

Received: February 6, 2022; Revised: March 6, 2022; Accepted: March 15, 2022

ผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในต้นว่านตาลเดี่ยว

Effect of BA and NAA on callus induction of star grass (*Hypoxis aurea* Lour.)ศิริพร ภูเรียนคู¹ อาอีเสาะห์ สะอุ¹ ประภาส กาวิชา¹ มนทิณี กมลธรรม² และธัญญ์วนิช ธัญสิริวรรณ^{1*}Siriporn Phuriankoo¹, A-esoh Sa-u¹, Praphat Kawicha¹, Montinee Kamoltham² and
Thanwanit Thanyasiriwat^{1*}¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ สกลนคร² ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กรุงเทพมหานคร

*Corresponding Author E-mail Address : fnatnt@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ว่านตาลเดี่ยวเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาสิว ฝ้า และจุดต่างดํา จึงได้รับความสนใจในการนำมาสกัดสารสำคัญเพื่อผสมในเครื่องสำอาง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของ 6-benzyladenine (BA) และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นว่านตาลเดี่ยวสำหรับเป็นวัตถุดิบในการสกัดสารสำคัญ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ดินบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วนต้นว่านตาลเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด คิดเป็น 93.20% ส่วนสูตรอาหารที่เติมเฉพาะ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ช่วยให้แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (2.38 เซนติเมตร) น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากที่สุดเท่ากับ 9.23 กรัม และ 0.8 กรัม ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตแคลลัสระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นต้นแบบการสกัดสารสำคัญจากต้นว่านตาลเดี่ยวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางในอนาคตได้

คำสำคัญ: การชักนำแคลลัส ต้นว่านตาลเดี่ยว สารควบคุมการเจริญเติบโต

Abstract

Star grass (*Hypoxis aurea* Lour.) is a medicinal plant used for treating acne, sores, and dark spots. Its bioactive compounds were extracted for using as an ingredient in cosmetic products. This study aims to compare the effect of different BA and NAA concentrations on callus induction of the star grass. The corm explants were cultured on MS medium supplemented with 3.0 and 5.0 mg/l BA and different NAA concentration of 0, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/l, respectively. The results showed that the treatment of 3.0 and 5.0 mg/l BA without NAA or 0.1 mg/l NAA induced the most callus formation (93.20%). Moreover, the concentration of BA of 3.0 mg/l alone can significantly affect the callus size (2.39 cm.), callus fresh weight and dry weight of 9.23 g and 0.8 g, respectively. These findings reveal the possibility of callus production in a laboratory scale. It can be used as a method for extracting the bioactive compounds from callus of the star grass that utilized in the cosmetic industries.

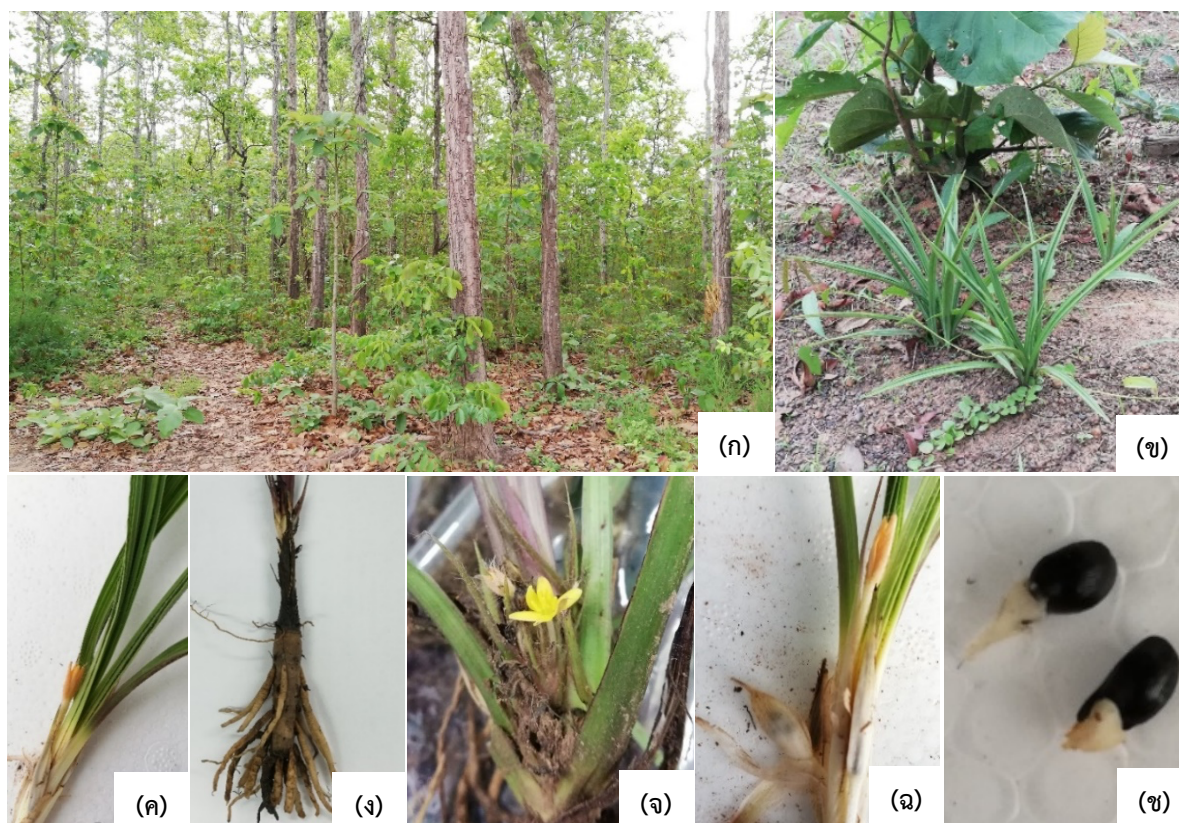
Keywords: Callus induction, *Hypoxis aurea* Lour., Plant growth regulator

บทนำ

ว่านตาลเดี่ยว (*Hypoxis aurea* Lour.) หรือต้นสารดิน (ชื่อเรียกท้องถิ่นอำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดสกลนคร) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Hypoxidaceae พบการกระจายพันธุ์ในประเทศจีน ไต้หวัน ภูฐาน กัมพูชา อินเดีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น เกาหลี ลาว พม่า เนปาล ปากีสถาน ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และพบในทุกภาคของประเทศไทยบริเวณป่าเต็งรัง และป่าเต็งรังผสมไม้ที่ความสูงได้ถึง 2,600 เมตรจากระดับน้ำทะเล แต่จะพบมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นใต้ดินเป็นรูปทรงกลมถึงทรงกระบอกสูงได้ถึง 15 เซนติเมตร ใบเดี่ยวปลายเรียวแหลม รูปแถบ กว้าง 1.5-3 เซนติเมตร ยาว 10-35 เซนติเมตร เรียงสลับกันแน่น ออกติดพื้น มีขนสีขาวปกคลุมทั้ง 2 ด้านของแผ่นใบ ออกดอกเป็นช่อกระจุกสั้น ๆ ที่โคนต้น ออกก่อนใบหรือพร้อมใบ ดอกมีสีเหลืองสด มีกลีบรวม 6 กลีบ เชื่อมติดกันเป็นหลอดแคบยาว ปลายแยกเป็น 6 กลีบ เรียงเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกมีขน เกสรเพศผู้ 6 อัน สีเหลือง รังไข่ใต้วงกลีบมีสีขาว ผลสดรูปรีถึงทรงกลม ระยะเวลาออกดอกและติดผลอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม-สิงหาคม (Geerick, 1993) (รูปที่1) ว่านตาลเดี่ยวมีสรรพคุณต่าง ๆ เช่น รากใช้ต้มน้ำดื่ม บำรุงโลหิต และฝนน้ำทารักษาผิว ผื่น จุดต่างดำ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากต้นว่านตาลเดี่ยวประกอบด้วยกลูโคไซด์และแทนนิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Anti-melanogenesis) และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (Collagen biosynthesis) ในเซลล์ Murine melanoma (B16F10) และเซลล์ผิวหนังมนุษย์ Fibroblasts ได้ดีเทียบเท่ากับวิตามินซี ที่ความเข้มข้นสาร 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยไม่เป็นพิษต่อผิว เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดจากว่านตาลเดี่ยวมีประสิทธิภาพดีกว่ากรดโกลจิที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ผิวขาว (Boonpisuttinant et al., 2014) จึงทำให้ต้นว่านตาลเดี่ยวเป็นพืชที่ได้รับความสนใจในการนำมาสกัดสารสำคัญในระดับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง แต่การสกัดสารสำคัญจากพืชธรรมชาตินี้มีข้อจำกัด เนื่องจากปริมาณพืชในธรรมชาติมีน้อย ต้นพืชออกตามฤดูกาล และใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกนาน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณพืชในปริมาณที่มาก และสามารถทำได้ทุกช่วงเวลาโดยไม่เกี่ยวกับฤดูกาล อีกทั้งสามารถผลิตสารสำคัญในระยะเวลาที่สั้น ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้แคลลัสเป็นแหล่งเนื้อเยื่อในการผลิตสารสำคัญ (Rao and Ravishankar, 2002) เช่น การชักนำให้มะเฟืองเกิดแคลลัสและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สนธยา และคณะ, 2560) และการศึกษาผลของออกซินต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

และการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระของพืช *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC ex Meissn (Grabkowska et al., 2016) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ สามารถพัฒนาให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เมื่อให้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เหมาะสม (ภูวดล, 2559) โดยขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต การชักนำให้เกิดแคลลัสต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างเพื่อให้ประสบความสำเร็จ เช่น ขนาดชิ้นส่วนของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต สูตรอาหารและชนิดของอาหาร เป็นต้น (กสานต์ และปิยะพร, 2561) สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งออกซินและไซโตไคนินเป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัส (Phillips and Garda, 2019) โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ IAA IBA และ 2,4-D โดยสารกลุ่มออกซินมีสมบัติส่งเสริมการขยายขนาดของเซลล์ การเกิดราก และยับยั้งการเกิดตาข้าง สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ (สมฤทธิ์, 2552) ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดไซโตไคนินที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ ไคเนติน BAP และ BA สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และกระตุ้นการเจริญทางด้านลำต้นและตาข้างของพืช (บุญยืน, 2547) อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินมีผลต่อการส่งเสริมให้เกิดลักษณะต่าง ๆ และกำหนดรูปร่างของพืช โดยที่ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินมีความแตกต่างกันไปตามสกุลและชนิดของพืช เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ (Skoog and Miller, 1957) Nsibande (2012) ได้พัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Hypoxis acuminata* *H. argentea* *H. filiformis* และ *H. hemerocallidea* โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนจากลำต้นใต้ดิน พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถพัฒนาให้เกิดเป็นแคลลัสและยอดได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้ เยาวพา และคณะ (2564) ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ รากจืดในสภาพปลอดเชื้อและวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ในสภาพธรรมชาติ พบว่าชิ้นส่วนใบของรากจืดพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแคลลัสมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าชิ้นส่วนจากใบของรากจืดที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ จากรายงานวิจัยของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านตาลเดี่ยว (*Hypoxis aurea* Lour.) เพื่อการขยายพันธุ์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ 3-4 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แต่เมื่อเติม BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี นอกจากนี้ เมื่อนำยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้ต้นว่านตาลเดี่ยวเกิดรากได้ (ข้อมูลไม่เผยแพร่) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA และ NAA จะส่งผลให้เนื้อเยื่อของว่านตาลเดี่ยวเกิดเป็นแคลลัสได้ดีขึ้น ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของต้นว่านตาลเดี่ยวในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการสกัดสารสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป



รูปที่ 1 พื้นที่ที่พบและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของว่านตาลเดี่ยว (ก) ป่าเต็งรัง อำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดสกลนคร (ข) รูปร่างทรงต้นและใบ (ค) ใบและการเรียงตัวของใบ (ง) ลำต้นใต้ดิน (จ) ดอก (ฉ) ผล และ (ช) เมล็ด

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำชิ้นส่วนของลำต้นใต้ดินมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วลอกผิวหนังด้านนอกออก (รูปที่ 2) นำมาพอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% (v/v) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นพอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 15% และ 10% (v/v) ที่เติมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยด เป็นเวลา 15 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชให้มีขนาด 0.5x1.5 เซนติเมตร และเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,600 ลักซ์ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์



รูปที่ 2 การเตรียมชิ้นส่วนลำต้นใต้ดินของต้นว่านตาลเดี่ยวเพื่อพอกฆ่าเชื้อ (ก) ลำต้นใต้ดินที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปา และ (ข) ลำต้นใต้ดินที่ผ่านการลอกผิวหนังด้านนอกและตัดรากออก

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

ย้ายชิ้นส่วนสะอาดขนาด 0.5x1.5 เซนติเมตร ของว่านตาลเดี่ยวที่ปลอดเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างกัน 8 ระดับ (ตารางที่ 1) เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัส จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 °C ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,600 ลักซ์ เปลี่ยนอาหาร (สูตรเดิม) ทุก ๆ 2 สัปดาห์เพื่อป้องกันไม่ให้ชิ้นส่วนพืชเป็นสีดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกข้อมูล ดังนี้ (1) ร้อยละการเกิดแคลลัส ด้วยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสต่อชิ้นส่วนพืชทั้งหมด (2) ขนาดของแคลลัสโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส (3) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสด้วยเครื่องชั่งดิจิทัลทศนิยม 3 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (4) จำนวนยอด โดยนับจำนวนยอดที่เจริญจากแคลลัส

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ประกอบด้วย 8 ทรีตเมนต์ จำนวน 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้น นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีการ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม Statistix 8

ตารางที่ 1 อาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

ทรีตเมนต์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร) ของสารควบคุมการเจริญเติบโต	
	BA	NAA
T ₁	3.0	0.0
T ₂	3.0	0.1
T ₃	3.0	0.3
T ₄	3.0	0.5
T ₅	5.0	0.0
T ₆	5.0	0.1
T ₇	5.0	0.3
T ₈	5.0	0.5

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นว่านตาลเดี่ยวบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนของต้นว่านตาลเดี่ยวมีร้อยละการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีร้อยละการเกิดแคลลัสสูงที่สุด (93.20%) และมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) Miri (2020) ได้กล่าวว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัสคือ 2,4-D และ BA เพียงอย่างเดียวหรือผสมกันจากการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสในขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบขิงในอาหาร MS ที่เติม BA อย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุด (100%) และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA นอกจากนี้ ชาตรี และคณะ (2562) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของหยาดน้ำค้างในสภาพปลอดเชื้อที่เติม BA ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าเมื่อเติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด ส่วน Nsibande (2012) ได้เพาะเลี้ยงเลี้ยงชิ้นส่วนจากลำต้นใต้ดินของพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Hypoxis acuminata* H. *argentea* H. *filiformis* และ *H. hemerocallidea* พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและยอดได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างไรก็ตาม จากรายงานวิจัยของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านตาลเดี่ยว (*Hypoxis aurea* Lour.) เพื่อการขยายพันธุ์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดจาก 1 ยอดเป็น 3-4 ยอด แต่เมื่อเติม BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าชักนำให้เกิดแคลลัสและมียอดใหม่ เมื่อนำยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้ต้นว่านตาลเดี่ยวเกิดรากได้ นอกจากนี้เมื่อทดลองเติม 2,4-D หรือผสมร่วมกับ BA ในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าชิ้นส่วนพืชเกิดสีดำและตายในที่สุด (ข้อมูลไม่เผยแพร่) จะเห็นได้ว่างานวิจัยดังกล่าวมีความแตกต่างจากผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA เป็น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียวหรือ

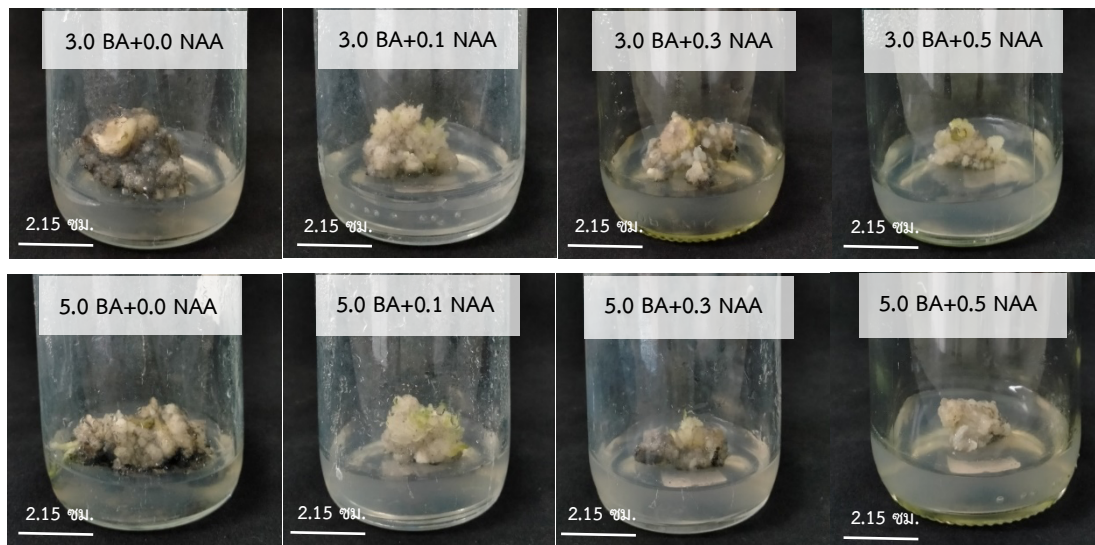
ผสมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดแคลลัสมากที่สุด อย่างไรก็ตาม การชักนำให้เกิดแคลลัสได้มีประสิทธิภาพ นอกจากความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย (Miri, 2020)

ความเข้มข้นของ BA และ NAA ส่งผลให้แคลลัสมีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่น 95% โดยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม BA เพียงอย่างเดียว หรือเติมร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่ที่สุด (1.72-2.38 เซนติเมตร) โดยเมื่อเติม NAA ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น พบว่าแคลลัสมีแนวโน้มขนาดเล็กลง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3) เมื่อสังเกตสีของแคลลัส พบว่าแคลลัสที่พัฒนามีสีครีม สีเหลือง และสีครีมปนเหลือง โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นแบบเกาะกันแน่น (Compact callus) และแคลลัสแบบเกาะกันหลวม (Friable callus) รูปทรงของแคลลัสที่เกิดเป็นแบบทรงกลมและรี (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจะสามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตลอดจนการขยายขนาดและความยาวของเซลล์ได้ (ลิลลี่, 2546) และสอดคล้องกับการทดลองของกาพย์แก้ว และคณะ (2562) ได้ชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นลินเดอร์เนียในสภาพปลอดเชื้อโดยเติม BA เข้มข้น 0-2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าเมื่อเติม BA เพียงชนิดเดียว ส่งผลให้แคลลัสที่เกิดมีขนาดใหญ่ที่สุด อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันไปตามสกุลและชนิดของพืช เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ (Skoog and Miller, 1957) Page and Staden (1986) ชักนำพืชในสกุล *Hypoxis* ชนิด *Hypoxis rooperi* S. Moore ให้เกิดแคลลัสจากส่วนของตาดอกได้สำเร็จโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ 5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Appleton et al. (2012) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชชนิด *Hypoxis colchicifolia* โดยใช้ชิ้นส่วนพืชจากหลายอวัยวะ ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ ก้านช่อดอก ตาดอก ลำต้นใต้ดิน และเมล็ด พบว่าเมื่อเติม BA:NAA เข้มข้น 1:0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสหรือยอด 6% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA อย่างเดียวเป็น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้แคลลัสเพิ่มขึ้นเป็น 97% เมื่อเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ดิน ส่วนพืชสมุนไพรชนิด *Celosia argentea* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสสีเขียวและสีแดงแบบเกาะกันแน่น 98% (Bakar et al., 2014) เกวลิน และคณะ (2564) รายงานว่าลักษณะแคลลัสที่เป็นแบบ Compact callus จะเกิดยอดได้ดีกว่าและเหมาะสมต่อการชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ ส่วนแคลลัสที่เป็น Friable callus จะเหมาะต่อการเป็นเซลล์เริ่มต้นทำเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นว่านตาลเดี่ยว

ทรีตเมนต์	ร้อยละการเกิด แคลลัส	ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)	ลักษณะแคลลัส	สีของแคลลัส	จำนวนยอด
T1	93.20±13.6	2.38±0.29 ^a	Compact	เหลือง	0.90±0.42
T2	93.20±13.6	1.82±0.21 ^{ab}	Friable	เหลืองปนครีม	0.67±0.37
T3	72.80±13.6	1.72±0.27 ^{ab}	Mixed	ครีม	1.33±0.92
T4	59.60±25.8	1.35±0.23 ^b	Compact	ครีม	0.76±0.49
T5	93.20±13.6	1.92±0.44 ^{ab}	Compact	ครีม	0.30±0.16
T6	93.20±13.6	1.61±0.12 ^b	Friable	เหลือง	0.33±0.30
T7	79.80±26.85	1.58±0.07 ^b	Compact	เหลือง	0.86±0.34
T8	93.20±13.6	1.53±0.25 ^b	Compact	เหลืองปนครีม	0.53±0.27

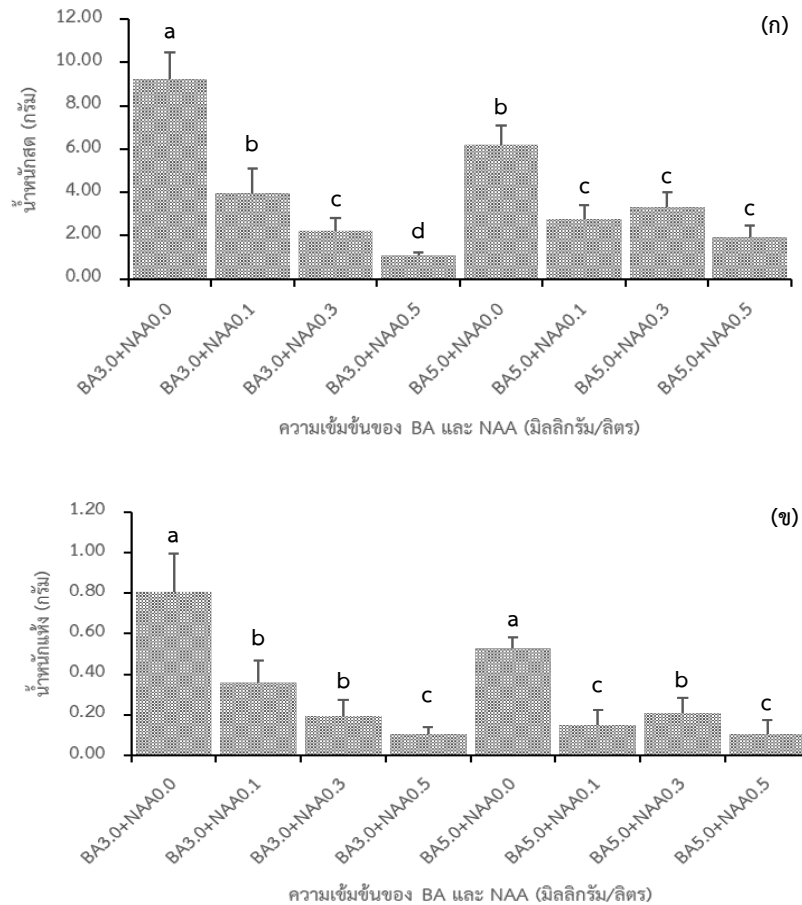
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



รูปที่ 3 ขนาด สี และลักษณะการเจริญของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA ต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส

ความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่แตกต่างกันส่งผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยแคลลัสที่พัฒนามาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด (9.23 กรัม) รองลงมาคือแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว มีน้ำหนักสด 3.94 กรัม และ 6.20 กรัม ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีน้ำหนักสดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่แนวโน้มน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียวมีค่าสูงที่สุดและน้ำหนักเริ่มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA (รูปที่ 4ก) นอกจากนี้แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 1.26 และ 0.88 กรัม ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งน้ำหนักแห้งของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA (รูปที่ 4ข) จากข้อมูลทางวิชาการแสดงให้เห็นว่า น้ำหนักของแคลลัสเป็นดัชนีวัดการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ได้แก่ NAA 2,4-D หรือ BA จะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณ ส่งผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น (Rout et al., 2000; Guo and Jeong, 2021) ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ในเรื่องของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตาม ยังคงส่งผลให้แคลลัสของว่านตาลเดี่ยวมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งแตกต่างกัน เช่น งานวิจัยของ Bakar et al. (2014) ได้ชักนำให้พืชสมุนไพรชนิด *Celosia argentea* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสสูงที่สุด (2.03 และ 0.16 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) ส่วน Al-Zuhairi and Ghanm (2018) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ BA (0.25 มิลลิกรัม/ลิตร) และ NAA (1.0 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่งผลให้แคลลัสของแพลงพวย (*Catharanthus roseus* L. cv. Heatwave Mix) มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด และงานวิจัยของ Guo and Jeong (2021) พบว่าแคลลัสของพืชชนิด *Abies koreana* ที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ Thidiazuron (TDZ) 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีน้ำหนักสดมากที่สุด (8.2 กรัม)



รูปที่ 4 น้ำหนักสด (ก) และน้ำหนักแห้ง (ข) ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นว่านตาลเดี่ยวบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดได้ในทุกสูตรอาหาร ซึ่งจำนวนยอดที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยจำนวนยอดของต้นว่านตาลเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร มีการเกิดยอดที่มากที่สุดเฉลี่ย 1.33 ยอด/แคลลัส และในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว มีการจำนวนยอดที่เกิดขึ้นน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.30 ยอด/แคลลัส (ตารางที่ 2) จากงานวิจัยของ ปิยะพร และนุชมะณี (2547) ได้ศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการชักนำแคลลัสและยอดของผักชีช้าง พบว่าสามารถกระตุ้นให้แคลลัสเกิดยอด 100% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิด *Tectona grandis* (L.) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0-3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เนื้อเยื่อใบและข้อเกิดเป็นแคลลัสผสมกับยอด (Srinivasan et al., 2012) Nsibande (2012) ได้พัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Hypoxis acuminata* *H. argentea* *H. filiformis* และ *H. hemerocallidea* โดยใช้ชิ้นส่วนจากลำต้นใต้ดิน และสามารถพัฒนาให้เกิดเป็นแคลลัสและยอดได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม BAP เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

บทสรุป

ความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่ต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัสของต้นว่านตาลเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยที่ไม่เติม NAA มีประสิทธิภาพที่สุดต่อการชักนำแคลลัสของต้นว่านตาลเดี่ยว โดยมีร้อยละการเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งดีที่สุด อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นในการผลิตแคลลัสเพื่อใช้สกัดสารสำคัญของต้นว่านตาลเดี่ยวในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากเพียงพอ ควรเพิ่มการทดลองต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสให้ได้มากขึ้น เช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรือปรับสูตรอาหารโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น เช่น 2,4-D ร่วมด้วยที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

เอกสารอ้างอิง

- กษานต์ ชาญชน และปิยะพร แสนสุข. (2561). ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงคัพภะในส้มหอม. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 46(1): 131-141.
- กาญจน์แก้ว แก้วนาบอน, ทศไนย จารุวัฒนพันธ์ และธัญญะ เตชะศิลป์พิทักษ์. (2562). การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นลินเดอร์เนียในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 8(2): 139-145.
- เกวลิน คุณาศักดากุล, เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี, พนมพร วรรณประเสริฐ, เพชรรัตน์ จันทรทิน, ยี่โก ทัพพะทัต, รมณีย์ เจริญทรัพย์ และสุวิษ วรรณไกรโรจน์. (2564). บทฐานงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ศูนย์การพิมพ์แก่นจันทร์: กรุงเทพฯ.
- ชาติรี ตุ่มคำ และศิริศยากร จันทร์ขศิริพร. (2562). การชักนำให้เกิดแคลลัสและการตรวจสอบหาระดับพลอยดีจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหยาดน้ำค้าง (*Drosera indica* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 24(3): 929-944.
- ปิยะพร แสนสุข และนุชมะณี สุตดี. (2547). อิทธิพลของ NAA และ BA ต่อการชักนำแคลลัสและยอดของผักชีฝรั่ง. วารสารวิจัย มข. 9(2): 31-39.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. (2547). เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น.
- ภูวดล บุตรรัตน์. (2559). พฤกษศาสตร์ทั่วไป ตอนลักษณะภายนอกของพืชดอก ภาควิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี.
- เยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ขวัญข้าว เมืองเขียว และปิยะมาศ ไพโรจน์. (2564). การชักนำให้เกิดแคลลัสและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสรางจืด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 29(1): 102-110.
- ลิลลี่ กาวีตะ. (2546). การเปลี่ยนแปลงสัณฐานและพัฒนาการพืช. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- สัมฤทธิ์ เศรษฐวงศ์. (2552). ฮอโมนและการใช้ฮอโมนกับไม้ผล. ธนัชการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

- สนธยา เรืองศักดิ์, เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, อิศราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล และวิจิตรา หลวงอินทร. (2560). การชักนำให้มะเฟืองเกิดแคลลัสและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. *แก่นเกษตร*. 45(1): 1186-1190.
- Al-Zuhairi E.M.A. and Ghanm N.S. (2018). Effect of BA, NAA, methyl jasmonate and mannitol on callus induction of Periwinkle Plant (*Catharanthus roseus* L. cv. Heatwave Mix) by *in vitro* culture. *Journal of Tikrit University for Agriculture Sciences*. 18(4): 66-71.
- Appleton M.R., Ascough G.D. and Staden J.V. (2012). *In vitro* regeneration of *Hypoxis colchicifolia* plantlets. *South African Journal of Botany*. 80: 25–35.
- Bakar D.A., Ahmed B.A. and Taha R.M. (2014). *In vitro* callus induction and plant regeneration of *Celosia argentea*-An important medicinal plant. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(6): 860-866.
- Boonpisuttinant K., Sodamook U., Ruksiriwanich W. and Winitchai S. (2014). *In vitro* anti-melanogenesis and collagen biosynthesis stimulating activities of star grass (*Hypoxis aurea* Lour) extracts. *Asian Journal of Applied Sciences*. 2(4): 405-413.
- Geerick D.J.L. (1993). Amarillidaceae (including Hypoxidaceae). *Flora Malesiana Series I*. 11(12): 353-73.
- Grabkowska R., Matkowski A., Karolak I.G. and Wysokinska H. (2016). Callus cultures of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.; production of secondary metabolites and antioxidant activity. *South African Journal of Botany*. 103: 41-48.
- Guo G. and Jeong B.R. (2021). Explant, Medium, and Plant Growth Regulator (PGR) Affect Induction and Proliferation of Callus in *Abies koreana*. *Forests*. 12: 1388-1402.
- Miri S.M. (2020). Micropropagation, callus induction and regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Open Agriculture*. 5: 75-84.
- Nsibande B.E. (2012). *In vitro* regeneration of four *Hypoxis* Species and transformation of *Camelina sativa* and *Crambe abyssinica*. M.Sc. Thesis. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Page Y.M. and Staden J.V. (1986). *In vitro* propagation of *Hypoxis rooperi* from flower buds. *South African Journal of Botany*. 52: 261-264.
- Phillips G.C. and Garda M. (2019). Plant tissue culture media and practices: An overview, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 55: 242-257.
- Rao R.S. and Ravishankar G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20: 101-153.
- Rout G.R., Samantaray S. and Das P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*. 18: 91-120.
- Skoog F. and Miller C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue grown *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 11: 118-130.
- Srinivasan R., Selvam G.G., Karthikeyan K., Chandran C., Kulothungan S. and Govindasamy C. (2012). *In vitro* propagation of shoot and callus culture of *Tectona grandis* (L.). *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 7(1): 26-29.