การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชันในหลอดทดลอง

In vitro Plant Regeneration *via* Callus Culture in Turmeric (*Curcuma longa* L.)

กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล* ศักดิ์ชัย กรรมารางกูร และ จีรนันท์ กล่อมนรา แก้วรักษา

Korn Koarapatchaikol*, Sakchai Kanmarangkol and Jeeranan Klomnara Kaewraksa

[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี*

[1]*Biology Department, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University*

Received : 5 October 2016

Accepted : 20 December 2016

Published online : 10 January 2017

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงตาจากเหง้าและหน่ออ่อนของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุนและอำเภอท่าชนะบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2, 4-D, NAA และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงใช้สูตร MS เติม 2, 4-D หรือ NAA หรือ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเกิดแคลลัสหลายแบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง แคลลัสสีน้ำตาลอ่อนที่เกิดขึ้นในอาหารที่เติม NAA หรือ NAA ร่วมกับ BAP เท่านั้นที่สามารถย้ายเลี้ยงเพิ่มจำนวนก้อนแคลลัสได้ เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BAP หรือ NAA พบว่า NAA ความเข้มข้นต่ำๆ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นสูงแคลลัสพัฒนาไปเป็นกลุ่มตาสีเขียวจำนวนมากและเจริญพัฒนาเป็นหน่อ โดยอาหารสูตรที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดต้นเฉลี่ยมากที่สุด (15.8 ต้นในขมิ้นชันจากอำเภอบ้านตาขุนและ 11.9 ต้นในขมิ้นชันจากอำเภอท่าชนะ) การเกิดรากจำนวนมากเมื่อย้ายหน่อไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 หรือ 3,0 มก./ล. การย้ายต้นกล้าขมิ้นชันไปอนุบาลโดยปลูกลงกระถางดินแล้วครอบด้วยถุงพลาสติกใสทำให้มีอัตรารอดชีวิตสูง จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานของต้นขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสพบว่าไม่แตกต่างจากต้นแม่

คำสำคัญ : แคลลัส การเกิดต้น ขมิ้นชัน

***Corresponding author. E-mail** : koarapatchaikol1919@gmail.com

Abstract

Buds of rhizome and sprout of *Curcuma longa* L. which collected from Bantakun and Thachana district were cultured under aseptic condition to induce callus formation. The MS culture media containing various concentrations of 2, 4-D or NAA or BAP were used. The results showed that various types of callus were achieved depending upon types and plant growth regulator ratios in the culture media. Only the pale brown callus was capable subculture to extend the number of callus masses. When the callus transferred to modified MS regeneration media, numerous green nodes occurred and subsequently developed to shoots. Maximum plant regeneration was achieved on the medium supplemented with 0.1 mg/l NAA + 3.0 mg/l BAP (15.8 plants, turmeric collected from Bantakhun and 11.9 plants, turmeric collected from Thachana, respectively). Prolific roots of shoots were obtained when the shoots were transferred to MS culture medium containing 1.0 or 3.0 mg/l NAA. High survival of plantlets was attained after acclimatization in potted-soils covering with transparent plastic bags. Morphological observations of callus derived plantlets did not differ to maternal plant.

Keywords: callus, plant regeneration, turmeric

บทนำ

ขมิ้นชัน (turmeric) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae จัดเป็นพืชเศรษฐกิจประเภทเครื่องเทศชนิดหนึ่ง มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศต่างๆ ในเขตร้อนถึงเขตอบอุ่น เช่น ไทย อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เปรู จาไมกา เป็นต้น เป็นพืชที่นิยมปลูกในทุกภาคของประเทศไทยโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อประกอบอาหารและทำยาสมุนไพร เหง้า (rhizome) ของขมิ้นชันเป็นส่วนของลำต้นใต้ดิน ทำหน้าที่สะสมสารสีเหลืองมีชื่อว่า เคอร์คูมิน (curcumin) สารชนิดนี้ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol) หรือ กรดอะซีติก (acetic acid) และน้ำมันหอมระเหย (volatile) ที่ประกอบด้วยเภสัชกรรมสารหลายชนิด เช่น ทูเมอร์โรน (turmerone) ซิงจิเบอร์รีน (zingiberene) ซาบินีน (sabinene) บอร์นีออล (borneol) ซินีออล (cineol) เทอร์มีรอล (termerol) และ เฟลเลนดรีน (phellandrene) (Misra&Sahu, 1977) สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ในการรักษาโรคหลายชนิดทั้งในมนุษย์และสัตว์ เช่น โรคระบบทางเดินอาหาร โรคถุงน้ำดี โรคตับ แผลไฟไหม้และน้ำร้อนลวก (Surh, 2002) รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์และโรคมะเร็งบางชนิด รวมทั้งรักษาโรคปอดและไซนัส (Surh, 2002 ; Palve&Nayak, 2012) คนไทยสมัยโบราณใช้ประโยชน์จากขมิ้นชันในการรักษาโรคต่างๆ จึงปรากฏอยู่ในตำหรับยาแพทย์แผนไทย ส่วนการแพทย์แผนปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยจนยอมรับสรรพคุณของขมิ้นชัน จึงนำมาบรรจุไว้ในกลุ่มยาในงานสาธารณสุขมูลฐาน ขมิ้นชันจึงถูกใช้อย่างแพร่หลายทั้งด้านอาหาร สุขภาพอนามัย ความงาม และยารักษาโรค (Shrishail *et al*., 2013; Hegde *et al*., 2012)

10 ปี ที่ผ่านมานี้ความต้องการใช้ขมิ้นชันเพิ่มขึ้นมาก ทำให้ผลผลิตที่เกิดขึ้นไม่เพียงพอเพราะมีผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ การศึกษาวิจัยทั้งในและต่างประเทศเพื่อเพิ่มผลผลิตยังมีน้อยมาก ส่วนใหญ่ทำในแปลงปลูกโดยวิธีการเขตกรรมพบทั่วไปในประเทศผู้นำการผลิต ได้แก่ อินเดีย ปากีสถาน อินโดนีเซียและบังคลาเทศ ปัญหาสำคัญอื่นๆ ที่ทำให้ผลผลิตต่ำ

เช่น โรคเน่าของเหง้าและแมลงรบกวน ความไม่สม่ำเสมอและคุณภาพต้นพันธุ์ไม่ดีพอ อุปสรรคเหล่านี้จะเห็นผลชัดเจนในกรณีที่มีการปลูกในปริมาณมาก กอปรกับปัญหาสุขภาพคนจำนวนมากจึงหันมารักษาและให้ความสำคัญพืชสมุนไพร การส่งเสริมให้มีการปลูกโดยใช้ต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพดี ผลผลิตสูง ปลอดโรคและมีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง วิธีการที่นิยมนำมาแก้ปัญหาดังกล่าวคือ การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ghosh*et al*., 2013; Singh *et al*., 2013) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แก้ปัญหาเรื่องปริมาณต้นพันธุ์ การระบาดของโรค และการปรับปรุงพันธุ์ประสบความสำเร็จในพืชมาแล้วจำนวนมาก เช่น กล้วยไม้ (Yam&Arditti, 2009) เป็นต้น

ที่ผ่านมาการขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้ตาจากเหง้ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige&Skoog, 1962) โดยเติม BAP (benzyl aminopurine) และหรือร่วมกับ NAA (naphthalene acetic acid) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมออกซิน เช่น NAA หรือ 2, 4-D ที่มีความเข้มข้นสูง จะทำให้เกิดแคลลัส (Mukhri&Yamaguchi, 1986 ;Naz *et al*., 2009) และเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารที่มีออกซินร่วมกับไซโทไคนินที่มีความเข้มข้นต่ำๆ จะเกิดต้นหรือโซมาติกเอ็มบริโอ (Zapata *et al*., 2003; Nasirujjaman *et al*., 2005) ส่วน Roopadarshini (2010) รายงานเพิ่มเติมว่า หน่อที่เกิดขึ้นสามารถเกิดรากได้เองในอาหารชักนำให้เกิดต้น และยังพบว่า 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นและอัตราส่วนของฮอร์โมนมีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันตอบสนองแตกต่างกัน

จากการศึกษาข้อมูลของขมิ้นชัน พบว่ามีรายงานการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสน้อยมาก ทั้งที่แคลลัสมีประโยชน์ทั้งด้านการปรับปรุงพันธุ์และการเลี้ยงเซลล์เพื่อสกัดเภสัชกรรมสาร รวมทั้งการสร้างต้นพันธุ์ปลอดโรคปริมาณมาก จึงเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของขมิ้นชันของไทยในอนาคต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อขมิ้นชัน การชักนำให้เกิดต้นและรากในสภาพปลอดเชื้อ รวมทั้งการอนุบาลและย้ายปลูกลงดินโดยใช้ขมิ้นชันที่เก็บตัวอย่างสำหรับทดลองมาจากพื้นที่ 2 แห่งคือ อำเภอบ้านตาขุนที่มีเนื้อเหง้าสีส้มและอำเภอท่าชนะที่มีเนื้อเหง้าสีเหลือง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การชักนำแคลลัสจากเหง้าด้วย 2, 4-D

นำเหง้าแก่ (mature rhizome) ของขมิ้นชันทั้งสองชนิดที่เก็บมาจากอำเภอบ้านตาขุนและอำเภอท่าชนะมาตัดเป็นท่อนๆ ให้มีตาติดอยู่ 1-2 ตา ล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง แล้วฟอกฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10% (v/v) นาน 20 นาที ตามด้วย 5% นาน 10 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนตัดแต่งเอาเฉพาะตาขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร นำลงวางเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 4 สูตร (0, 1.5, 3.5, 5.5 มก./ล.) สูตรละ 10 ซ้ำ ปิดฝาขวดแล้วนำไปวางเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดบันทึกผลการเกิดแคลลัสทั้งลักษณะ สีและขนาด รวมทั้งถ่ายภาพประกอบ

2. การชักนำแคลลัสจากหน่ออ่อนด้วย 2, 4-D

นำหน่ออ่อน (sprout) ขมิ้นชันทั้ง 2 ชนิด ที่ได้จากการเพาะเหง้าในแปลงปลูกมาล้างทำความสะอาด ตัดให้เหลือเฉพาะโคนต้นที่มีความยาวประมาณ 5 ซม. ลอกกาบใบทิ้งก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอร็อกซ์ความเข้มข้น10 % (v/v) นาน 20 นาทีแล้วย้ายไปฟอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 5 % นาน 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกกาบใบทิ้งให้เหลือเฉพาะกาบใบอ่อนและตา ตัดตายอดนำลงวางเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D

ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 4 สูตร (0, 1.5, 3.5, 5.5มก./ล.) สูตรละ 10 ซ้ำ ปิดฝาขวดแล้วนำไปวางเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดบันทึกผลการเกิดแคลลัส ทั้งลักษณะ สีและขนาด รวมทั้งถ่ายภาพประกอบ

3. การชักนำแคลลัสจากหน่ออ่อนด้วย NAA

นำหน่ออ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเหง้าในแปลงมาล้างทำความสะอาด ตัดใบส่วนปลายทิ้งให้เหลือเฉพาะโคนต้นที่มีความยาวประมาณ 5 ซม. ลอกกาบใบแก่ทิ้ง นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น10 % (v/v) นาน 20 นาทีแล้วย้ายชิ้นเนื้อเยื่อไปฟอกฆ่าเชื้ออีก 1 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 5 % นาน 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว3ครั้งลอกกาบใบทิ้งให้เหลือเฉพาะกาบใบอ่อนและตา ตัดเอาเฉพาะตายอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1.5, 3.5, 5.5 มก./ล.) ร่วมกับ BAP (0, 0.5, 1.5 มก./ล.) รวม 15 สูตร สูตรละ 10 ซ้ำ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดบันทึกการตอบสนองแบบต่างๆ สีและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของตายอดที่เพาะเลี้ยง รวมทั้งบันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงประกอบผลการทดลอง

4. การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส

คัดเลือกแคลลัสสีน้ำตาลอ่อนจากข้อ 3 มาตัดแยกขนาดให้มีขนาดใกล้เคียงกัน (∅=1 ซม.) แล้วนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมหลายๆ ครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอ เมื่อเจริญเติบโตมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 ซม. จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MMS ดัดแปลง (modified MS) ที่เติมมอลล์เอ็กแทร็กต์ (malt extract) 100 มก./ล. กลูตามีน (glutamine) 100 มก./ล. และ NAA (0, 0.1, 0.5 มก./ล.) ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0, 1.5, 3.0 มก./ล.) รวมทั้งสิ้น 9 สูตรสูตรละ 10 ซ้ำ เพื่อชักนำให้พัฒนาเป็นต้น ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดบันทึกการตอบสนองของแคลลัส จำนวนแคลลัสที่เกิดต้นและจำนวนต้นที่เกิดจากแคลลัส รวมทั้งบันทึกภาพประกอบผลการทดลอง

5. การชักนำราก การอนุบาลและย้ายปลูก

ตัดแยกหน่อขมิ้นชันที่ไม่มีรากที่พัฒนามาจากแคลลัสออกมาเป็นหน่อเดี่ยวๆ เพื่อนำลงชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มก./ล. รวม 4 สูตร สูตรละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดบันทึกจำนวนหน่อที่เกิดรากและจำนวนรากของแต่ละหน่อ เมื่อหน่อมีรากแข็งแรงดีแล้วจึงนำไปล้างเอาวุ้นที่ติดรากออกด้วยน้ำประปา หลังจากนั้นตัดใบออกครึ่งหนึ่งทุกใบแล้วนำลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาดปากกว้าง 5 เซนติเมตร นำไปวางอนุบาลในเรือนเพาะชำที่มีแสงประมาณ 50% ครอบด้วยถุงพลาสติกใสให้น้ำด้วยวิธีสเปรย์วันละครั้งเพื่อควบคุมความชื้นให้สูงในช่วง 2 สัปดาห์หลังปลูก เมื่อครบกำหนดนำถุงครอบออกและวางเลี้ยงต่อไปประมาณ 4 สัปดาห์ จึงย้ายปลูกลงแปลงได้

6. การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

การเก็บข้อมูลจากการทดลองได้แก่ พรรณนาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงในขณะเพาะเลี้ยงโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ภาพถ่ายประกอบ ส่วนข้อมูลเชิงจำนวนนำมาหาค่าร้อยละของเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยง และหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD test สำหรับจำนวนหน่อหรือต้นหรือราก

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1.การชักนำแคลลัสจากตาของเหง้าแก่ด้วย 2, 4-D

จากการตัดตายอดจากเหง้าแก่ขมิ้นชันที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุนและอำเภอท่าชนะที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้วลงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ รวม 4 สูตร (0, 1.5, 3.5, 5.5มก./ล.) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าตาขมิ้นชันที่นำลงเพาะเลี้ยงยังคงมีสีเขียวในช่วงระยะแรกๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม หลังจาก

เพาะเลี้ยงผ่านไป 6 สัปดาห์ ก็ยังไม่เกิดแคลลัส ลักษณะตาในชุดควบคุมยังคงมีสีเขียว แต่ในอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นสูง ตาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า 2, 4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากตาของเหง้าแก่ขมิ้นชันจากทั้งสองแหล่งปลูกได้ ซึ่งโดยปกติ 2, 4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงของพืช (Borjian& Arak, 2013; Saensouk*et al*., 2007) มีสาเหตุหลายประการที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่น ส่วนประกอบของอาหาร สภาวะเพาะเลี้ยง อายุและชนิดของเหง้า โดยมีรายงานสนับสนุนของ Tsay&Tseng (1979) ที่พบว่า 2, 4-D ที่มีความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเกิดแคลลัสของมันฝรั่ง นอกจากยับยั้งการเกิดแคลลัสแล้วยังพบว่า 2, 4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดเล็กคุณภาพต่ำที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในพืชบางชนิด (Abdellatef&Khalafallah, 2008) สาเหตุน่าจะมาจาก 2, 4-D มีความเป็นพิษสูงและหากใช้ในความเข้มข้นสูงจะทำให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ (Saensouk *et al*., 2007)

2. การชักนำแคลลัสจากหน่ออ่อนด้วย 2, 4-D

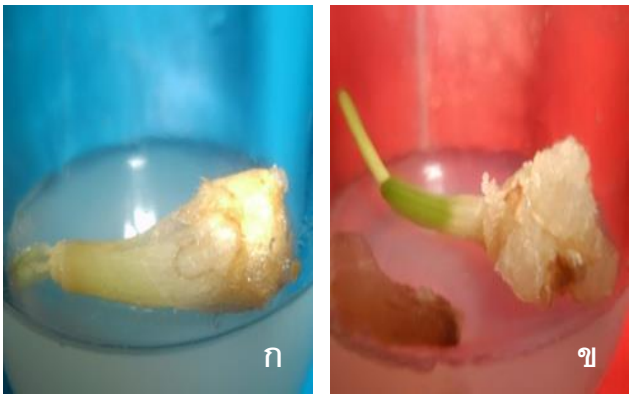
หลังจากนำตาจากหน่ออ่อนลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ รวม 4 สูตร (0, 1.5, 3.5, 5.5 มก./ล.) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ 2, 4-D ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เกิดแคลลัสในอาหารที่เติม 2, 4-D โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเติม 2, 4-D ความเข้มข้น 3.5 หรือ 5.5 มก./ล. จะทำให้เกิดแคลลัสมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) สูตรอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัสสูงสุดคือ อาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 5.5 มก./ล. ส่วนการตอบสนองแบบอื่นได้แก่ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ต้น และราก ไม่ปรากฏให้เห็นแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงต่อไปนาน 2-3 เดือน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตอบสนองของตาจากหน่ออ่อนของขมิ้นชันที่นำลงเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ

2, 4-D (มก./ล.)	แหล่งขมิ้นชัน	ลักษณะการตอบสนอง			
		ตาย/ไม่เจริญ (%)	แคลลัส (%)	หน่อ (%)	โซมาติกเอ็มบริโอ (%)
0	บ้านตาขุน	50	0	50	0
	ท่าชนะ	30	0	70	0
1.5	บ้านตาขุน	0	80*	50*	0
	ท่าชนะ	0	70*	80*	0
3.5	บ้านตาขุน	0	100	0	0
	ท่าชนะ	0	100	0	0
5.5	บ้านตาขุน	0	100	0	0
	ท่าชนะ	0	100	0	0

หมายเหตุ * มีบางชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเกิดทั้งหน่อและตา

ลักษณะการตอบสนองของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.5 และ 3.5 มก./ล. เริ่มจากบริเวณส่วนฐานของตาและไรโซมอ่อนมีการพองตัวอย่างชัดเจน (ภาพที่ 1, ก) และเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นแคลลัสสีขาวเหลืองฟูรอบๆ ส่วนฐานของตาและไรโซมอ่อน แล้วขยายขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์ที่ 3-4 (ภาพที่ 1, ข) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการย้ายไปเลี้ยง (subculture) บนอาหารใหม่สูตรเดิมเพื่อเพิ่มจำนวน แคลลัสเหล่านี้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จึงไม่สามารถนำไปชักนำให้พัฒนาเป็นต้นได้



ภาพที่ 1 การตอบสนองของชิ้นส่วนต้นกล้าท่อนที่ 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 1.5 มก./ล., เพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (ก) และ เพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ (ข)

จากผลการทดลองจะเห็นว่า 2, 4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของตาบริเวณฐานของกาบใบได้ดีในทุกระดับความเข้มข้น แต่มีแคลลัสเกิดน้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลยถ้าเลี้ยงบนอาหารบางสูตรที่ไม่เหมาะสม สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Saensouk (2011) ที่เพาะเลี้ยงกาบใบอ่อนของว่านเปราะทอง (*Cornukaempferia aurantiflora* Mood & Larsen) ทำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ซึ่งการชักนำให้เกิดแคลลัสหรือโซมาติกเอ็มบริโอจากส่วนที่ยังอ่อนทำได้ง่ายในพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Te-Chato *et al*., 2002) ข้าว (Ramesh *et al*., 2009) เป็นต้น สาเหตุมาจากแคลลัสของขมิ้นชันเกิดจากเซลล์ที่ยังอ่อนอยู่บริเวณฐานของกาบใบและไรโซมอ่อน เพราะส่วนที่ยังอ่อนประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นต้นพืชได้ง่าย สอดคล้องกับรายงานวิจัยในขิง (ginger) (Taha *et al*., 2013; Nkere&Mbanaso, 2010) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน ซึ่งเป็นไปตามหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เนื้อเยื่ออ่อนจะมีศักยภาพ (totipotency) ในการแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่ายกว่าเซลล์ที่มีอายุมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวพบว่าเซลล์ที่โตเต็มที่จะสูญเสียความสามารถในการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเป็นต้นพืชอย่างรวดเร็ว (Wernicke & Brettell, 1980) อย่างไรก็ตาม แคลลัสของขมิ้นชันทั้งสองชนิดที่เกิดขึ้นจากการชักนำด้วย 2, 4-D ไม่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นได้ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นไม่ได้ประกอบด้วยเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cell) จึงไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้จึงอาจจะต้องเติมออกซินผสมไซโทไคนินในอาหารชักนำแคลลัสด้วยจึงจะได้แคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (Borjian&Arak, 2013; Srangsam&Kanchanapoom, 2007)

3. การชักนำแคลลัสจากหน่อด้วย NAA

จากการตัดตาจากหน่ออ่อนของขมิ้นชันทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง นำลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA (0, 0.5, 1.5, 3.5, 5.5 มก./ล.) ร่วมกับ BAP (0, 0.5, 1.5 มก./ล.) ความเข้มข้นต่างๆ ปรากฏว่าเกิดแคลลัสลักษณะต่างๆ หลายแบบ ถ้าเปรียบเทียบระหว่างขมิ้นชันทั้งสองแหล่งตัวอย่างพบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสี ขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกัน สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด (100 %) คือ สูตรที่เติม BAP 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1.5และ 3.5 มก./ล. และ BAP 1.5 มก./ล.ร่วมกับ NAA 1.5, 3.5 และ 5.5 มก./ล. แต่สูตรที่เติม BAP 0.5 และ 1.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. ชักนำให้เกิดหน่อ ส่วนลักษณะของแคลลัสได้แก่ สี การเกาะกันของเซลล์และขนาด มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NAA และ BAP เป็นสำคัญ โดยอาหารที่มี NAA อย่างเดียวหรือความเข้มข้นสูงกว่า BAP แคลลัสส่วนใหญ่จะเกาะตัวกันแน่น (compact callus) สีของแคลลัสมีตั้งแต่สีขาว ขาวครีม น้ำตาลอ่อน น้ำตาลและน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของแคลลัสแต่ละชนิด พบว่าอาหารที่เติม NAA อย่างเดียวความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 3.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดแคลลัสเนื้อแน่นสีขาว แคลลัสเนื้อแน่นสีขาวครีมและแคลลัสสีน้ำตาลอ่อนตามลำดับ แคลลัสเหล่านี้สามารถย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมได้ แต่การเพิ่มขนาดเป็นไปอย่างช้าๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคลลัสสีน้ำตาลอ่อนมีการเจริญเป็นก้อนเล็กๆ อย่างต่อเนื่อง และเนื้อแคลลัสที่เกิดก่อนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนแคลลัสสีน้ำตาลเข้ม สีน้ำตาล และสีขาวฟู จะชะงักการเจริญเติบโตเมื่อย้ายเลี้ยงและเปลี่ยนเป็นสีดำในที่สุด

ตารางที่ 2 ผลของ NAA และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อตายอดจากหน่ออ่อนของขมิ้นชันทั้งสองแหล่งตัวอย่างทดลอง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

NAA	BAP	ลักษณะการตอบสนอง		สีแคลลัส		ปริมาณเกิดแคลลัส (%)	
(มก./ล.)	(มก./ล.)	ตาขุน	ท่าชนะ	ตาขุน	ท่าชนะ	ตาขุน	ท่าชนะ
0	0	หน่อเดี่ยว	หน่อเดี่ยว	-	-	-	-
0.5	0	แคลลัสเนื้อแน่น	แคลลัสเนื้อแน่น	ขาว	ขาว	35	40
1.5	0	แคลลัสเนื้อแน่น	แคลลัสเนื้อแน่น	ขาวครีม	ขาวครีม	45	50
3.5	0	แคลลัสเนื้อแน่น	แคลลัสเนื้อแน่น	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล	75	65
5.5	0	แคลลัสฟูฉ่ำน้ำ	แคลลัสฟูฉ่ำน้ำ	น้ำตาล	น้ำตาล	65	80
0.5	0.5	หน่อเดี่ยว	-	-	-	-	-
1.5	0.5	แคลลัสฉ่ำน้ำ	แคลลัสฉ่ำน้ำ	ขาวครีม	ครีม	100	100
3.5	0.5	แคลลัสเนื้อแน่น	แคลลัสเนื้อแน่น	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล	100	100
5.5	0.5	แคลลัสฟู	แคลลัสฟู	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	75	80
0.5	1.5	1-3 หน่อ	1-3 หน่อ	-	-	-	-
1.5	1.5	ยอด-แคลลัส	ยอด-แคลลัส	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	100	100
3.5	1.5	แคลลัสฉ่ำน้ำ	แคลลัสฉ่ำน้ำ	น้ำตาล	น้ำตาลเข้ม	100	100
5.5	1.5	แคลลัสฉ่ำน้ำ	แคลลัสฟู	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	100	100

ความสามารถในการเกิดแคลลัสของขมิ้นชันเกิดจากการชักนำด้วย NAA จากตาของหน่อโดยพบว่าเกิดแคลลัสหลายแบบแปรผันตามความเข้มข้นของ NAA หรือ NAA ร่วมกับ BAP ผลการทดลองด้วย NAA จึงแตกต่างจากผลของ 2, 4-D อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าชนิดของออกซินมีอิทธิพลในการชักนำแคลลัสชนิดเอ็มบริโอเจนนิกแคลลัส (embryogenic callus) ที่จะพัฒนาไปเป็นต้นขมิ้นชัน ซึ่งก็ไม่แตกต่างจากพืชชนิดอื่นที่พบว่า NAA ชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีศักยภาพพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่า 2, 4-D ถึงแม้ว่าออกซินจะมีบทบาทสำคัญในการชักนำแคลลัสของพืช แต่พืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อออกซินแต่ละชนิดต่างกัน ในพวกธัญพืชส่วนใหญ่พบว่า 2, 4-D มีความสามารถในการชักนำแคลลัสได้ดีกว่า NAA ยกเว้นในข้าวและข้าวฟ่างถ้าเติม BAP ลงไปร่วมกับ 2, 4-D จะทำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่า (Eapen& George, 1990; Taha *et al*., 2013;) แต่ผลการทดลองนี้ในขมิ้นชันกลับพบว่า NAA หรือ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่ำๆ ชักนำแคลลัสได้ดีกว่า 2, 4-D รวมทั้งแคลลัสชนิดเอ็มบริโอเจนนิกแคลลัสเกิดขึ้นจากส่วนของตาที่ได้จากหน่อในแปลงไม่ใช่ตาจากเหง้าแสดงให้เห็นว่าชนิดของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงก็มีบทบาทสำคัญ ในการชักนำให้เกิดแคลลัสไม่ใช่สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเพียงอย่างเดียว

4. การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส

เมื่อย้ายแคลลัสเนื้อแน่นสีน้ำตาลอ่อนและแคลลัสสีขาวครีมไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้โดยมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ส่วนแคลลัสสีน้ำตาลและสีน้ำตาลเข้มเปลี่ยนเป็นสีดำไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ แคลลัสที่สามารถย้ายเลี้ยงได้ เมื่อทดลองย้ายไปเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ดัดแปลงที่เติม มอลล์เอ๊กแทรก 100 มก./ล. กลูตามีน 100 มก./ล. ร่วมกับ NAA และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า แคลลัสสีน้ำตาลอ่อนเท่านั้นที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารที่เติม BAP หรือ NAA ร่วมกับ BAP (ตารางที่ 3) เป็นที่น่าสังเกตว่า สูตรอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BAP ชักนำให้เกิดต้นที่มีรากงอกออกมาพร้อมๆ กัน แต่ถ้าเติมเฉพาะ BAP อย่างเดียวจะเกิดเฉพาะต้นเท่านั้น ปริมาณการเกิดต้นเฉลี่ยสูงสุดในขมิ้นชันที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุน 15.8 ต้น และอำเภอท่าชนะ 11.9 ต้น ที่บ่มเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 0.1 มก./ล.ร่วมกับ BAP 3.0มก./ล.(ตารางที่ 3) ส่วนอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียวจะเจริญเติบโตเป็นแคลลัสต่อไป แต่ลักษณะของแคลลัสจะเปลี่ยนไปเป็นสีขาวจับกันหลวมๆ

ตารางที่3 ผลของ NAA ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดต้นจากแคลลัสของขมิ้นชัน

NAA (มก./ล.)	BAP (มก./ล.)	ลักษณะการตอบสนอง		ปริมาณแคลลัสที่ตอบสนอง (%)		จำนวนหน่อ ($\bar{x}$)	
		บ้านตาขุน	ท่าชนะ	บ้านตาขุน	ท่าชนะ	บ้านตาขุน	ท่าชนะ
0	0	-	-	0	0	0^{e}	0^{e}
0	1.5	หน่อ	หน่อ	100	100	2.2^{d}	2.3^{d}
0	3.0	หน่อ	หน่อ	80	70	6.5^{b}	5.5^{b}
0.1	0	แคลลัส	แคลลัส	100	100	0^{e}	0^{e}
0.1	1.5	หน่อ+ราก	หน่อ+ราก	50	70	4.5^{c}	4.1^{c}
0.1	3.0	หน่อ+ราก	หน่อ+ราก	100	90	15.8^{a}	11.9^{a}
0.5	0	แคลลัส	แคลลัส	100	100	0^{e}	0^{e}
0.5	1.5	หน่อ+ราก	หน่อ+ราก	60	40	3.5^{c}	4.6^{c}
0.5	3.0	หน่อ+ราก	หน่อ+ราก	90	80	2.3^{d}	1.4^{de}

LSD_{05}ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเป็นต้นขมิ้นชันหลังจากย้ายแคลลัสสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 2, ก) ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BAP โดยมีสัดส่วนของ BAP สูงกว่า NAA จะเกิดตุ่มสีเหลืองเข้มและเปลี่ยนเป็นสีเขียวในเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 2, ข) แล้วพัฒนาเป็นหน่อ โดยมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสเกิดหน่อสูงสุดในอาหารที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BAP 3.0 มก./ล. (100 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขมิ้นชันจากอำเภอบ้านตาขุนและอำเภอท่าชนะ ตามลำดับ) ตุ่มสีเขียวเหล่านี้จะเกิดขึ้นจำนวนมากและกลายเป็นยอดอ่อนโผล่ขึ้นมาภายในสัปดาห์ที่ 5 ต่อมาพัฒนาเป็นต้นกล้าขนาดต่างๆ โดยสูตรที่เติม NAA ร่วมกับ BAP จะเกิดต้นที่มีราก (ภาพที่ 2, ค)

ภาพที่ 2 การเกิดต้นขมิ้นชันจากแคลลัส, แคลลัสสีน้ำตาลอ่อน (ก), เกิดตุ่มสีเขียว (ข), พัฒนาเป็นต้น (ค) และกลุ่มต้นอายุ 2 เดือน ที่ย้ายปลูกลงดิน (ง)

จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำด้วย 2,4-D ไม่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นในอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BAP ได้ แม้ว่าจะเป็นแคลลัสขนาดใหญ่และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ตรงกันข้ามกับแคลลัสสีน้ำตาลอ่อนที่เกิดขึ้นในอาหารสูตรที่เติม NAA อย่างเดียวหรือร่วมกับ BAP ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถพัฒนาเป็นต้นขมิ้นชันได้บนอาหารสูตร MMS ที่เติม NAA ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ BAP ความเข้มข้นสูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและสัดส่วนของ NAA ต่อ BAP มีความสำคัญ เพราะถ้าหาก NAA มีความเข้มข้นสูงกว่า BAP จะเจริญเป็นแคลลัสต่อไป การพัฒนาเป็นต้นพืชจากแคลลัสส่วนใหญ่ต้องอาศัยไซโทไคนินเป็นสำคัญ หรือไซโทไคนินร่วมกับออกซินโดยที่ต้องมี

ไซโทไคนินความเข้มข้นสูงกว่าออกซิน ออกซินที่ใช้ได้ผลดีได้แก่ NAA และ IAA (Anis *et al*., 2003; Borjian& Arak, 2013) ตัวอย่างเช่นการชักนำให้แคลลัสของข้าวฟ่างเกิดต้นได้ดีต้องใช้อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ Kinetin (Anjaneyulu *et al*., 2011) ส่วนในกล้วยหอมทองพบว่าNAA ร่วมกับ BAP จะชักนำให้เกิดต้นได้ (Srangsam&Kanchanapoom, 2003)

ตารางที่ 4 ผลของ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเกิดรากของหน่อขมิ้นชันพันธุ์ตาขุนและพันธุ์ท่าชนะหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

NAA (มก./ล.)	การเกิดราก (%)		จำนวนราก ($\bar{x}$)	
	ตาขุน	ท่าชนะ	ตาขุน	ท่าชนะ
0	90	100	3.42 [c]	2.53 [b]
1.0	100	100	7.51 [a]	5.81 [a]
3.0	100	100	7.63 [a]	6.25 [a]
5.0	90	100	4.55 [b]	2.73 [b]

LSD_{05}ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

5. การชักนำราก การอนุบาลและการย้ายปลูก

จากการสังเกตพบว่าหน่อขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจากแคลลัสสามารถเกิดรากได้เองถ้าในอาหารได้เติม NAA ร่วมกับ BAP โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่เติม NAA ปริมาณน้อยกว่า BAP (ตารางที่ 4) หรือแม้แต่อาหารที่เติม BAP เพียงอย่างเดียวที่เพาะเลี้ยงไว้โดยไม่ย้ายเลี้ยงเป็นเวลานาน (ไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์) การปล่อยให้เกิดรากเองในอาหารทำให้เสียเวลานาน ดังนั้นการใช้ออกซินช่วยกระตุ้นให้เกิดรากจะช่วยย่นระยะเวลาได้ จากการแยกหน่อขมิ้นชันที่เกิดขึ้นไปชักนำรากในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าหน่อขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ทุกสูตร เกิดรากได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มก./ล. มีปริมาณรากเฉลี่ยเกิดขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เติม NAA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 4)

พฤติกรรมของรากที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เพาะเลี้ยงภายใต้การผสม NAA ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าส่วนใหญ่รากจะมีทิศทางการงอกกระจายหลายทิศทางรวมทั้งเจริญขึ้นเหนืออาหารวุ้น กล่าวคือเจริญไปในทิศทางหนีแรงโน้มถ่วงของโลก รากที่เกิดจากหน่อที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้นสูง (5.0 มก./ล.) มีแนวโน้มเกิดรากฝอยน้อยและรากมีลักษณะอวบใหญ่และความยาวจำกัด เพราะออกซินความเข้มข้นสูงยับยั้งการสร้างรากแขนง (Bausher and Yolenosky, 1987) ขนาดที่โตขึ้นเกิดจากมีการแบ่งเซลล์จำนวนมากทำให้ขยายขนาดของราก และออกซินความเข้มข้นสูงกระตุ้นการสร้างเอทธิลีน (ethylene) ทำให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของราก และส่งผลให้มีการเจริญเติบโตทางใบและลำต้นลดลงด้วย (Taiz & Zeiger, 2002)

อย่างไรก็ตาม จากการอนุบาลและย้ายปลูกต้นขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส พบว่าวิธีการอนุบาลโดยการตัดใบครึ่งใบทุกใบเพื่อลดการคายน้ำร่วมกับการครอบด้วยถุงพลาสติกใสเพื่อควบคุมความชื้นทำให้ต้นขมิ้นชันมีอัตรารอดตายสูงมากกว่า 95 % และมีการเจริญเติบโตแข็งแรงดี (ภาพที่ 2, ง)

สรุปผลการวิจัย

การชักนำแคลลัสจากตาของเหง้าแก่ขมิ้นชันโดยใช้ 2, 4-D ไม่สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ถ้าใช้ตาจากหน่ออ่อนจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สามารถชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้นได้

NAA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีคุณภาพดีจากตาของหน่ออ่อนขมิ้นชัน และจะพัฒนาเป็นต้นได้เมื่อย้ายแคลลัสที่มีสีน้ำตาลอ่อนเนื้อแน่นไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA ความเข้มข้นต่ำๆ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้นที่สูงกว่า

ต้นขมิ้นชันที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองจะเกิดรากได้เองบางส่วนโดยไม่ต้องชักนำด้วย NAA แต่การเติม NAA เพียงเล็กน้อยลงในอาหารจะส่งเสริมให้เกิดรากคุณภาพดี มีรากฝอยจำนวนมาก ทำให้สามารถอนุบาลและย้ายปลูกง่ายและมีอัตรารอดตายสูง

เอกสารอ้างอิง

Abdellatef, E.,&Khalafallah, M.M. (2008). Influence of growth regulators on callus Induction from hypocotyls of medium staple Cotton (*Gossypiumhirsutum* L.) cultivar Barac B -67e. *Journal of Soil Nature*, *2*,17-22.

Anis, M., Faisal, M.,& Singh, S.K. (2003).Micropropagation of Mulberry (*Morusalba* L.) through *in vitro*culture of shoot tip and nodal explants. *Plant Tissue Culture, 13*, 47-51.

Anjaneyulu, E., Hemalatha, S., Bharath Raj, S.,&Balaji, M. (2011).Callus induction and plant regeneration in finger Millet (*Eleusinecoracana* L.). *Libyan Agriculture Research Center Journal International*, *2*, 57-61.

Bausher, M.G.,&Yolenosky, G. (1987). Morphological changes in Citrus association with relatively high concentration of paclobutrazol. *Journal of Plant Growth Regulation*, *5*, 139-147.

Borjian, L.,& Arak, H. (2013). A study on the effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, Kinetin, and 2, 4-D) on callus induction in *Brassica nap*us.*International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 5*, 519-521.

Eapen, S.,& George, L. (1990). Influence ofphytohormones, carbohydrates, amino acids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger Millet. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *22*, 87-93.

Ghosh, A., Chatterjee, P.,&Ghosh, P. (2013).A protocol for rapid propagation of genetically *true to type* Indian Turmeric (*Curcuma longa* L.) through *in vitro* culture technique.*Advances in Applied Science Research*, *4*, 39-45.

Hegde, M.N., Shetty, S., Yelapure, M.,&Patil, A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of aqueous and hydro-alcoholic *Curcuma Longa*extracts against endodontic pathogens. *IOSR Journal of Pharmacy, 2,*192-198.

Misra, S.K.,&Sahu, K.C. (1977).Screening of some indigenous plants for antifungal activity against dermatophytes.*Indian Journal of Pharmacology*,*9,* 269-272.

Mukhri, T.,& Yamaguchi, H. (1986).*In vitro*plant multiplication from rhizomes of Turmeric (*Curcuma domestica* Val.) and ternoelawak (*C. xanthorhiza*Roxb.).*Plant Tissue Culture Letter*, *3,* 28-30.

Murashige, T.,&Skoog, F. (1962).A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue cultures.*PhysiologiaPlantarum*, *15,* 473-497.

Nkere, C.K.,&Mbanaso, E.N.A. (2010).Optimizing concentrations of growth regulators for *in-vitro* Ginger propagation.*Journal of Agrobiology*, *27,* 61–65.

Nasirujjaman, K., Uddin, M.S., Zaman, S.,& Reza, M.A. (2005).Micropropagation of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) through *in vitro* rhizome bud culture.*Journal of Biological Science, 5,* 490-492.

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,* 2807-2816.

Palve, Y.P.,&Nayak, P.L. (2012).Curcumin: A wonder anticancer drug.*IJPRBS, 3,* 60-69.

Ramesh, M., Murugiah, V.,& Gupta, A.K. (2009). Efficient *in vitro*plant regeneration *via*leaf base segments of indicaRice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology, 47,* 68-74.

Roopadarshini, V. (2010). High frequency shoots multiplication and callus regeneration of Turmeric. *International Journal of Biochemical Biotechnol*ogy*, 6,* 723–733.

Saensouk, P. (2011). Callus induction and plant regeneration from leaf explant of *Cornukaempferiaaurantiflora* Mood & Larsen. *Pakistan Journal of Botany*, *43,* 2415-2418.

Saensouk, P., Theerakulpisut, P., Kijwijan, B.,&Bunnag, S. (2007). Effects of 2,4-D on callus induction from leaf explants of *Cornukaempferialarsenii*P. Saensouk. *Gardens' Bulletin Singapore, 59,* 183-188.

Singh, D., Singh, H., Nongalleima, K., Moirangthem, S.,& Devi, S. (2013). Analysis of growth, yield potential and horticultural performance of conventional vs. micropropagatedplants of *Curcuma longa* var. Lakadong. *African Journal of Biotechnology, 12,* 1604-1608.

Shrishail, D., Handralharish, K., Ravichandra, H., Tulsianand, G.,&Shruthi, S.D. (2013). Turmeric: Nature's precious medicine. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research, 6,* 10-16.

Srangsam, A.,&Kanchanapoom, K. (2003).Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid Banana (*Musa* sp.) 'Gros Michel', AAA group. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *25,* 689-696.

Srangsam, A.,&Kanchanapoom, K. (2007). Establishment of *in vitro*culture of *Musa* AA group 'KluaiSa' and *Musa* AA group 'KluaiLebMue Nang' and the analysis of ploidystability. *ScienceAsia, 33,* 437-442.

Surh, Y.J. (2002). Anti-tumor promoting potential of selected spice in- gradients with anti-oxidative and anti-inflammatoryactivities: a short review. *Food Chemical Toxicology*, *40,* 1091–1097.

Taha H.S., Abbas, M.S., Aly, U.I.,&Gaber, I. (2013).New aspects for callus production, regeneration and molecularcharacterization of Ginger (*Zingiberofficinale*Rosc.)*Medicinal & Aromatic Plants*, *6,* 2-8.

Taiz, L.,& Zeiger, E. (2002). Mineral nutrition: Plant physiology. 2nd ed. Sinaver Associates Inc. Pub. p. 67-86.

Te-chato, S., Hilae, A.,&Yedum, I. (2002).Improve callus induction and embryogeniccallus formation from cultured young leaves of Oil palm seedling. *Thai Journal of Agricultural Science, 35,* 407–13.

Tsay, H.,& Tseng, M. (1979).Embryoidformation and plantlet regeneration from anther callus of sweet Potato. *Botanical Bulletin AcademiaSinica*, *20,* 117-122.

Wernicke, W., & Brettell, R. (1980). Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor*leaf.*Nature, 287,* 138 -139.

Yam, T.W.,&Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Report*, *3,* 1-56.

Zapata, E.V., Morales, G.S., Lauzardo, A.N.H., Bonfil, B.M., Tapia, G.T., Sanchez, A.D.J., Valle, M.V.D.,&Aparicio A.J. (2003).*In vitro*regeneration and acclimatization of plants of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system.*Biotechnology Applied Biochemistry*, *20,* 25-31.