บทความวิจัย

การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นดอกดิน (*Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škornick.) พืชถูกคุกคามของประเทศไทย

โรจนกร เชิงปัญญา[1] งามนิจ ชื่นบุญงาม[1*] ณัฐวัฒน์ คงตุก[1] รวิชย์ หลงสวาสดิ์[1]
ณัฐพล นพพรเจริญกุล[1] อัจฉรา เมืองครุธ[1] ทยา เจนจิตติกุล[1] และ พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง[1]

ได้รับบทความ: 20 กุมภาพันธ์ 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 10 มิถุนายน 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 13 มิถุนายน 2562

บทคัดย่อ

ต้นดอกดิน (*Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škornick. จัดเป็นพืชกึ่งล้มเลิกเดียวในวงศ์ขิงที่ถูกคุกคามและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ควรตระหนักถึงการอนุรักษ์สายพันธุ์พืชชนิดนี้ไว้เป็นสำคัญ การศึกษานี้มุ่งหาวิธีการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง โดยนำตาข้างที่ได้จากส่วนโคนของลำต้นเหนือดินของต้นดอกดินที่เจริญตามธรรมชาติที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (MS) ทำให้ได้ต้นอ่อนปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในขั้นตอนต่อไป เพื่อที่จะศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นดอกดิน จึงนำยอดที่เกิดขึ้นใหม่ที่มีความสูง 6-7 เซนติเมตร มาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นขนาด 1.5 เซนติเมตร ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 0-40 กรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร มีร้อยละของการเกิดยอดใหม่ 100 และมีจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นพืชมากที่สุด จากการนำต้นที่เกิดขึ้นจากอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร มาตัดให้เหลือส่วนโคนก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีเบนซิลอะดีนีน (benzyladenine: BA) เข้มข้น 0-4 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงชนิดเดียวหรือมีไคนิทีน (kinetin: KN) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมอยู่ด้วย นาน 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ต่อไปอีก 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่สูงที่สุด (10.40±0.68 ยอด/ชิ้นพืช) อีกทั้งไม่ส่งผลต่อการยืดยาวของยอดใหม่และการเจริญของราก นอกจากนี้ต้นพืชที่เกิดขึ้นจากอาหารสูตรดังกล่าวยังมีร้อยละการรอดชีวิตที่สูงที่สุด (95) หลังจากนำไปอนุบาลและออกปลูกนาน 6 สัปดาห์ ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และอนุรักษ์ต้นดอกดิน และสามารถประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจโดยไม่รบกวนพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติอันเป็นการรักษาพันธุ์พืชอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: ดอกดิน พืชถูกคุกคาม การขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง น้ำตาลซูโครส สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

---

[1]ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: ngarmnij.chu@mahidol.edu

In Vitro Propagation of *Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škornick., a Vulnerable Plant of Thailand

Rodjanacorn Chuengpanya[1], Ngarmnij Chuenboonngarm[1*], Nutthawut Kongtook[1], Rawit Longsaward[1], Nattapon Nopporncharoenkul[1], Atchara Muangkroot[1], Thaya Jenjittikul[1] and Puangpaka Soonthornchainaksaeng[1]

Received: 20 February 2019
Revised: 10 June 2019
Accepted: 13 June 2019

ABSTRACT

Curcuma candida (Wall.) Techapr. & Škornick. (Zingiberaceae), a semi-endemic plant, is classified as a vulnerable plant and estimated to be at risk of extinction. Therefore, conservation of this plant needs to be concerned. This study aimed to investigate *in vitro* propagation protocol of *C. candida*. Leafy-shoot base of natural grown *C. candida* were surface sterilized and axillary buds were separated and cultured on Murashige and Skoog (MS) agar medium. To investigate an appropriated sucrose concentration for culturing *C. candida*, *in vitro* shoots at the height of 6-7 cm were selected and their leafy-shoot bases were excised to 1.5 cm in height, and then inoculated onto Murashige and Skoog (MS) agar medium supplemented with 0-40 g/L sucrose. The result found that 100% of shoot induction and maximum number of shoots per explant could observe on the medium added with 30 g/L sucrose at 8 weeks of culture. Leafy-shoot bases received from the medium containing 30 g/L sucrose were excised and cultured on MS agar medium supplemented with 0-4 mg/L benzyladenine (BA) alone or in combination with 0.5 mg/L kinetin (KN). After 8 weeks of culture, all regenerants were transferred to plant growth regulators (PGRs)-free medium for another 4 weeks. The results revealed that MS agar medium supplemented with 2 mg/L BA was suitable for mass multiplication of *C. candida*. This medium provided the highest number of new shoots (10.40±0.68 shoots/explant) and did not affect to new shoot height and root regeneration. The highest survival percentage (95%) after 6 weeks of acclimatization was also obtained from the plantlets which grown in this medium. As a consequence, this protocol will be useful for commercialized rapid propagation and germplasm conservation *via in vitro* preservation of *C. candida* without natural population disturbance.

Keywords: *Curcuma candida*, Vulnerable plant, *In vitro* propagation, Sucrose, Plant growth regulators

[1]Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University
[*]Corresponding author, email: ngarmnij@mahidol.ac.th

บทนำ

ต้นดอกดินเป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škorni.k. พืชชนิดนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศพม่าเมื่อปี พ.ศ. 2373 และได้รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia candida* Wall. [1] ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 พืชชนิดนี้ได้ถูกค้นพบเพิ่มเติม (new record) ในประเทศไทย โดยพบที่จังหวัดกาญจนบุรี จึงทำให้ต้นดอกดินมีสถานะการกระจายพันธุ์เป็นพืชถิ่นเดียว [2] ถึงแม้ว่าพืชชนิดนี้มีลักษณะดอกที่คล้ายคลึงกับพืชสกุลเปราะ (*Kaempferia* L.) แต่จากการศึกษาโดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาร่วมด้วย พบว่าต้นดอกดินมีความใกล้ชิดกับพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma* L.) มากกว่า [3] จึงส่งผลให้พืชชนิดนี้จัดอยู่ในสกุลขมิ้นจนถึงปัจจุบัน

ต้นดอกดินมีใบที่มีแถบริ้วสีแดงตรงกลาง (รูปที่ 1ก) ดอกมีสีขาวแกมเหลืองสวยงาม (รูปที่ 1ข) และมีกลิ่นหอมอ่อน [1] ดังนั้นพืชชนิดนี้จึงอาจนำมาใช้เป็นไม้ประดับได้ นอกจากนี้ดอกอ่อนของต้นดอกดินยังมีศักยภาพสามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจเพื่อการผลิตยาและการบริโภคได้ [2] (รูปที่ 1ค) จากการที่ต้นดอกดินมีประโยชน์หลายประการ พืชชนิดนี้จึงถูกนำมาใช้บริโภคมากเกินจำนวนที่มีในธรรมชาติ โดยดอกอ่อนจำนวนมากของพืชชนิดนี้ถูกเก็บมาขายที่ตลาดท้องถิ่น เช่น ตลาดชุมชนชายแดนไทย-พม่า ณ อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี (รูปที่ 1ค) ประกอบกับปัญหาการทำลายทรัพยากรธรรมชาติในถิ่นที่อยู่อาศัยของต้นดอกดิน รวมถึงการสืบพันธุ์ของต้นดอกดินมีข้อจำกัดอยู่มาก โดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานและได้จำนวนเมล็ดที่จำกัด (รูปที่ 1ง) ขณะที่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศผ่านการแตกหน่อเจริญเป็นต้นใหม่จากส่วนเหง้า (rhizome) หรือลำต้นใต้ดินนั้น เหง้าเก่าของปีก่อนหน้าจะสลายตัวเมื่อมีการสร้างเหง้าใหม่ ทำให้ต้นดอกดินสร้างเหง้าใหม่เพียงหนึ่งเหง้าต่อปีเท่านั้น (รูปที่ 1จ) ปัญหาเหล่านี้ส่งผลให้จำนวนของต้นดอกดินลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้พืชชนิดนี้ติดสถานภาพเป็นพืชถูกคุกคาม (vulnerable) เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2555 โดยสหภาพระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature: IUCN) [4] และยังคงสถานะเป็นพืชถูกคุกคามของไทยอยู่จากการรายงานโดยสำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติฯ [5]

จากข้อตกลงร่วมกันของสมาชิกของภาคีอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity: CBD) เกี่ยวกับ “เป้าหมายความหลากลายทางชีวภาพไอชิ (Aichi Biodiversity Targets)” [6] ทำให้ประเทศไทยซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิก ที่จำเป็นต้องตอบสนองต่อนโยบายข้างต้น โดยศึกษาหาวิธีการอนุรักษ์และป้องกันพืชที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ซึ่งรวมถึงต้นดอกดินให้คงอยู่ในธรรมชาติ และให้นำพันธุ์พืชดังกล่าวมาพัฒนาและใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งในระดับท้องถิ่นและระดับชาติโดยไม่ส่งผลกระทบต่อต้นพืชในธรรมชาติอันจะนำไปสู่การอนุรักษ์พันธุ์พืชอย่างยั่งยืน การศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ต้นดอกดิน เนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อจำนวนมากอย่างรวดเร็วในระยะเวลาที่จำกัด [7] อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนต้นพืชที่ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีตามธรรมชาติได้ เนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมและให้ธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นพืชได้ดีกว่าในสภาพธรรมชาติ พืชเหล่านี้จึงสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ง่ายมากยิ่งขึ้น [8] ดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำไปใช้อนุรักษ์พันธุ์พืชที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (endangered plant) มากถึง 170 ชนิด จาก 60 วงศ์ [9] ทั้งนี้มีการนำวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองไปประยุกต์ใช้กับพืชสกุลขมิ้นหลายชนิดเพื่อวัตถุประสงค์หลายประการ เช่น อนุรักษ์พันธุ์ หรือเพิ่มปริมาณต้นพืชให้มีจำนวนมากเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตยา อาหารหรือไม้ประดับ เป็นต้น โดยพืชสกุลขมิ้นเหล่านั้น ได้แก่ *C. angustifolia* [10] *C. amada* [11] *C. attenuata* [12] *C. caesia* [13] *C. comosa* [14]

C. kwangsiensis [15] *C. longa* [16-18] *C. xanthorrhiza* [19] เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นดอกดิน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นรายงานฉบับแรกที่ศึกษาหาวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของพืชชนิดนี้ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้นอกจากจะใช้เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ต้นดอกดินแล้ว ยังอาจเป็นการเพิ่มคุณค่าและเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาให้ต้นดอกดินเป็นพืชเศรษฐกิจเช่นเดียวกับพืชในสกุลขมิ้นหลายชนิด อันจะก่อให้เกิดการอนุรักษ์พันธุ์พืชชนิดนี้อย่างยั่งยืนต่อไป

รูปที่ 1 ลักษณะของต้นดอกดิน ที่ใบมีแถบสีแดงสวยงาม (ก) ดอกสีขาวแกมเหลืองซึ่งมีกลิ่นหอม (ข) ดอกอ่อนที่ถูกนำมาใช้เป็นพืชผักเศรษฐกิจโดยนำไปใช้ประกอบอาหาร (อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี) (ค) ผลและเมล็ดของต้นดอกดิน (ง) เหง้าของปีเก่า (ลูกศรฝั่งซ้าย, จ) และเหง้าใหม่ (ลูกศรฝั่งขวา, จ)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การฟอกฆ่าเชื้อผิวพืชทดลอง

นำต้นดอกดินที่มีความสูงของลำต้นเหนือดินประมาณ 15-18 เซนติเมตร (วัดจากส่วนล่างสุดของลำต้นเหนือดินจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด) ซึ่งนำมาจากจังหวัดกาญจนบุรีและปลูกเลี้ยงที่เรือนเพาะชำของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (วิทยาเขตศาลายา) มาทำความสะอาดและตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นเหนือดินยาว 5 เซนติเมตร และนำไปแช่ในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 2 นาที ฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยน้ำกลั่นที่ผสมคลอรอกซ์ (คลอรอกซ์, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งมีสารสำคัญโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เข้มข้น 5.25% ที่ความเข้มข้น 25% และ 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 20 และ 30 นาที ตามลำดับ จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทั้งนี้น้ำกลั่นที่ใช้ทุกขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2. การชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลอง

นำตาข้างขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร ที่ตัดออกจากส่วนโคนลำต้นที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อภายในตู้ตัดย้ายเนื้อเยื่อ ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (MS) [20] ที่เติมผงวุ้น 7.5 กรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร และเบนซิลอะดีนิน (benzyladenine: BA) เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร (Sigma, USA) นาน 6 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นพืชปลอดเชื้อ โดยสูตรอาหารดังกล่าวเป็นสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับใช้ขยายพันธุ์ต้นพืชในหลอดทดลองของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ชิ้นพืชถูกย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้น

สูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอย่างน้อย 8 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้เป็นพืชเริ่มต้นในการศึกษาต่อไป ตลอดการศึกษานี้ อาหารวุ้นสูตร MS มีค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.7-5.8 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ขวดเลี้ยงพืชทดลองประกอบด้วย 1 ชิ้นพืช/ขวด สภาวะที่ใช้เลี้ยงพืชทดลอง คือ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 37 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที โดยพืชทดลองได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวโทนเย็น (ฟิลลิปส์, ประเทศไทย)

3. การศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงต้นดอกดินในหลอดทดลอง

ตัดส่วนโคนลำต้นจากต้นพืชปลอดเชื้อที่มีลักษณะแข็งแรงและมีความสูง 6-7 เซนติเมตร ให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0 10 20 30 และ 40 กรัม/ลิตร ย้ายชิ้นพืชลงอาหารใหม่และบันทึกผลการทดลอง ทุก 4 สัปดาห์ จนครบระยะเวลา 8 สัปดาห์

4. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นดอกดินในหลอดทดลอง

นำพืชทดลองที่ได้จากต้นพืชปลอดเชื้อซึ่งเจริญจากสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาก่อนหน้ามาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นสูง 1.5 เซนติเมตร และเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0 1 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับไคนิทิน (kinetin: KN) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ (ย้ายชิ้นพืชลงอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) จากนั้นจึงย้ายชิ้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์

5. การอนุบาลและย้ายต้นพืชออกปลูก

ล้างอาหารเลี้ยงที่ติดอยู่กับต้นพืชจากทุกสูตรอาหารออกก่อน แล้วจึงนำไปปลูกลงในถุงเพาะชำซึ่งบรรจุวัสดุปลูกที่เป็นส่วนผสมระหว่างดินปลูกสำเร็จรูปและกาบมะพร้าวสับในอัตราส่วน 6:1 นำต้นพืชอนุบาลออกปลูกที่เรือนเพาะชำของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (วิทยาเขตศาลายา) ซึ่งมีการพรางแสงประมาณ 40% และใช้พลาสติกใสคลุมเพื่อควบคุมความชื้นของต้นพืชในระยะการอนุบาล บันทึกอัตราการรอดชีวิตของต้นพืชหลังจากนำออกปลูกครบ 6 สัปดาห์

6. การวางแผนการทดลอง มาตรฐานการวัดข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยใช้ 10 ชิ้นพืชต่อชุดทดลอง เนื่องจากส่วนลำต้นเหนือดินของต้นดอกดินเป็นลำต้นเทียม ดังนั้นการวัดความยาวยอดในการศึกษานี้จึงวัดจากส่วนฐานสุดของโคนลำต้นจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด [21] ข้อมูลความสูงของยอดและความยาวของรากวัดจากยอดและรากที่ยาวที่สุดของแต่ละขวดเลี้ยง นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 20.0 ข้อมูลในการศึกษานี้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error: S.E.)

ผลการทดลอง

1. การฟอกฆ่าเชื้อผิวและการชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลอง

ตาข้างที่นำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 1 สัปดาห์ เกิดการปนเปื้อนร้อยละ 25 และพบการเจริญของยอดใหม่จากส่วนโคนของตาข้างโดยตรง (direct organogenesis) เมื่อเลี้ยงชิ้นพืชนาน 4 สัปดาห์ ยอดใหม่มีความสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร หลังจากเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 8 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดมีความสมบูรณ์แข็งแรงสามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงต้นดอกดินในหลอดทดลอง

จากการนำส่วนโคนลำต้นยาว 1.5 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ผลการทดลองที่ 4 สัปดาห์แรกของการเลี้ยงไม่พบความแตกต่างทางสถิติในทุกตัวชี้วัด (ข้อมูลไม่แสดง) ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกันส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อทุกตัวชี้วัด (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) โดยชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส (ชุดควบคุม) มียอดยืดยาวขึ้น และเกิดรากขึ้น หากแต่จำนวนและความยาวของรากที่เกิดขึ้นนั้นมีค่าต่ำที่สุด ทั้งนี้ชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารชุดควบคุมนี้ไม่พบการเกิดยอดใหม่ (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) ขณะที่อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร พบการเจริญของยอดที่มากที่สุด คือ ชิ้นพืชทดลองมียอดยืดสูงขึ้นถึง 10.79$\pm$0.42 เซนติเมตร มีการเจริญของยอดใหม่เกิดขึ้นโดยยอดที่เกิดขึ้นมีจำนวน 2.30$\pm$0.30 ยอด/ชิ้นพืช และมีความสูง 6.46$\pm$0.63 เซนติเมตร (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) ขณะที่จำนวนรากใหม่ที่มากที่สุด (8.90 ราก/ชิ้นพืช) พบจากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 40 กรัม/ลิตร ความยาวของรากที่ยาวที่สุด (4.51$\pm$0.72 เซนติเมตร) พบจากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตาม ความยาวของรากจากอาหารเลี้ยงที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 และ 30 กรัม/ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากข้อมูลทั้งหมดและการวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการใช้เลี้ยงต้นดอกดินในหลอดทดลองทั้งในระยะของการเพิ่มปริมาณยอดหรือระยะของการชักนำให้เกิดการพัฒนาของรากเพื่อให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์

ตารางที่ 1 การยืดยาวของยอดของชิ้นพืชทดลอง ยอดและรากใหม่หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชทดลองบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0-40 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การเจริญของยอด				
ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	**ความสูงยอดของชิ้นพืชทดลอง (เซนติเมตร)**	**การชักนำให้เกิดยอดใหม่ (%)**	**จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช**	**ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)**
0 (ชุดควบคุม)	5.32 ± 0.36^{D}	0	0^{C}	0^{D}
10	7.46 ± 0.65^{C}	70	2.14 ± 0.40^{AB}	2.92 ± 0.52^{C}
20	10.73 ± 0.42^{A}	90	2.11 ± 0.26^{AB}	4.40 ± 0.64^{BC}
30	10.79 ± 0.42^{A}	100	2.30 ± 0.30^{A}	6.46 ± 0.63^{A}
40	9.06 ± 0.49^{B}	100	1.50 ± 0.17^{B}	5.07 ± 0.70^{AB}
F-Test	*		*	*

การเจริญของราก			
ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	**การชักนำให้เกิดรากใหม่ (%)**	**จำนวนรากใหม่/ชิ้นพืช**	**ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)**
0 (ชุดควบคุม)	80	2.75 ± 0.41^{C}	0.41 ± 0.74^{C}
10	100	4.50 ± 0.75^{BC}	4.51 ± 0.72^{A}
20	100	6.90 ± 1.31^{AB}	2.03 ± 0.36^{B}
30	100	8.90 ± 1.65^{A}	3.78 ± 0.36^{A}
40	100	8.90 ± 1.15^{A}	1.98 ± 0.20^{B}
F-Test		*	*

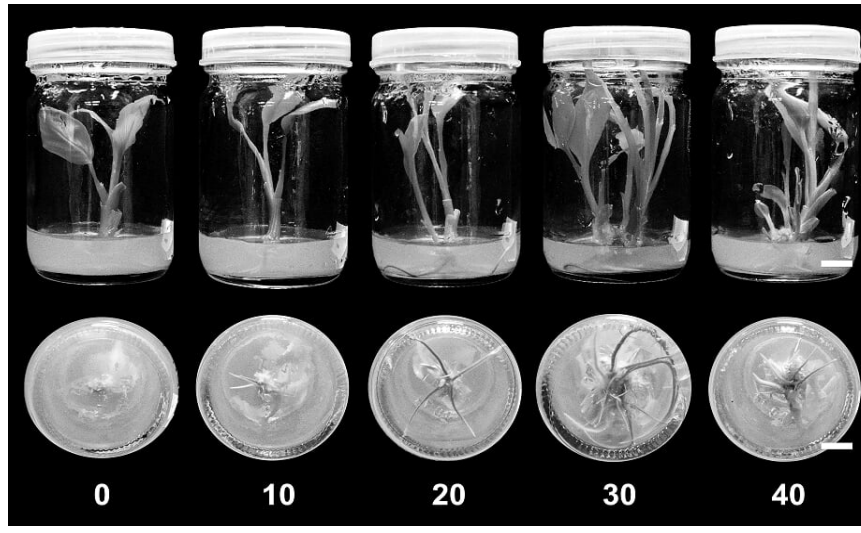
ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±S.E. หาก F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบความความแตกต่างทางสถิติ (*) ค่าเฉลี่ยถูกวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการ DMRT ตัวอักษรในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ

3. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นดอกดินในหลอดทดลอง

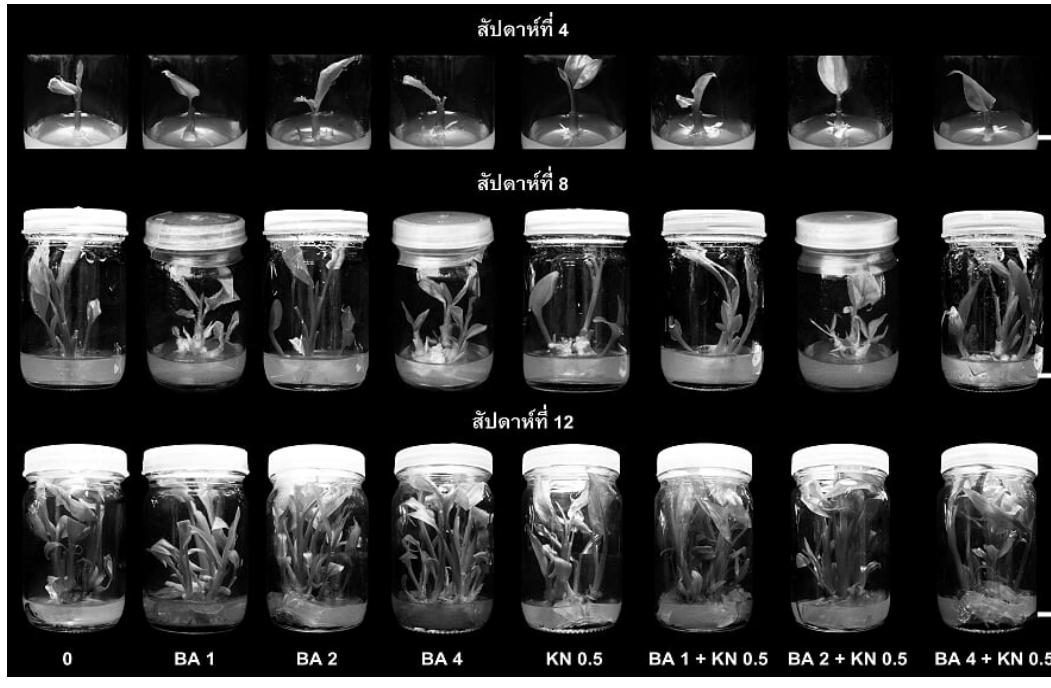
หลังจากตัดส่วนโคนลำต้นจากยอดซึ่งเจริญขึ้นใหม่จากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร ให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA และ KN ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) นาน 4 สัปดาห์ พบการเจริญของยอดใหม่ในทุกสูตรอาหาร ทั้งนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ส่งผลต่อการเกิดยอดใหม่และความสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่มากที่สุด (2.60±0.24 ยอด/ชิ้นพืช) แต่ยอดใหม่ที่สูงที่สุด (3.18±0.14 เซนติเมตร) พบจากชิ้นพืชที่เลี้ยงบนสูตรอาหารชุดควบคุม (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) เมื่อย้ายชิ้นพืชลงบนอาหารใหม่และเลี้ยงต่อจนครบ 8 สัปดาห์ ผลการทดลองมีความคล้ายคลึงกับสัปดาห์ที่ 4 โดยอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชที่สูงที่สุด (4.60±0.60 ยอด/ชิ้นพืช) (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของความสูงของยอดใหม่จากทุกสูตรอาหารในสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) ซึ่งแสดงว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ไม่ส่งผลต่อความสูงของยอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อย้ายชิ้นพืชจากทุกสูตรอาหารมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนและความสูงของยอดใหม่ในทุกสูตรอาหารเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) ซึ่งจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชที่มากที่สุด (10.40±0.68 ยอด/ชิ้นพืช) และน้อยที่สุด (6.60±0.60 ยอด/ชิ้นพืช) พบจากชิ้นพืชที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 และ 0 มิลลิกรัม/ลิตร (ชุดควบคุม) ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเลี้ยงมากกว่า 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการเติม KN กลับส่งผลให้จำนวนยอดใหม่ลดลง (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3)

ผลการทดลองที่ 4 สัปดาห์แรกของการเลี้ยงยังพบว่ารากสามารถเจริญขึ้นได้จากชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารทุกสูตร ถึงแม้สูตรอาหารชุดควบคุมพบจำนวนรากใหม่ต่อชิ้นพืชที่สูงที่สุด (3.60±0.68 ราก/ชิ้นพืช)แต่จำนวนรากที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกับจำนวนรากจากอาหารในสูตรอื่นๆ ในทางสถิติ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างทางสถิติของความยาวราก โดยอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากที่มีความยาวมากที่สุด (2.98±0.36 เซนติเมตร) ขณะที่ความยาวรากที่เกิดขึ้นจากอาหารวุ้นในชุดควบคุม และอาหารวุ้นที่มี BA เพียงชนิดเดียวหรือมี KN รวมอยู่ด้วยนั้นสั้นกว่า (ตารางที่ 2) เมื่อเลี้ยงชิ้นพืชต่อจนครบ 8 สัปดาห์ กลับไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งจำนวนและความยาวของรากใหม่ (ตารางที่ 2) ดังนั้นความเข้มข้นของ BA และ KN ที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญให้รากใหม่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชครบ 12 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชมีจำนวนและความยาวของรากที่มากขึ้น (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) โดยชิ้นพืชที่เลี้ยงบนสูตรอาหารชุดควบคุมมีจำนวนรากใหม่ต่อชิ้นพืชน้อยที่สุดคือ 8.80±0.20 ราก/ชิ้นพืช ขณะที่ชิ้นพืชซึ่งผ่านการเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (17.80±1.53 ราก/ชิ้นพืช) และรากที่เกิดขึ้นมีความยาวมากที่สุด (5.44±1.12 เซนติเมตร) (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3) อย่างไรก็ตามความยาวรากนี้ไม่แตกต่างกับความยาวของรากจากสูตรอาหารอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3)

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นดอกดินในหลอดทดลองเพราะสูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้ได้ยอดใหม่จำนวนมาก โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการยืดยาวของยอดใหม่และการเจริญของรากใหม่ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 3)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของชิ้นพืชทดลอง จำนวนและความสูงของยอดใหม่ จำนวนและความยาวของรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นดอกดินบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลเข้มข้น 0-40 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)



รูปที่ 3 การเจริญของยอดและรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA และ KN ความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัม/ลิตร) นาน 8 สัปดาห์ และเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอีก 4 สัปดาห์ รวมระยะเวลาการเลี้ยงชิ้นพืชทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ (บาร์ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 = 1 เซนติเมตร, สัปดาห์ที่ 12 = 2 เซนติเมตร)

ตารางที่ 2 จำนวนและความสูงของยอดใหม่ จำนวนและความยาวของรากใหม่ที่เกิดจากการนำส่วนโคนลำต้นของต้นดอกดินไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมความเข้มข้นของ BA และ KN แตกต่างกัน นาน 8 สัปดาห์ ก่อนย้ายชิ้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 4 สัปดาห์ รวมระยะเวลาการเลี้ยงทั้งสิ้น 12 สัปดาห์

การเจริญของยอด						
	สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 8		สัปดาห์ที่ 12	
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช	ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช	ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช	ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)
0 (ชุดควบคุม)	1.00 ± 0.00^{C}	3.18 ± 0.14^{A}	2.40 ± 0.24^{B}	7.96 ± 0.15	6.60 ± 0.60^{D}	12.16 ± 0.25
BA 1	1.20 ± 0.20^{BC}	2.74 ± 0.19^{AB}	2.80 ± 0.20^{B}	5.60 ± 1.35	7.60 ± 0.24^{CD}	12.20 ± 0.80
BA 2	2.60 ± 0.24^{A}	2.30 ± 0.19^{BC}	4.60 ± 0.60^{A}	7.08 ± 0.58	10.40 ± 0.68^{A}	12.16 ± 1.06
BA 4	2.20 ± 0.37^{AB}	1.92 ± 0.10^{C}	3.60 ± 0.24^{AB}	7.10 ± 0.21	10.00 ± 0.63^{AB}	11.76 ± 0.48
KN 0.5	1.80 ± 0.20^{ABC}	2.08 ± 0.12^{C}	2.20 ± 0.20^{B}	7.62 ± 0.14	8.20 ± 0.37^{BCD}	11.64 ± 0.74
BA 1+KN 0.5	2.00 ± 0.55^{ABC}	1.94 ± 0.13^{C}	2.40 ± 0.51^{B}	7.48 ± 0.27	9.00 ± 0.71^{ABC}	13.02 ± 0.41
BA 2+KN 0.5	1.60 ± 0.24^{ABC}	2.16 ± 0.31^{BC}	3.40 ± 0.87^{AB}	6.80 ± 0.39	8.40 ± 0.81^{ABCD}	10.10 ± 0.55
BA 4+KN 0.5	2.00 ± 0.45^{ABC}	2.92 ± 0.30^{A}	3.00 ± 0.45^{B}	8.08 ± 0.54	7.40 ± 0.93^{CD}	12.66 ± 0.32
F-Test	*	*	*	-	*	-
การเจริญของราก						
	สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 8		สัปดาห์ที่ 12	
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนรากใหม่/ชิ้นพืช	ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)	จำนวนรากใหม่/ชิ้นพืช	ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)	จำนวนรากใหม่/ชิ้นพืช	ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)
0 (ชุดควบคุม)	3.60 ± 0.68	1.64 ± 0.27^{B}	6.00 ± 1.52	2.42 ± 0.26	8.80 ± 0.20^{C}	4.70 ± 0.94
BA 1	1.80 ± 0.37	1.68 ± 0.25^{B}	6.20 ± 0.49	2.60 ± 0.26	9.80 ± 0.58^{C}	3.92 ± 0.65
BA 2	1.80 ± 0.37	1.04 ± 0.11^{B}	6.80 ± 1.66	2.48 ± 0.48	14.20 ± 1.43^{B}	3.94 ± 0.21
BA 4	1.60 ± 0.24	0.96 ± 0.14^{B}	4.20 ± 1.20	2.06 ± 0.27	14.80 ± 1.16^{AB}	2.92 ± 0.24
KN 0.5	2.60 ± 0.68	2.98 ± 0.36^{A}	4.80 ± 0.80	2.22 ± 0.10	9.60 ± 0.81^{C}	4.40 ± 1.02
BA 1+KN 0.5	2.20 ± 0.37	1.44 ± 0.24^{B}	5.00 ± 1.05	2.54 ± 0.19	11.80 ± 1.07^{BC}	3.96 ± 0.40
BA 2+KN 0.5	2.60 ± 0.24	1.44 ± 0.29^{B}	4.80 ± 1.16	2.40 ± 0.65	13.40 ± 1.03^{B}	2.88 ± 0.32
BA 4+KN 0.5	1.60 ± 0.60	1.00 ± 0.25^{B}	5.00 ± 1.00	1.60 ± 0.31	17.80 ± 1.53^{A}	5.44 ± 1.12
F-Test	-	*	-	-	*	-

ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±S.E. หาก F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบความความแตกต่างทางสถิติ (*) ค่าเฉลี่ยถูกนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการ DMRT ตัวอักษรในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ

รูปที่ 4 ต้นดอกดินที่เจริญจากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ภายหลังจากการปลูกและอนุบาลนาน 6 สัปดาห์

4. การอนุบาลและย้ายต้นพืชออกปลูก

หลังจากนำต้นพืชจากทุกสูตรปลูกในถุงปลูกซึ่งบรรจุดินปลูกสำเร็จรูปร่วมกับกาบมะพร้าวสับที่อัตราส่วน 6:1 และใช้พลาสติกใสคลุมชุดปลูกเพื่อควบคุมความชื้นก่อนนำไปเลี้ยงอนุบาลในเรือนเพาะชำ หลังจากออกปลูกครบ 6 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชจากแต่ละสูตรอาหารมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ต้นพืชที่เจริญจากสูตรอาหารชุดควบคุมมีร้อยละการรอดชีวิตเมื่อออกปลูกที่ 88 ขณะที่ต้นพืชซึ่งผ่านการเลี้ยงจากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีร้อยละการรอดชีวิตของต้นพืชเมื่อออกปลูกต่ำที่สุด (50%) ร้อยละการรอดชีวิตเมื่อออกปลูกที่สูงที่สุด (95) พบจากต้นพืชที่ผ่านการเลี้ยงจากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 4)

ตารางที่ 3 ร้อยละการรอดชีวิตของต้นพืชจากอาหารสูตรต่างๆ หลังจากนำต้นพืชอนุบาลออกปลูกเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร (มิลลิกรัม/ลิตร)	ร้อยละการรอดชีวิต
ชุดควบคุม (0)	88
MS+BA 1	50
MS+BA 2	95
MS+BA 4	58
MS+KN 0.5	64
MS+BA 1+KN 0.5	91
MS+BA 2+KN 0.5	78
MS+BA 4+KN 0.5	83

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองการขยายพันธุ์ของพืชสกุลขมิ้นหลายชนิดนั้น นิยมใช้ตาจากเหง้ามาเป็นชิ้นพืชเริ่มต้นในการทดลอง [13-14, 16, 22] แต่เหง้าเป็นส่วนที่อยู่ใต้ดินจึงมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อตามธรรมชาติสูง ดังนั้นหากใช้เหง้าเป็นชิ้นพืชเริ่มต้นทดลองจะส่งผลให้ได้จำนวนพืชปลอดเชื้อภายหลังขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวต่ำ [23] ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ตาข้างจากส่วนโคนของลำต้นเหนือดินเป็นชิ้นพืชทดลอง เนื่องจากส่วนโคนลำต้นไม่ได้สัมผัสกับดินโดยตรงเหมือนตาจากเหง้าและตาบริเวณดังกล่าวยังมีกาบใบห่อหุ้มอยู่ ซึ่งหลังจากนำตาข้างไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ายอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชทดลองโดยตรงหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องจาก BA เป็นสารกลุ่มไซโทไคนิน (cytokinin) ที่มีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งการพักตัว (dormancy) และการข่มจากตายอด (apical dormancy) [7] การศึกษานี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาในพืชวงศ์ขมิ้นหลายชนิดที่พบว่าการใช้สารกลุ่มไซโทไคนินเพียงอย่างเดียว [16-17, 24] หรือร่วมกับออกซินในความเข้มข้นต่ำ [11, 18] ทำให้เกิดยอดใหม่โดยตรงจากชิ้นพืชทดลองได้ การที่เกิดยอดโดยตรงจากชิ้นพืชนี้เป็นการขยายพันธุ์พืชที่สามารถคงพันธุกรรมเดิมของพืชได้ ดังรายงานที่พบว่ายอดใหม่ที่เกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นพืชมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับต้นแม่ (donor plant) [11]

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำเพียงชิ้นส่วนหนึ่งของต้นพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ดังนั้นจึงส่งผลให้ชิ้นพืชที่นำมาใช้ไม่สามารถสร้างอาหารและพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่เหมือนในสภาวะธรรมชาติ ดังนั้นชิ้นพืชในหลอดทดลองจึงต้องการคาร์บอนจากแหล่งอื่นมาสนับสนุนเพื่อการเจริญเติบโต [25] น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่พืชส่วนมากสังเคราะห์ขึ้นแล้วลำเลียงไปสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณที่ต้องการเพื่อใช้ในกระบวนการแมทาบอลิซึมของพืชหรือเก็บสะสมเป็นแหล่งอาหารสำรองในรูปแป้ง [26-27] ด้วยเหตุนี้น้ำตาลซูโครสจึงถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนจากการตรึงคาร์บอนในอากาศสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนมากใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2-4% [7] ดังนั้นเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงต้นดอกดินในหลอดทดลอง การศึกษานี้จึงเริ่มหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสเป็นอันดับแรกก่อนที่จะศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ต่อไป จากการนำชิ้นพืชทดลองไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0-40 กรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นพืชทดลองทุกชิ้นสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ การรอดชีวิตของต้นดอกดินจากอาหารเลี้ยงที่ปราศจากน้ำตาลซูโครสนี้คล้ายคลึงกับต้น *Alocasia amazonica* ที่พบว่าต้นพืชยังมีชีวิตรอดและสามารถนำออกปลูกสู่สภาพธรรมชาติได้เมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปราศจากการเติมน้ำตาลซูโครสเป็นระยะเวลา 30 วัน [28] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชิ้นพืชมีการปรับตัวจากเฮเทอโรทรอฟ (heterotroph) หรือมิกโซทรอฟ (mixotroph) กลับมาเป็นผู้ผลิตหรือออโตทรอฟ (autotroph) เพื่อให้มีชีวิตรอด อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งปราศจากการเติมน้ำตาลซูโครสจะลดลงเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น [29] เพราะขาดแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ดำเนินกระบวนการหรือควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแมทาบอลิซึมต่างๆ [26-27, 30] ในการศึกษานี้พบว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยให้ชิ้นพืชทดลองมีการเจริญดีที่สุด โดยมีจำนวนและความสูงของยอดใหม่ จำนวนและความยาวของรากใหม่ที่มากที่สุด (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการสนับสนุนการใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร ในอาหารที่ใช้ขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้นในหลอดทดลองหลายชนิด [16-17, 19, 31] ขณะที่พืชสกุลขมิ้นบางชนิดใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 กรัม/

ลิตร ในระหว่างขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก [11, 24] การศึกษานี้ยังพบว่ายอดและรากของต้นดอกดินมีการเจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงหรือต่ำกว่า 30 กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิด ในกรณีของยอด [32-34] และราก [19, 35-36] การลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสไปจากระดับที่เหมาะสมทำให้ยอดมีการเจริญที่ลดลงเพราะต้นพืชถูกจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโต [26, 30] ขณะที่รากมีการเจริญที่ลดลงอาจเป็นเพราะน้ำตาลซึ่งทำหน้าที่เป็นสัญญาณเคมีช่วยให้เกิดการแสดงออกของยีนและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ออกซินในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดรากลดลง [37] ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ยอดและรากเจริญน้อยลงเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลที่สูงเกินไปทำให้เกิดสภาวะเครียดในต้นพืช [27] มีผลลดหรือยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง [38] ตลอดจนทำให้ค่าออสโมลาริตี (osmolarity) ของอาหารเลี้ยงเปลี่ยนแปลงไปซึ่งส่งผลต่อการดูดน้ำและแร่ธาตุได้ [39-41]

ไซโทไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญในการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมาก [7] จึงมักถูกนำมาใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองอย่างแพร่หลาย ซึ่งการขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้นหลายชนิดในหลอดทดลองใช้ thidiazuron (TDZ) ซึ่งเป็นไซโทไคนินชนิดหนึ่งในการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม TDZ ส่งผลต่อเซลล์พืชเป็นเวลานานเนื่องจากเป็นสารที่ใช้ระยะเวลาในการสลายช้ากว่าไซโทไคนินชนิดอื่น [42] จึงส่งผลให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ผิดไปจากปกติได้ เช่น ใบที่ยอดมีลักษณะหงิกงอผิดปกติ แคระแกร็น หรือฉ่ำน้ำ [43-45] เพื่อไม่ให้ปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้น รวมทั้งมีรายงานว่าพืชไม้เนื้ออ่อนสามารถตอบสนองและเจริญให้ยอดใหม่ที่สมบูรณ์แข็งแรงเมื่อใช้ BA ในการขยายพันธุ์ [46] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ BA ในการขยายพันธุ์ต้นดอกดิน ทั้งนี้พบการใช้ KN ซึ่งเป็นไซโทไคนินอีกชนิดหนึ่งร่วมกับ BA สามารถก่อให้เกิดอิทธิพลร่วม (synergistic effects) ของไซโทไคนินในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ในหลอดทดลองได้มากกว่าการใช้ไซโทไคนินเพียงชนิดเดียว [47-48] ดังที่พบในการศึกษาของ *C. caesia* ซึ่งเป็นพืชสกุลขมิ้นชนิดหนึ่ง [13] ด้วยเหตุดังกล่าวการศึกษานี้จึงศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ KN เพื่อใช้เป็นสูตรอาหารสำหรับการขยายพันธุ์ต้นดอกดินในหลอดทดลอง โดยจากการทดลองพบว่าชิ้นพืชของต้นดอกดินที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ได้จำนวนยอดใหม่ที่มากที่สุด ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ขยายพันธุ์ต้น *C. longa* ได้ดีที่สุด [23, 49] และหากใช้ BA เข้มข้นมากกว่า 2 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่ว่าจะมีหรือไม่มี KN ร่วมด้วยก็ตามทำให้จำนวนของยอดใหม่ลดลงเมื่อเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ ซึ่งแสดงว่า BA ที่ความเข้มข้นนี้เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ดอกดิน การเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนินขึ้นไปจากระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะส่งผลชะลอหรือยับยั้งการเกิดยอดใหม่ได้ [7] ดังที่พบจากผลการทดลองในพืชสกุลขมิ้นหลายชนิด [10-11, 16, 22-24, 31, 50-51] นอกจากนี้ การใช้ BA ร่วมกับ KN ในการศึกษานี้ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดให้มากขึ้น ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการขยายพันธุ์ *C. aromatica* [50] และ *C. zeodoaria* [13] ในด้านความสูงของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นนั้น ปกติแล้วการเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงส่งผลให้ความสูงของยอดใหม่ลดลง เนื่องจากความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นพืชเปลี่ยนแปลงไป [7] อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของ BA และ KN ที่ใช้ไม่ส่งผลกระทบต่อความสูงของยอด จึงเป็นไปได้ว่าต้นดอกดินมีการปรับสมดุลของความเข้มข้นระหว่างไซโทไคนินกับออกซินภายในต้นพืชใหม่ในช่วงสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งแตกต่างจากในพืชสกุลขมิ้นหลายชนิดที่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงส่งผลให้ยอดใหม่มีความยาวลดลง [11, 13, 16, 23-24] เมื่อ

นำต้นพืชย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 4 สัปดาห์ ยอดที่เกิดขึ้นมีความยาวและจำนวนเพิ่มขึ้นอีก 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับผลในสัปดาห์ที่ 8 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นพืชมีการปรับสมดุลความเข้มข้นของไซโทไคนินและออกซินภายในต้นพืชให้ไปในทิศทางที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นอวัยวะใหม่ (organogenesis) มากยิ่งขึ้น [7]

เนื่องจากไซโทไคนินเป็นสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของสารกลุ่มออกซินซึ่งมีบทบาทหน้าที่สำคัญในการชักนำให้เกิดราก [7] โดยพืชสกุลขมิ้นบางชนิด เช่น *C. mangga* พบว่า BA มีผลยับยั้งการเกิดราก [51] ดังนั้นผลของ BA และ KN ต่อการเจริญของรากจึงถูกศึกษาในงานวิจัยนี้ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าชิ้นพืชของต้นดอกดินสามารถเจริญให้รากได้ตามปกติหลังจากเลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารที่มี BA และ KN ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นาน 4 สัปดาห์ แต่การเพิ่มความเข้มข้นของ BA และ KN ทำให้ความยาวของรากลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มทำให้จำนวนของรากใหม่ลดลงด้วยหากแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าในพืชวงศ์ขมิ้นหลายชนิดที่พบว่าสารกลุ่มไซโทไคนินไม่มีผลยับยั้งการเกิดราก [11, 13, 16-17, 19, 49, 52] แต่การเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารเลี้ยงส่งผลให้รากมีการเจริญที่ลดลง [16, 19, 49] อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อจำนวนและความยาวของรากใหม่เมื่อเลี้ยงพืชทดลองต่อบนอาหารที่มี BA และ KN ต่อจนครบ 8 สัปดาห์ การศึกษานี้จึงแตกต่างจากงานวิจัยในพืชวงศ์ขมิ้นหลายชนิดที่ต้องใช้อาหารที่เติมออกซินในการชักนำให้เกิดราก [11, 13, 16, 23, 31, 51] การศึกษานี้ยังพบว่าความเข้มข้นของ BA และ KN ที่ใช้ยังส่งผลต่อเนื่องแม้จะย้ายพืชทดลองไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนาน 4 สัปดาห์แล้วก็ตาม โดยเฉพาะจำนวนรากใหม่ของต้นดอกดินที่พบความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาในพืชสกุลเข้าพรรษา (*Globba* L.) ที่พบว่าจำนวนและความยาวของรากมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อย้ายต้นพืชที่เจริญจากสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA ที่แตกต่างกันมาเลี้ยงต่อบนสูตรอาหารที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช [53] การตอบสนองที่แตกต่างกันนี้จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่าการใช้ความเข้มข้นของไซโทไคนินที่แตกต่างกันสามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นพืชไปอีกระยะหนึ่งภายหลังการเลิกใช้ โดยรวมแล้วต้นดอกดินที่ผ่านการเลี้ยงจากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดรากใหม่จำนวนรากมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bejoy และคณะ [52] ที่การมีอิทธิพลร่วมระหว่างกันของไซโทไคนินส่งผลให้เกิดจำนวนรากใหม่สูงกว่าการใช้ไซโทไคนินเพียงชนิดเดียว

การนำต้นพืชจากสภาพปลอดเชื้อออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมจริงเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญของการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่บ่งบอกถึงความแข็งแรงสมบูรณ์ของต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปกติแล้วต้นพืชที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองมักมีการสร้างคิวทิเคิล (cuticle) เคลือบแผ่นใบน้อยและปากใบมีการทำงานที่ผิดไปจากปกติเนื่องจากสภาพความชื้นในหลอดทดลอง [54] ดังนั้นในการเริ่มต้นออกปลูกจึงนำพลาสติกใสมาคลุมชุดปลูกระยะหนึ่งก่อนจะเริ่มปรับสภาพต้นดอกดินให้เข้ากับสภาพความชื้นในสภาพธรรมชาติผ่านการเปิดพลาสติกออกเป็นระยะ การค่อยๆ ปรับสภาพของต้นดอกดินรวมกับการใช้วัสดุปลูกที่เหมาะสมกับธรรมชาติของต้นดอกดิน ทำให้ต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตหลังนำออกปลูกสูงถึงร้อยละ 83-95 โดยต้นพืชที่ได้จากแต่ละสูตรอาหารมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกันซึ่งอาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ ซึ่งไม่เพียงส่งผลต่อการสร้างและการพัฒนาเกิดเป็นอวัยวะใหม่ แต่ยังมีผลต่อพัฒนาการของเนื้อเยื่อลำเลียง

(vascular tissue) และการเชื่อมต่อของเนื้อเยื่อลำเลียงระหว่างส่วนยอดและรากอีกด้วย [55] ทำให้ต้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมมีการเชื่อมต่อกันของเนื้อเยื่อลำเลียงระหว่างส่วนยอดและรากที่ดีจึงทำให้ต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อนำอนุบาลออกปลูกสูงถึง 95%

โดยสรุปแล้วการศึกษานี้ทำให้ได้วิธีการขยายพันธุ์ต้นดอกดินในหลอดทดลอง โดยเริ่มจากการใช้ส่วนโคน ลำต้นเหนือดินขนาด 5 เซนติเมตร เป็นชิ้นพืชสำหรับขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิว ก่อนตัดแยกส่วนตาข้างขนาด 3 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อเพื่อพัฒนาเป็นต้นปลอดเชื้อในหลอดทดลอง (6 สัปดาห์ ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ 8 สัปดาห์ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช) จากนั้นนำต้นพืชดังกล่าวมาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นขนาด 1.5 เซนติเมตร แล้วเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 8 สัปดาห์ ตามด้วยย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอีก 4 สัปดาห์ (รวม 12 สัปดาห์) โดย 1 ชิ้นพืชสามารถเพิ่มจำนวนให้ยอดใหม่ได้ประมาณ 10 ยอด และต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 95% เมื่อนำออกปลูกนาน 6 สัปดาห์ รวมเวลาทั้งสิ้น 32 สัปดาห์ ผลการศึกษาและวิธีการที่ได้ไม่เพียงแต่เป็นประโยชน์สำหรับการอนุรักษ์พันธุ์ต้นดอกดินเท่านั้น แต่ยังสามารถเป็นวิธีการขยายพันธุ์ต้นพืชให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเพื่อสนับสนุนพืชชนิดนี้ให้เป็นพืชเศรษฐกิจอันนำไปสู่การอนุรักษ์พันธุ์ต้นดอกดินอย่างยั่งยืนอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Wallich, N. (1830). Plantae Asiaticae rariores, or, Descriptions and figures of a select number of unpublished East Indian plants. Vol. 1. London: Treuttel and Wrtz.
2. Jenjittikul, T., & Larsen, K. (2000). *Kaempferia candida* Wall. (Zingiberaceae), a new record for Thailand. *Thai Forest Bulletin*, *28*, 45-49.
3. Techaprasan, J., & Leong-korničkovแ, J. (2011). Transfer of *Kaempferia candida* to *Curcuma* (Zingiberaceae) based on morphological and molecular data. *Nordic Journal of Botany*, *29*(6), 773-779.
4. Leong-Skornickova, J., Tran, H. D., Newman, M., Lamxay, V., & Bouamanivong, S. (2012). *Curcuma candida*. The IUCN Red List of Threatened Species. Available from URL: https://www.iucnredlist.org/ species/201926/2729434. 12 February 2019.
5. Chamchumroon, V., Suphuntee, N., Tetsana, N., Poopath, M., & Tanikkool, S. (2017). Threatened Plants in Thailand. Bangkok: Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation.

6. Convention on Biological Diversity Secretariat. (n.d). Aichi Biodiversity Targets. Available from URL: https://www.cbd.int/sp/targets. 12 February 2019.
7. George, E. F., Hall, M. A., & De-Klerk, G. J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Dordrecht: Springer.
8. Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *42*, 206-214.
9. Benson E. E. (1999). Plant Conservation Biotechnology. London: Taylor and Francis.
10. Shukla, S. K., Shukla, S., Koche, V., & Mishra, S.K. (2007). *In vitro* propagation of tikhur (*Curcuma angustifolia* Roxb.): a starch yielding plant. *Indian Journal of Biotechnology*, *6*, 274-6.
11. 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.
12. Kou, Y., Ma, G., Teixeira da Silva, J. A., & Liu, N. (2013). Callus induction and shoot organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuate* Wall. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *112*: 1-7.
13. Bharalee, R., Das, A., & Kalita, M. C. (2005). *In vitro* clonal propagation of *Curcuma caesia* Roxb and *Curcuma zeodoria* Rosc from Rhizome bud explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *14*, 61-63.
14. Lo-apirukkul, S., Jenjittikul, T., Saralamp P., & Prathanturarug, 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.
15. Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G., & Wu, G. (2011). *In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma kwangsiensis* Lindl. (Zingiberaceae). *Plant Growth Regulation*, *64*, 141–145.
16. Naz, S., Ilyas, S., Javad, S., & Ali, A. (2009). *In vitro* clonal multiplication and acclimatization of different varieties of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pakistan Journal of Botany*, *41*(6), 2807-2816.
17. Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y., & Saralamp, P. (2005). Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *80*(3), 347-351.
18. Salvi, N. D., George, L., & Eapen, S. (2000). Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *62*(3), 235-238.

19. Kusumastuti, M., 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), 279-288.
20. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497.
21. Larsen, K., & Larsen, S. (2006). Ginger of Thailand. Chaing Mai: Queen Sirikit Botanic Garden, The Botanical Garden Organization.
22. Prakash, S., Elangomathavan, R., Seshadri, S., Kathiravan, K., & Ignacimuthu, S. (2004). Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. plantlets from rhizome and leaf sheath explants. *Plant Cell Tiss. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *78*, 159-165.
23. Rahman, M. M., Amin, M. N., Jahan H. S., & Ahmad, R. (2004). *In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. a valuable spice plant in Bangladesh. *Asian Journal of Plant Sciences*, *3*(3), 306-309.
24. Loc, N. H., Duc, D. T., Kwon, T. H., & Yang, M. S. (2005). Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) - a valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *81*(1), 119-122.
25. Kumar, S., & Singh, M. P. (2009). Plant Tissue Culture. New Delhi: APH Publishing Corporation.
26. Wind, J., Smeekens, S., and Hanson, J. (2010). Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phyto chemistry*, *71*, 1610-1614.
27. Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular Biology Reports*, *40*, 2837-2849.
28. Jo, E. A., Tewari, R. K., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *96*, 307-315.
29. Desbrunais, A., Noirot, M., & Charrier, A. (1992). Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *31*, 105-110.
30. Koch, K. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *47* (1), 509–540.
31. Shahinozzaman, M., Ferdous, M. M., Faruq, M. O., Azad, M. A. K., & Amin, M. N. (2013). Micropropagation of black turmeric (*Curcuma caesia* Roxb.) through *in vitro* culture of rhizome bud explants. *Journal of Central European Agriculture, 14*(3), 110-115.

32. Grel, S., & Gulsen, Y. (1998). The effects of different sucrose, agar and pH levels on *in vitro* shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, *22*. 363-373.

33. Preethi, D., Sridhr, T. M., & Naidu, C. V. (2011). Carbohydrate concentration influences on *in vitro* plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Phytology*, *3*(5), 61-64.

34. Yaseen, M., Ahmad, T., Abbasi, N. A., & Hafiz, I. A. (2009). *In vitro* shoot proliferation competence of apple rootstock M.9 and M.26 on different carbon sources. *Pakistan Journal of Botany*, *41*(4), 1781-1795.

35. Ahmad, T., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A., and Ali, A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. *Pakistan Journal of Botany*, *39*(4), 1269-1275.

36. de Faria, R. T., Rodrigues, F. N., Oliveira, L. V. R., & Muller, C. (2004). *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, *22*(4), 780-783.

37. Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, *14*(Suppl): s185-s205.

38. Hdider, C., & Desjardins, Y. (1994). Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *36*(1), 27-33.

39. Arditti, J. (2008). Micropropagation of orchids 2nd Edition. Oxford: Wiley-Blackwell.

40. Jain, N., & Babbar, S. B. (2013). Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyl explants of *Syzygium cuminii*. *Biologia Plantarum*, *47*(1):133-136.

41. MacGregor, D. R., Deak, K. I., Ingram, P. A., & Malamy, J. E. 2008. Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *The Plant Cell*, *20*, 2643-2660.

42. Mok, M. C., Martin, R. C., & Mok, D. W. S. (2000). Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *36*(2), 102-107.

43. Akram, M., & Aftab, F. (2015). Effect of cytokinins on *in vitro* seed germination and changes in chlorophyll and soluble protein contents of teak (*Tectona grandis* L.). *Biochemistry & Physiology*, *4*(166), https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000166.

44. Lavakumaran, L., and Seran, T. H. (2014). Effect of 6-benzyl-aminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot organogenesis of *Aloe vera* (L.) Burm. f. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *74*(4), 497-501.

45. Subotić, A., Jevremović, S., Cingel, A., & Milošević, S. (2008). Effect of urea-type cytokinins on axillary shoots regeneration of *Impatiens walleriana* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *22*(3), 817-819.
46. Debergh, P. C., & Zimmerman, R. H. (1991). Commercial Micropropagation in Asia. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
47. Saha, S., Mori, H., & Hattori, K. (2007). Synergistic effect of kinenin and benzyl adenine plays a vital role in high frequency regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) in relation to ethylene production. *Breeding Science*, *57*, 197–202.
48. Ashraf, M. F., Aziz, M. A., Kemat, N., & Ismail, I. (2014). Effect of cytokinin types, concentrations and their interactions on *in vitro* shoot regeneration of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernandez. *Electronic Journal of Biotechnology*, *17*, 275-279.
49. Jala, A. (2012). Effects of NAA BA and sucrose on shoot induction and rapid micropropagation by trimming shoot of *Curcuma longa* L. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, *17*(4), 54-60.
50. Nayak, S. (2000). *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb. *Plant Growth Regulation*, *32*, 41-47.
51. Raihana, R., Faridah, Q. Z., Julia, A. A., Abdelmageed, A. H. A., & Mihdzar, A. K. (2011). *In vitro* culture of *Curcuma mangga* from rhizome bud. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(28), 6418-6422.
52. Bejoy, M., Dan, M., Anish, N. P., Nair, A. R. G., Radhika B. J., & Manesh, K. (2012). Micropropagation of an Indian Ginger (*Curcuma vamana* Sabu and Mangaly): a wild relative of tumeric. *Biotechnology*, *11*(6), 333-338.
53. Chuengpanya, R., Chuenboonngarm, N., Jenjittikul, T., Thammasiri, K., Umpunjun, P., & Muangkroot, A. (2015). Effects of N6-benzyladenine on micropropagation of *Globba williamsiana* 'Dok Khao'. In: Boonkerd, T. Editor. Proceedings of the 9th Botanical Conference of Thailand; 3-5 June 2015. Bangkok, Thailand. p. 1-13.
54. Pospóšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., & Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, *42*(4), 481-497.
55. Roberts, L. W., Gahan, P. B., & Aloni, R. (1988). Vascular differentiation and plant growth regulators. Berlin: Springer-Verlag.