูตรควบคุม แต่เมื่อความเข้มข้นของ TDZ สูงขึ้น มีแนวโน้มที่จะทำให้ตายอดเพิ่มจำนวนขึ้นอีกด้วย ซึ่งให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกับรายงานการเพาะเลี้ยงขมิ้นชันของ Prathanturarug และคณะ (2003) และงานของนิตยา และคณะ (2547) ที่พบว่า TDZ มีประสิทธิรูปในการชักนำให้เกิดการแตกตายอดและยอดใหม่ได้ดีในขมิ้นชัน โดยทั่วไป TDZ จัดเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนินสังเคราะห์ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Huettemann and Preece 1993) และ TDZ ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนตายอดและกระตุ้นให้เกิดการแตกตายอดใหม่ได้ดีในพืชหลายชนิดรวมทั้งพืชในตระกูลขิง ข่า ด้วย (Prathanturarug *et al*., 2003) จากการสังเกตผลการทดลอง พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม TDZ นั้น ลักษณะของตายอดที่เกิดขึ้นจะอวบ มีสีขาวขุ่น เมื่อเปรียบเทียบกับฮอร์โมนชนิดอื่นที่ความเข้มข้นเดียวกันซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมน Kinetin และ BA นั้น พบว่าสามารถชักนำให้มีความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และจำนวนรากเฉลี่ย ดีกว่าสูตรที่เติม TDZ แต่ยังคงให้จำนวนยอดที่น้อยกว่า TDZ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Sato และคณะ (1987) Balachandran และคณะ (1990) Nayak (2000) และ Prathanturarug และคณะ (2003)

จากผลการทดลองเพื่อชักนำให้ต้นกระเจียวขาวเกิดรากในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบอัตราการเกิดราก ความยาวราก และจำนวนรากกระเจียวขาวที่สร้างขึ้น และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของกระเจียวขาวบนอาหารสูตรต่างๆ ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน พบว่า ต้นกระเจียวขาวสามารถสร้างรากขึ้นมาใหม่ตรงบริเวณโคนชิ้นส่วนได้บนอาหารทุกสูตร โดยพบว่า อาหารสูตรที่เติม NAA ทุกความเข้มข้น มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าสูตรอื่นๆ รวมทั้งอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมน และอาหารครึ่งสูตรควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kongbangkerd และ Wawrosch (2005) และ Martin (2002) ที่รายงานว่า NAA มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดการแตกรากใหม่เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารดังกล่าว ในขณะที่อาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมน และอาหารครึ่งสูตรควบคุมที่ไม่เติมฮอร์โมน

จะมีผลชักนำให้อัตราการสร้างรากเกิดขึ้นได้ค่อนข้างต่ำ (Wawrosch *et al.*, 2001) ในทำนองเดียวกับอาหารสูตรที่เติม IAA ซึ่งมีแนวโน้มในการกระตุ้นให้เกิดรากเพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนดังกล่าวสูงขึ้นเช่นกัน และสามารถชักนำให้เกิดการสร้างรากที่มีความยาวมากที่สุด ซึ่งให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกับงานวิจัยของนิตยาและคณะ (2547) และ Kongbangkerd และ Wawrosch (2005) ในขณะที่ต้นกระเจียวขาวที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม IBA นั้น จะพบว่ารากมีลักษณะอวบ สั้น และมีแนวโน้มที่จะให้จำนวนรากและความยาวรากน้อยกว่าต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ และการเพิ่มความเข้มข้น IBA จะทำให้จำนวนรากเฉลี่ย มีการเพิ่มจำนวน ที่ไม่สม่ำเสมอ กล่าวคือ จำนวนรากจะลดลงในช่วงแรก และเพิ่มขึ้นอีกเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นอีก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับที่มีในรายงานของ Kongbangkerd และ Wawrosch (2005)

มีรายงานการศึกษาถึงผลการใช้ฮอร์โมนไซโตไคนิน ร่วมกับออกซิน โดยเฉพาะ BA ร่วมกับ NAA ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดการแตกตายอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วน hypocotyls ของ *Portulaca grandiflora* (Hassani and Zryd, 1995) การกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Lycium barbarum* (Hu *et al*., 2001) การชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่จากการเลี้ยงชิ้นส่วน Cotyledons และ Hypocotyls ของพืชสกุลกะหล่ำปลีลูกผสม (Yang *et al*., 2004) เป็นต้น จากการทดลองผลของ BA ร่วมกับ NAA ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต้นกระเจียวขาว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวและจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด (7.58 เซนติเมตร และ 3.31 ใบ ตามลำดับ) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว พบว่า ให้ผลทางตรงกันข้ามกับการทดลองของ Pirinc และคณะ (2003) และของ Kongbangkerd และ Wawrosch (2005) ที่รายงานว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติมฮอร์โมน จะกระตุ้นให้พืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีการยืดยาวมากกว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุมที่ไม่มีเติมฮอร์โมน และจากผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (2.88 ยอดต่อชิ้นส่วน) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น จะชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับรายงานการศึกษาของ Sha Villa Khan และคณะ (1999), Pirinc และคณะ (2003) และ Luna และคณะ(2003) ที่แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มปริมาณของ BA จะทำให้เกิดการสร้างยอดใหม่ได้มากขึ้นเช่นกัน สำหรับต้นกระเจียวขาวที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด (8.33 รากต่อชิ้นส่วน) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kongbangkerd และ Wawrosch (2005) และจากการทดลองพบว่า ในอาหารสูตรที่มีการเติม NAA เพียงลำพัง ก็สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดและ/หรือรากใหม่ได้เช่นกัน แต่เมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มมากขึ้น จะทำให้จำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มลดลง และเมื่อมีการเติมฮอร์โมน BA ลงในอาหารสูตรที่มี NAA จะพบว่า

ความสามารถในการสร้างยอดและ/หรือรากใหม่นั้น เกิดขึ้นแตกต่างกันออกไปในแต่ละสูตร โดยพบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA นั้น เมื่อความเข้มข้น เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มที่จะทำให้จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และจำนวนรากที่สร้างขึ้นมาใหม่นั้น ลดลงตามความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง ซึ่งให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกับรายงานการศึกษาของ Kanchanapoom และ Boonvanno (2000); Rahman และคณะ (2003) และ Rahman และคณะ (2004)

ในการย้ายต้นกระเจียวขาวที่มีขนาดแตกต่างกัน ออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของต้นกระเจียวขาวขนาดเล็ก และขนาดกลางมีแนวโน้มในการอยู่รอดและเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมปกติ ได้ดีกว่าต้นขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในช่วงระยะเวลาที่มีการย้ายปลูกนั้น ต้นกระเจียวขาวขนาดใหญ่เกิดการเข้าทำลายโดยเชื้อแบคทีเรีย ได้ง่ายกว่าเนื่องจากมีพื้นที่ในการเข้าทำลายที่มากกว่า ถึงแม้ว่าต้นกระเจียวขาวขนาดใหญ่นั้นมีความสูงมากกว่า แต่ลักษณะของลำต้นนั้นบอบบางและง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่ต้นกระเจียวขาวขนาดกลางและขนาดเล็ก มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และมีการเข้าทำลายโดยเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่า จึงทำให้มีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าอย่างเห็นได้ชัด

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นกระเจียวขาว เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดได้มากที่สุด 2.7 ยอดต่อชิ้นส่วน และในการทดลองเพื่อชักนำให้เกิดราก ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากได้สูงสุด 8.06 รากต่อชิ้นส่วน เมื่อทำการทดลองใช้ฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ปรากฏว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงสุด 2.88 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด (8.33 รากต่อชิ้นส่วน)

เอกสารอ้างอิง

นิตยา โพธิ์แนม, เนตรนภา เดชศิริ และ เพ็ญจิตร ธนสัญชัย. (2547). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน. การศึกษาค้นคว้าอิสระ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร, 49.

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. (2536). พรรณพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) tribe Hedychieae ในประเทศไทย, รวมผลงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 8. มหาวิทยาลัยมหิดล, 190–200.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. (2544). การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยโคลซิซินในสภาพปลอดเชื้อ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพัตรา สระธรรม และ กอบเกียรติ แสงนิล. (2548). การเกิดแคลลัสจากลำต้นกระเจียว เบอร์ 50 ในสภาพปลอดเชื้อ. *ว.สงขลานครินทร์ วทท.*, *27*(3), 487-498.

อนุพันธ์ กงบังเกิด. (2547). เอกสารประกอบการเรียนวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

อรอุบล ขมเดช. (2534). ผลของไซโตไคนิน, การผ่าหัวและสารทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการเกิดยอดปทุมมา (*Curcuma sparganifolia* Gaganep.) ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Balachandran, S.M., Bhat, S.R. and Chandel, K.P.S. (1990). *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Rep*., *9*, 521-524.

Chin, Y. L. (1993). The use of Thidiazuron in tissue culture. *In Vitro* Cell. *Dev.Biol.-Plant*, *29*, 92-96.

Dekkers, A.J., Rao, A.N. and Goh, C.J. (1991). *In vitro* storage of multiple shoot cultures of Gingers at ambient temperature of 24-*29, C. Scientia Hortic*., *47*, 157-167.

George, E.F. and Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture: Handbook and dictionary of commercial laboratories. England: Eastern Press. 709.

Hassani, B.D.R. and Zyrd, J.P. (1995). *In vitro* culture and regeneration of large flowered purslane. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*., *41*, 281-283.

Hosoki, T. and Sagawa, Y. (1977). Clonal propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through tissue culture. *Hort Sci*., *22*(6), 451-452.

Hu, Z., Guo, G.Q., Zhao, D.L., Li, L.H. and Zheng, G.C. (2001). Shoot regeneration from cultured leaf explants of *Lycium barbarum* and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Russian J. Plant Physiol*., *48*(4), 453-458.

Huetteman, C.A. and Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*., *33*, 105-119.

Iden, H., Asahira, T. and Hirano, A. (1998). Micropropagation of Ginger. *Acta Hortic*., *1*, 177-184.

Kanchanapoom, K. and Boonvanno, K. (2000). A protocol towards micropropagation of the pesticidal plant, *Maesa ramentacea* A.DC. *ScienceAsia*, *26*, 201-205.

Keng, C.L. and Hing, T.W. (2004). *In vitro* propagation of zingiberaceae species with medicinal properties. *J. Plant Biotechnol. 6*(3), 1-8.

Khatun, A., Nasrin, S. and Hossain, T. (2003). Large scale multiplication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) from shoot-tip culture. *Online J. Biol. Sci. 3*(1), 59-64.

Kongbangkerd, A. Koepf, A., Allacher, P. Wawrosch, C. and Kopp, B. (2005). Micropropagation of squill (*Charybdis numidica*) through nodule culture. *Plant Cell Rep*., *23*, 673-677.

Luna, C., Sansberro, P., Mrokinski, L. and Tarrago, J. (2003). Micropropagation of *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) from nodal segments in a tissue culture system. *Biocell*, *27*(2), 205-212.

Malamug, J.J.F., Inden, H. and Asahira, T. (1991). Plantlet regeneration and propagation from Ginger callus. *Scientia Hortic*, *48*, 89-97.

Martin, K.P. (2002). Rapid propagation of *Holostemma ada-kodian* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. *Plant Cell Rep*., *21*, 112-117.

Mukhri, Z. and Yamaguchi, H. (1986). *In vitro* multiplication from rhizome of turmeric (*Curcuma domestica* Val.) and Temoe Lawak (*C. xanthorhiza* Roxb.). *Plant Tiss. Cult. Letts*., *3*(1), 28-30.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, *15*, 473-497.

Nayak, S. (2000). *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb. Plant Growth Regul *32*, 41-47.

Pandey, Y.R., Sangwansupyakorn, C. Sahavacharin, O. and Thaveechai, N. (1997). *In vitro* propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Kasetsart J. (Nat. Sci.) 31*, 81-86.

Pirinc, V., Onay, A., Yildirim, H. Adiyaman, F., Isikalan, C. and Basaran, D. (2003). Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid Diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus* cv. "Suerme"). *Turk. J. Biol., 27*, 101-105.

Prathanturarug, S., Soonthorncharoennon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y. and Saralamp, P. (2003). High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. *Plant Cell Rep*. *21*, 1054-1059.

Rahman, M.M., Amin, M.N., Azad, M.A.K., Begum, F. and Karim. (2003). *In vitro* rapid regeneration of plantlets from leaf explants of Native-olive (*Elaeocarpus robustus* Roxb.) *Online J. Biol. Sci,. 3*(8), 718-725.

Rahman, M.M., Amin, M.N., Ahamed, T., Ali, M.R. and Habib, A. (2004). Efficient Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Leaf Base-derived Callus of *Kaempferia galanga* L. *Asian J. of Plant Sci,*, *3*(6), 675-678.

Rahman, M.M., Amin, M.N., Jahan, H.S. and Ahamed, R. (2004). *In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. A valuable spice plant in Bungladesh. *Asian J. Plant Sci*., *3*(3), 306-309.

Salvi, N.D., George, L. and Eapen, S. (2000). Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*., *62*, 235-238.

Sato, M., Kuroyanagi, M., Ueno, A., Shimomura, K. and Satake, M. (1987). Plant tissue culture of zingiberaceae (II): *In vitro* propagation of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Plant Tiss. Cult. Letts.*, *4*(2), 86-88.

Sharma, T.R. and Singh, B.M. (1995). *In vitro* microrhizome production in *Zingiber officinale* Rosc. *Plant Cell Rep*., *15*, 274-277.

Sharma, T.R. and Singh, B.M. (1997). High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. *Plant Cell Rep*., *17*, 68-72.

Sha Villa Khan, P.S., Hausman, J.F. and Rao, K.R. (1999). Clonal multiplication of *Syzygium alternifolium* (Wight.) Walp., through mature nodal segments. *Silvae Genetica*., *48*(1), 45-50.

Wawrosch, C., Malla, P.R. and Kopp, B. (2001). Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Rep*., *20*, 285-288.

Yang, Z.H., Jin, H., Plaha, P., Woong, B.T., Jiang, G.B., Woo, J.G., Yun, H.D., Lim, Y.P. and Lee, H.Y. (2004). An improved plant regeneration protocol using cotyledonary explants from inbred lines of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *J. Plant Biotechnol.*, *6*(4), 235-239.