

การอนุรักษ์ชิงพระพุทธรบาท (*Zingiber brachystachys* Triboun & K. Larsen)

พืชถิ่นเดียวของไทยในสภาพปลอดภัย

In Vitro Conservation of *Zingiber brachystachys* Triboun & K. Larsen;
an Endemic Species in Thailandพัฒน์รี รักคิด^{1*}, พชร ปิริยะวินิต¹ และปราโมทย์ ไตรบุญ²Padnaree Rukkid^{1*}, Phatchara Piriyavinit¹ and Pramote Triboun²

Received date: 24 ม.ค. 68 Revised date: 17 เม.ย. 68 Accepted date: 30 เม.ย. 68

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2025.265319>

บทคัดย่อ

การศึกษาการอนุรักษ์ชิงพระพุทธรบาท (*Zingiber brachystachys* Triboun & K. Larsen) พืชวงศ์ชิงซึ่งจัดเป็นพืชถิ่นเดียวของไทยที่พบได้ในพื้นที่จำเพาะและมีการกระจายพันธุ์เฉพาะในบริเวณพื้นที่ที่จำกัด พืชชนิดนี้มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนของลำต้นและเหง้ามีน้ำมันหอมระเหยจึงอาจมีศักยภาพในเชิงเศรษฐกิจในอนาคต การอนุรักษ์ทรัพยากรพืชถิ่นเดียวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อเก็บรักษาพรรณพืชที่หายากซึ่งมีความเสี่ยงต่อการสูญหาย อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือภัยพิบัติทางธรรมชาติ ซึ่งการทดลองนี้จึงได้ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและอนุรักษ์ต้นชิงพระพุทธรบาทในสภาพปลอดภัย โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA ร่วมกับ BA จำนวน 12 สูตร การทดลองพบว่าอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่แข็งแรงสมบูรณ์ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มก./ล. โดยชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เฉลี่ย 20.9 ยอด/ ชิ้นส่วนพืช และเมื่อเพาะเลี้ยงชิงพระพุทธรบาทบนอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโต โดยปรับระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำตาลซูโครสจำนวน 12 สูตร พบว่าสามารถชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดภัยได้นานมากกว่า 8 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสองสูตร คือ ½MS หรือ ¼MS ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล.

คำสำคัญ: การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดภัย การเก็บรักษาด้วยวิธีชะลอการเจริญเติบโต พืชวงศ์ชิง การอนุรักษ์

Abstract

Zingiber brachystachys Triboun & K. Larsen, an endemic species found in a specific area of Thailand with a limited distribution in natural conditions, is classified in Zingiberaceae Family. This species is asexually propagated. The stem and rhizome contain natural essential oil which may have economic potential in the future. The conservation of endemic plant resources through plant tissue culture techniques is crucial to preserve rare species that might be risk of extinction due to environmental changes or natural disasters. This study was conducted to apply tissue culture techniques to the multiplication and conservation of this species. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Z. brachystachys* were done by using various concentrations of plant growth regulators, media and sucrose. The result indicated that the highest shoot number of *Z. brachystachys* from MS medium supplemented with 3 mg/l BA was 20.9 shoots per explant. After being cultured with 12 media formulations, it was found that the most suitable media for slow growth storage of *Z. brachystachys* was ½MS or ¼MS supplemented with 15 g/l sucrose. This species can survive for more than 8 months without any subculture in these 2 media formulations

Keywords: micropropagation, slow growth storage, Zingiberaceae, conservation

คำนำ

ชิงพระพุทธรบาท (*Zingiber brachystachys* Triboun & K. Larsen) เป็นพืชวงศ์ชิง (Zingiberaceae) และเป็นพืชถิ่นเดียวของไทย มีลำต้นตั้งตรงสูง 40-80 ซม. เหง้าเรียวยาว มีกลิ่นหอม ประกอบด้วยใบเดี่ยว 10-20 ใบ แผ่นใบเป็นรูปขอบขนานถึงใบหอกสีเขียว ปลายเรียวแหลม ยาว 11-18 ซม. กว้าง 2.5-5.8 ซม. เส้นใบยาว 2-3 มม. แยกเป็น 2 แฉก ก้านใบสีเขียวยาว 3-7 มม.

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี 12110

² ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

¹ Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani, 12110

² National Biobank of Thailand, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani 12120

* Corresponding author: padnaree.r@gmail.com

ก้านช่อดอกยาว 6-14 ซม. กาบสีชาคริมถึงชมพูอ่อน ใบประดับปลายแหลมผิวเกลี้ยงสีเขียวเมื่อติดผลจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ดอกสีขาวครีม อับเรณูยาว 1 ซม. รังไข่ทรงกลมขนาด 2 มม. ออกดอกช่วงปลายเดือนกรกฎาคม ถึงกันยายน พบบริเวณป่าไผ่บนเขาหินปูนที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 150-400 ม. ที่อำเภอพระพุทธรบาท จังหวัดสระบุรี (Triboun et al., 2014) และพบในพื้นที่จำกัดซึ่งมีความเสี่ยงที่จะสูญหายเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นหนึ่งในวิธีการที่สำคัญที่จะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่พบยากในสภาพธรรมชาติและสามารถนำมาใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุ์ได้ทันที ดังเช่นการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของ *Zingiber petiolatum* ซึ่งเป็นพืชหายากวงศ์ขิงของประเทศไทย โดยสามารถเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 6.7 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 17.8 ไมโครโมลต่อลิตร (Prathanturug et al., 2004) การศึกษาการขยายพันธุ์กระเทียม (*Zingiber zurumbet*) เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์กรรมโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาที่เกิดจากเหง้า พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA 0.5 มก./ล. และ IBA 0.5 มก./ล. จะชักนำให้เกิดยอดได้ 6.4 ยอด/ชิ้นส่วนพืช (Christine and Chan, 2007) ส่วนการชะลอการเจริญเติบโต (*in vitro* slow growth) เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ที่ระยะเวลาสั้นหรือปานกลางด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำเพื่อลดความถี่ในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร การปรับลดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อระดับ osmotic pressure ในเซลล์พืช ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีเพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ ยกตัวอย่างเช่นการทดลองเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ *Ipsea malabarica* ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียวและใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย เมื่อเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร ½MS สามารถเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 27 เดือน (Martin and Pradeep, 2003) Bonnier and van Tuyl (1997) ได้ทำการเพาะเลี้ยงลิ้นสนอาหาร MS ที่ปรับลดความเข้มข้นลง 1/2 -1/4 เท่า ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครส 9% พบว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ได้นาน 28 เดือน โดยที่ความสูงของต้นและจำนวนใบน้อยกว่าต้นที่เก็บรักษาในอาหาร MS สูตรมาตรฐานที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. Jewruttanasakul and Charoenwattana (2014) ได้ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมและส่งผลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นเนระพูสีไทย คือ อาหารสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 90 ก./ล. เนื่องจากเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ต้นที่ได้มีความสูงน้อยที่สุดแต่ต้นมีลักษณะปกติ และแข็งแรง จึงได้ทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการขยายพันธุ์และการเก็บรักษาด้วยวิธีชะลอการเจริญเติบโตต้นชิงพระพุทธรบาทในสภาพปลอดเชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งผลของการวิจัยที่ได้จะถูกนำไปใช้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตรเพื่อการใช้ประโยชน์ในอนาคตและเป็นส่วนหนึ่งของการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืชของไทย

วิธีการศึกษา

รวบรวมตัวอย่างต้นชิงพระพุทธรบาท (*Zingiber brachystachys* Triboun & K. Larsen) จากบริเวณอำเภอพระพุทธรบาท จังหวัดสระบุรี และนำต้นพันธุ์ที่ได้จากการสำรวจมาปลูกอนุบาลในโรงเรือนปลูกพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี โดยปลูกในกระถางมีรูระบาย ใช้ดินร่วนปนทรายที่มีความชื้นค่อนข้างสูงและมีการระบายน้ำดีในสภาพแสงแดดรำไร ฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนที่มีความสูงประมาณ 3-4 ซม. จำนวน 20 หน่ออ่อน เนื่องจากได้เชื้อพันธุ์มาจำกัด โดยล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกด้วยสบู่ จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดไหลผ่านนาน 45 นาที นำชิ้นส่วนหน่ออ่อนจุ่มในเอทานอล 70% นาน 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นดังนี้ 1. สารละลายคลอโรกซ์ 20% เป็นเวลา 20 นาที 2. สารละลายคลอโรกซ์ 20% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 15% นาน 10 นาที 3. สารละลายคลอโรกซ์ 15% เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดหน่ออ่อนให้มีขนาดประมาณ 1 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) นาน 3 เดือน บันทึกจำนวนต้นที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ คำนวณอัตราการรอดชีวิต (ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อและสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพปลอดเชื้อ)

1. การชักนำการเกิดยอด โดยนำชิ้นส่วนต้นอ่อนชิงพระพุทธรบาทจากการฟอกฆ่าเชื้อขนาดความสูงประมาณ 3-4 ซม. ที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ตัดเนื้อเยื่อบริเวณส่วนปลายออกให้เหลือส่วนเจริญปลายยอดประมาณ 1 ซม. สำหรับนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 3 เดือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ขวด แบ่งออกเป็น 12 กรรมวิธี คือ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มก./ล. บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตจำนวนและความสูงของยอดที่สมบูรณ์ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2. การชะลอการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงต้นชิงพระพุทธรบาทที่ได้จากการชักนำการเกิดยอดบนอาหาร MS นาน 3-4 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำต้นชิงพระพุทธรบาทที่มีขนาดความสูงประมาณ 3-4 ซม. ตัดเนื้อเยื่อบริเวณส่วนปลาย

ออกให้เหลือส่วนเจริญปลายยอดประมาณ 1 ซม. สำหรับนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสำหรับศึกษาการชะลอการเจริญเติบโต โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แผนการทดลองที่ใช้คือแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ความเข้มข้นของอาหาร MS จำนวน 3 ระดับ คือ $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, และ MS และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส จำนวน 4 ระดับ คือ 15, 30, 45 และ 60 ก./ล. จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ขวด บันทึกข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโตของต้นชิงพระพุทธรบาท และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหน่ออ่อนชิงพระพุทธรบาท โดยล้างทำความสะอาดหน่ออ่อนด้วยสบู่ จากนั้นล้างโดยให้น้ำไหลผ่านชิ้นส่วนพืชนาน 45 นาที แล้วจึงพอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 20% 15 นาทีและ 15% 10 นาที พบว่าชิ้นส่วนพืชรอดชีวิตและเจริญเป็นต้นได้ถึง 46.67% ซึ่งชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตมีลักษณะสีเขียว ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ หน่ออ่อนชิงพระพุทธรบาทเป็นชิ้นส่วนที่แตกต่างจากเหง้าที่ติดกับพื้นดินจึงมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการที่ค่อนข้างซับซ้อนหรือหลายขั้นตอน โดยการใช้สารละลายคลอโรกซ์ 20% และ 15% ระยะเวลา 20 นาที ไม่พบชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิต ลักษณะเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดอาจเนื่องจากการใช้เวลานานเกินไปส่งผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ประสิทธิภาพของสารพอกฆ่าเชื้อ ปริมาณความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้จะส่งผลต่อความมีชีวิตของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งปกติแล้วประสิทธิภาพจะมากขึ้นถ้าใช้เวลาและความเข้มข้นของสารมากขึ้น แต่หากใช้มากเกินไปจะเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชได้ (Khamrit and Preeman, 2019) ซึ่งมีขั้นตอนที่สอดคล้องกันกับการทดลองในพืชวงศ์ Zingiberaceae ดังการทดลองของ Tan (2016) ศึกษาการเพาะเลี้ยง rhizome bud ของพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) 5 ชนิด ได้แก่ *C. longa*, *C. zedoaria*, *C. amarotica*, *C. caesia* และ *C. mangga* ที่เป็นพืชสมุนไพรที่ถูกคุกคาม (Threatened Medicinal Plant) โดยพอกฆ่าเชื้อด้วยสาร NaClO 1.2% นาน 15 นาทีและ 1% นาน 10 นาที พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 67% และการพอกฆ่าเชื้อตายอดของ *Boesenbergia rotunda* ที่เป็นพืชสมุนไพรโดยการจุ่มในเอทานอล 70% นาน 2 นาทีตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 20% นาน 15 นาที พบว่าสามารถรอดชีวิตและเจริญเป็นต้นได้ 48% (Yusuf et al., 2011)

การชักนำยอดในสภาพปลอดเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่ตัดเนื้อเยื่อบริเวณส่วนปลายออกให้เหลือส่วนเจริญปลายยอดประมาณ 1 ซม. บนอาหารสูตรต่าง ๆ นาน 3 เดือน พบว่าต้นอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีการเจริญเติบโตและเกิดยอดเฉลี่ย 0.8 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งเมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งผลต่อการเกิดยอดใหม่อย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 20.9 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แต่เมื่อเติม BA เข้มข้นเป็น 5 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้เพียง 14.0 ยอด/ชิ้นส่วนพืช หรือการเติม NAA ร่วมด้วยก็ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดเพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเติม BA 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียวเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับชักนำต้นชิงพระพุทธรบาทให้เกิดยอดใหม่ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการขยายพันธุ์ ในขณะที่อาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. จะได้ยอดที่สูงเฉลี่ย 3.38 ซม. และยอดมีลักษณะไม่แตกต่างกับต้นที่เจริญบนอาหารสูตร MS (ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) ซึ่งอาหารสูตร MS เติม BA 3 มก./ล. นอกจากจะชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุดแล้ว ยอดที่ได้ยังคงมีลักษณะสมบูรณ์ มีสีเขียว และไม่พบการยืดยาวของยอด (Table 1 และ Figure 1) เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินมีส่วนช่วยให้เกิดกิจกรรมการแบ่งเซลล์ของพืชซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการชักนำและขยายพันธุ์ในพืช (Hartmann et al., 2001) ซึ่งอาหารทุกสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงส่งผลให้ต้นที่ได้มีรากสีขาวขนาดยาวและมีรากขนจำนวนมาก (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณชิงพระพุทธรบาทในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. เพียงอย่างเดียว เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดยอดเพื่อการขยายพันธุ์ต้นชิงพระพุทธรบาทและต้นที่ได้มีความสมบูรณ์และไม่มีความผิดปกติ การเพิ่มความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินสูงเกินกว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงอาจทำให้เกิดการยับยั้งหรือชะลอการเกิดยอดใหม่ได้ (George et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับ Kochuthressia et al. (2010) ที่ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาของต้น *Aplina purpurata* ที่เป็นพืชวงศ์ขิง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA 3 มก./ล. จะชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 6.4 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แต่เมื่อเติมความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดจำนวนยอดลดลงและยอดที่ได้เกิดอาการฉ่ำน้ำ เช่นเดียวกันกับ Yusuf et al. (2007) และ Miri (2020) เพาะเลี้ยงพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma* spp.) และ ขิง (*Zingiber officinale*) ตามลำดับ ซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิงบนอาหาร MS ที่เติม BA จนถึงระดับที่ชักนำให้เกิดได้ยอดมากที่สุดแล้ว หากเพิ่มความเข้มข้นของ BA มากขึ้นอีกจะทำให้เกิดยอดใหม่ลดลงและมีลักษณะไม่สมบูรณ์คือมีอาการฉ่ำน้ำ ใบมีสีน้ำตาล และรากเกิดอาการชะงักการเจริญเติบโต นอกจากนี้การทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยง rhizome ของต้น *Kaempferia parviflora* บนอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอด พบว่าได้ยอดจำนวนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้จนถึงระดับ 1.5 มก./ล. และหากเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นอีกจำนวนยอดที่เกิดจะลดลง (Khairudin et al., 2020)

การศึกษากรรมวิธีที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตโดยลดอุณหภูมิของพืชพุทธรักษาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าระดับความเข้มข้นของ MS ไม่มีผลต่อการเกิดยอดใหม่ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ MS กับน้ำตาลซูโครส ซึ่งอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 45 ก./ล. เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 เดือนจะทำให้เกิดการแตกยอดเฉลี่ย 7.8 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นที่ได้มีความสมบูรณ์น้อยคือ ยอดสีเหลืองและมีลักษณะยัด ส่วนต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส 60 ก./ล. พบว่าจำนวนยอดที่ได้จะน้อยกว่าอาหารที่เติมซูโครส 30 ก./ล. (Control) ต้นมีลักษณะไม่สมบูรณ์ ลำต้นเตี้ยและสีน้ำตาลเหลือง ส่วนอาหารที่ลดปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลือเพียง 15 ก./ล. พบว่ามีการแตกยอดได้น้อยกว่าอาหารสูตรมาตรฐาน ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชะลอการเจริญเติบโตเพื่อการอนุรักษ์ต้นพุทธรักษาในสภาพปลอดเชื้อ คือสูตรอาหารที่ลดน้ำตาลซูโครสเหลือเพียง 15 ก./ล. เพื่อให้เกิดการแตกยอดน้อยไม่มากเกินไป และยอดที่ได้ยัง คงมีลักษณะสมบูรณ์มีสีเขียว และมีความแข็งแรง โดยสามารถเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือปรับลดปริมาณลงเป็น $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS ก็ไม่มีผลต่อการเกิดยอด ทั้งนี้สามารถเลี้ยงต้นพุทธรักษาบนสูตรอาหารที่ลดน้ำตาลซูโครสเหลือเพียง 15 ก./ล. ได้นาน 8 เดือน โดยไม่ต้องย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่ (Table 2 และ Figure 2) เนื่องจากความเข้มข้นอาหาร MS ที่ลดลงเป็น $\frac{1}{2}$ MS หรือ $\frac{1}{4}$ MS เป็นการลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงจากอาหาร MS สูตรมาตรฐานจะทำให้พืชตั้งสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร MS full-strengt (Nirmal et al., 2000) การเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดแรงดันออสโมติก น้ำจะเคลื่อนออกจากเซลล์ เกิดการสูญเสียความตึงและปริมาตรของเซลล์ ทำให้อัตราการขยายขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญลดลง แต่เป็นเพียงการสูญเสียที่เกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเท่านั้น เซลล์จะกลับคืนสู่ปริมาตรเดิมและมีแรงตึงเท่าเดิมเนื่องจากพืชมีการปรับค่าออสโมติก (osmotic adjustment) แม้ว่าปริมาตรของเซลล์จะกลับสู่สภาพปกติ แต่การยืดยาวของเซลล์ลดลง จึงทำให้ต้นพืชเกิดการชะลอการเจริญเติบโต และเมื่อน้ำเคลื่อนที่ออกเกินจุดสมดุลของพืช ทำให้เกิดสภาพเครียดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) ที่มากเกินไปเนื่องจากแรงดันออสโมติกในอาหารสูงมากเกินไปทำให้พืชไม่สามารถดูดซึมธาตุอาหารเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานจะส่งผลให้ต้นพืชตาย (Matsumoto and Sakai, 2003; Udomprasert, 2015) และเนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้อาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่ำ จะทำให้ต้นพืชชะลอการเจริญเติบโตได้ และหากได้รับน้ำตาลซูโครสน้อยกว่าปริมาณที่ต้นพืชต้องการจะส่งผลให้ต้นพืชตายได้ (Nguyen et al., 1999; Zobayed et al., 1999) ดังเช่นการชะลอการเจริญเติบโตของต้นไอยริศ (*Zingiber sirindhorniae*) (Rukkid et al., 2015) และชิง (*Zingiber officinale*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปรับลดความเข้มข้น MS เป็น $\frac{1}{2}$ MS และเติมน้ำตาลซูโครสเพียง 15 ก./ล. สามารถชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 12 เดือน และมีอัตราการเกิดต้นใหม่ต่ำกว่าการใช้อาหาร MS สูตรมาตรฐาน (Peter et al., 2002) และการชะลอการเจริญเติบโตใน *Elettaria cardanum* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ชิง สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร $\frac{1}{2}$ MS โดยเพาะเลี้ยงได้นาน 18 เดือน (Tyagi et al., 2009) และการเพาะเลี้ยงตายอด *Vanilla* spp. ที่อาหาร $\frac{1}{2}$ MS เติมน้ำตาลซูโครส 1.5% ชะลอการเจริญเติบโตได้นาน 12 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ (Divakaran et al., 2006)

Table 1 Influence of BA and NAA combination on shoot multiplication and length after culturing shoot explants of *Z. brachystachys* cultured on MS medium for 3 months

Medium	Number of shoots	Shoot length (cm)
MS	0.8 ± 0.09 ^e	3.48 ± 1.18 ^{a-d}
MS + 0.5 mg/l NAA	6.1 ± 0.06 ^{cd}	3.39 ± 0.52 ^{a-d}
MS + 1.0 mg/l NAA	7.6 ± 0.06 ^{bcd}	4.56 ± 0.46 ^{ab}
MS + 1.0 mg/l BA	7.8 ± 0.11 ^{bcd}	5.03 ± 0.56 ^a
MS + 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	12.1 ± 0.12 ^{abc}	2.36 ± 0.40 ^{cd}
MS + 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	5.8 ± 0.07 ^{cd}	3.11 ± 0.15 ^{bcd}
MS + 3.0 mg/l BA	20.9 ± 0.09 ^a	3.38 ± 0.40 ^{a-d}
MS + 3.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	5.4 ± 0.06 ^d	3.48 ± 0.19 ^{a-d}
MS + 3.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	9.1 ± 0.06 ^{bcd}	4.11 ± 0.70 ^{abc}
MS + 5.0 mg/l BA	14.0 ± 0.07 ^{ab}	4.08 ± 0.30 ^{abc}
MS + 5.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	14.6 ± 0.16 ^{ab}	1.94 ± 0.63 ^d
MS + 5.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	13.6 ± 0.11 ^{ab}	2.36 ± 0.21 ^{cd}
mean	9.8	3.44
<i>F</i> -test	**	**
CV (%)	23.34	30.90

Means within the row followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

** = significant at 1% level

Transformation efficiency: Number of shoots are log (X+1) transformed value

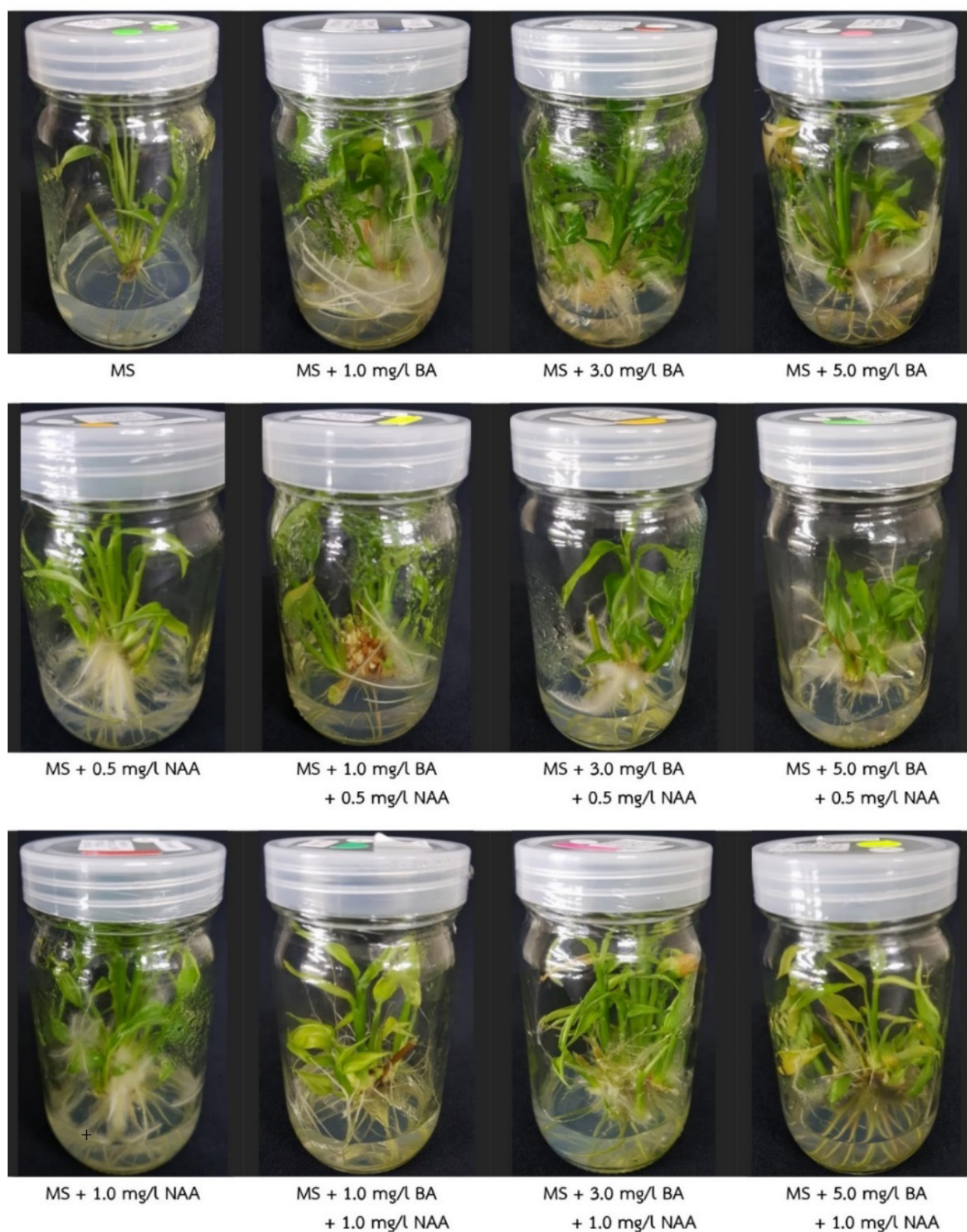


Figure 1 Effects of different concentrations and combinations of BA and NAA on shoot and root induction of *Z. brachystachys* after cultured for 3 months

Table 2 Effects of concentrations of MS medium and sucrose on shoot and length from shoot explants of *Z. brachystachys* for 8 months

MS	Number of shoots					Shoot length (cm)				
	Sucrose (g/l)				mean	Sucrose (g/l)				mean
	15	30	45	60		15	30	45	60	
MS	2.22 ± 0.03	5.34 ± 0.09	13.82 ± 0.08	2.15 ± 0.28	5.89	6.88 ± 0.68 ^{a x}	7.94 ± 0.79 ^{a x}	7.01 ± 0.60 ^{a x}	1.05 ± 0.72 ^{a y}	5.72
½MS	3.26 ± 0.16	4.48 ± 0.08	5.62 ± 0.08	3.86 ± 0.26	4.31	6.93 ± 1.31 ^{a x}	6.58 ± 1.12 ^{a x}	3.73 ± 0.16 ^{b y}	1.30 ± 0.59 ^{a z}	4.63
¼MS	3.12 ± 0.06	2.64 ± 0.19	3.95 ± 0.04	1.59 ± 0.24	2.82	6.21 ± 0.39 ^{a x}	2.36 ± 0.83 ^{b y}	3.53 ± 0.68 ^{b y}	1.91 ± 1.11 ^{a y}	3.50
mean	2.87 ^y	4.15 ^{xy}	7.80 ^x	2.45 ^y	4.34	6.67	5.62	4.76	1.42	4.62
<i>F-test</i> (MS)		ns						**		
<i>F-test</i> (SU)		*						**		
<i>F-test</i> (MS×SU)		ns						**		
CV (%)		32.78						31.00		

Means within columns and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

ns = not significant

* = significant at 5% level

** = significant at 1% level

- The a, b, c combinations compare the difference in concentration of MS medium (MS)

- The x, y, z combinations compare differences in concentrations of sucrose (SU)

Transformation efficiency: Number of shoots are log (X+1) transformed value

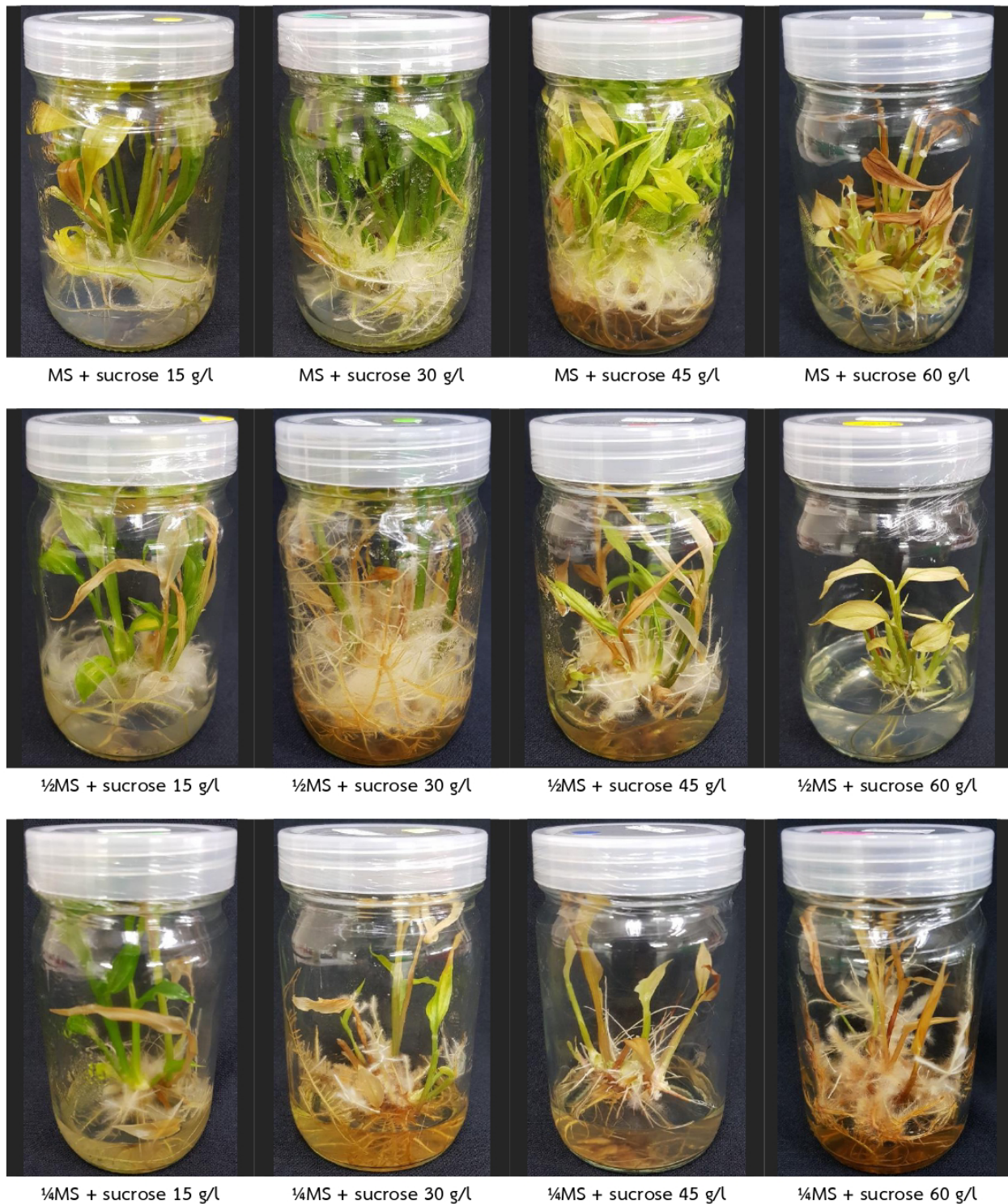


Figure 2 Shoot proliferation of *Z. brachystachys*' shoot explants cultured on difference concentrations of MS medium and sucrose for 8 months

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหน่ออ่อนของพระพุทธรบาทได้เทคนิคที่เหมาะสมคือ การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนของต้นจิงพระพุทธรบาทด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 20% นาน 15 นาทีและ 15% นาน 10 นาทีตามลำดับ สามารถทำให้เนื้อเยื่อปลอดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญเป็นต้นได้ 46.67% การขยายพันธุ์ของพระพุทธรบาทสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบน

อาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 3.0 มก./ล. ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 20.9 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และอาหารทุกสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงจะทำให้ต้นใหม่เกิดรากยาวสีขาวและมีขนของรากจำนวนมาก ส่วนการชะลอการเจริญเติบโตสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงต้นอ่อนซึ่งพระพุทธรูปอาหาร 1/2MS และ 1/4MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล. ได้นาน 8 เดือนโดยไม่ต้องย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่ ต้นซึ่งพระพุทธรูปที่ได้มีสีเขียวเข้ม ลักษณะแข็งแรงและมีความสูงของต้นไม่ผิดปกติ

ผลประโยชน์ทับซ้อน

บทความวิจัยนี้เป็นผลงานที่ได้จากการวิจัยโดยได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัย

การมีส่วนร่วมในการเขียนบทความของผู้เขียน

ความคิดริเริ่ม และ สมมุติฐาน: พัฒนบุรี รัชชิต, ปราโมทย์ ไตรบุญ. การปฏิบัติกรวิจัย การมีส่วนร่วมในการออกแบบ การทดลอง การทดสอบ เครื่องมือวัด วิธีการเก็บข้อมูล และ criteria: พัฒนบุรี รัชชิต, พชร ปิยะวินิต. การจัดเก็บข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล การแปลผล: พัฒนบุรี รัชชิต, พชร ปิยะวินิต. การวิพากษ์วิจารณ์ผล การแสดง การเปรียบเทียบกับข้อสรุปหรือองค์ความรู้ หรือทฤษฎีเดิม: พัฒนบุรี รัชชิต. การมีส่วนร่วมในการเขียนต้นฉบับบทความ: พัฒนบุรี รัชชิต. การให้การสนับสนุนเครื่องมือ ห้องปฏิบัติการ และครุภัณฑ์: พัฒนบุรี รัชชิต, พชร ปิยะวินิต.

เอกสารอ้างอิง

- Bonnier, F. J. M., & van Tuyl, J. M. (1997). Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 81–87.
- Christine, S., & Chan, L. K. (2007). Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith. *Biotechnology*, 6(4), 555-560.
- Divakaran, M., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2006). Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 175-180.
- George, E. F., Hall, M. A., & De-Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Ed. Springer.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2001). *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. 7th Ed. Prentice-Hall.
- Khamrit, R., & Preeman, J. (2019). *In vitro* surface sterilization and shoot induction from the rhizome of *Zingiber montanum*. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 47(1), 1393-1398. (in Thai).
- Jewruttanasakul, V., & Charoenwattana, P. (2014). *In vitro* conservation of bat flower (*Tacca chantrieri* Andre) through minimal growth. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(3), 562-566. (in Thai).
- Kochuthressia, K. P., Britto, S. J., Raj, L. J. M., Jaseentha, M. O., & Senthilkumar, S. R. (2010). Efficient regeneration of *Alpinia purpurata* (Vieill.) K.Schum. plantlets from rhizome bud explants. *International Research Journal of Plant Science*, 1(2), 43-47.
- Martin, K. P., & Pradeep, A. K. (2003). Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipsea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(1), 197–200.
- Matsumoto, T., & Sakai, A. (2003). Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*, 131(1), 299-304.
- Miri, S. M. (2020). Micropropagation, callus induction and regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Open Agriculture*, 5(1), 75-84.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nguyen, Q. T., Kozai, T., & Nguyen, U. V. (1999). Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 51-57.
- Nirmal, B. K., Ravindran, P. N., & Peter, K. V. (2000). Biotechnology of spices. In Chadha, K. L., Ravindran, P. N., & Sahigram, L. (Ed.), *Biotechnology of Horticulture and Plantation Crops*, pp. 487-527. Malhotra Publishing House.
- Khairudin, N. A., Haida, Z., & Hakiman, M. (2020). *In vitro* shoot and root induction of *Kaempferia parviflora* (Zingiberaceae) rhizome using 6-benzylaminopurine. *Journal of Tropical Plant Physiology*, 12(2), 23-32.
- Peter, K. V., Ravindran, P. N., Babu, K. N., Sasikumar, B., Minoo, D., Geetha, S. P., & Rajalakshmi, K. (2002). *Establishing In Vitro Conservatory of Spices Germplasm*. ICAR Project Report, Indian Institute of Spices Research.

- Prathanaturug, S., Angsumalee, D., Pongsiri, N., Suwacharangoon, S., & Jenjittikul, T. (2004). *In vitro* propagation of *Zingiber petiolatum* (Holtum) I. Theilade, a rare Zingiberaceous plant from Thailand. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40(3), 317-320.
- Rukkid, P., Piriavinit, P., Sangkasa-ad, P., Kanjanawattanawong, P., & Triboun, P. (2015). *In vitro* conservation technique of *Zingiber sirindhorniae* Triboun & Keerat.: an endemic and rare species of Thailand. In **The 7th International Symposium on the Family Zingiberaceae “Gingers for Life”**, pp. 93. The Botanical Garden Organization.
- Tan, P. V. (2016). Micropropagation of *Curcuma* sp., a threatened medicinal plant. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(10), 418-427.
- Triboun, P., Larsen, K., & Chantaranothai, P. (2014). A key to the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand with descriptions of 10 new taxa. *Thai Journal of Botany*, 6(1), 53-77.
- Tyagi, R. K., Goswami, R., Sanayaima, R., Singh, R., Tandon, R., & Agrawal, A. (2009). Micropropagation and slow growth conservation of cardamom (*Elettaria cardamom* Maton). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 45(1), 721-729.
- Udomprasert, N. (2015). **Plant Stress Physiology**, Chulalongkorn University Press. (in Thai).
- Yusuf, N. A., Annuar, M. S. M., & Khalid, N. (2011). Rapid micropropagation of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. (a valuable medicinal plant) from shoot bud explants. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1194-1199.
- Yusuf, N. A., Khalid, N., & Ibrahim, H. (2007). Establishment of tissue culture for selected medicinal *Curcuma* spp. *Malaysian Journal of Science*, 26(1), 85-91.
- Zobayed, S. M. A., Afreen-Zobayed, F., Kubota, C., & Kozai, T. (1999). Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 35(1), 183-188.