บทความวิจัย

การขยายพันธุ์ต้นข่าไฟ (*Hedychium coccineum* Buch.-Ham. ex Sm.) และต้นตาเหินไหว (*Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm.) ในหลอดทดลอง

โรจนกร เชิงปัญญา[1] ศุภสุตา การูจี[2] เมทิดา เล็กบำรุง[1] อัจฉรา เมืองครุธ[1] และ งามนิจ ชื่นบุญงาม[1*]

ได้รับบทความ: 6 เมษายน 2563
ได้รับบทความแก้ไข: 26 สิงหาคม 2563
ยอมรับตีพิมพ์: 27 สิงหาคม 2563

บทคัดย่อ

ต้นข่าไฟ (*Hedychium coccineum* Buch.-Ham. ex Sm.) และต้นตาเหินไหว (*Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm.) เป็นพืชวงศ์ขิงที่มีลักษณะดอกสวยงามและมีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นพืชประดับชนิดใหม่ หากแต่การนำมาใช้เป็นพืชเศรษฐกิจได้นั้นจำเป็นต้องมีปริมาณต้นที่เพียงพอ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเสนอวิธีการขยายพันธุ์พืชทั้งสองชนิดนี้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเริ่มจากนำเมล็ดไปเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) จากนั้นเลือกยอดใหม่ปลอดเชื้อที่มีความสูง 5-6 เซนติเมตร มาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นสูง 1.5 เซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีเบนซิลอะดีนิน (N^6-benzyladenine: BA) เข้มข้น 0 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงส่วนโคนลำต้นบนอาหารสูตรดังกล่าวจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าต้นข่าไฟซึ่งเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีการตอบสนองดีที่สุด โดยพบ 5.00 ± 0.30 ยอด/ชิ้นส่วนเริ่มต้น และ 10.00 ± 0.39 ราก/ชิ้นส่วนเริ่มต้น ซึ่งยอดและรากใหม่มีความยาว 3.34 ± 0.11 และ 5.96 ± 0.54 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่ต้นตาเหินไหวมีการตอบสนองที่ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งในอาหารสูตรนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 3.30 ± 0.42 ยอด/ชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยยอดใหม่สูง 4.76 ± 0.50 เซนติเมตร มีรากเกิดขึ้นจำนวน 5.50 ± 0.37 ราก/ชิ้นส่วนเริ่มต้น และรากใหม่ยาว 5.84 ± 0.54 เซนติเมตร การศึกษานี้พบการเจริญให้ยอดและรากใหม่ไปพร้อมกันในอาหารสูตรเดียวกัน ดังนั้นจึงเป็นการช่วยลดเวลาสำหรับกระบวนการชักนำให้เกิดรากและการผลิตต้นพืชในหลอดทดลอง ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวในระดับอุตสาหกรรมได้ ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมพืชทั้งสองชนิดนี้ให้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: สกุลมหาหงส์ พืชประดับ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เบนซิลอะดีนิน

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

In vitro Propagation of *Hedychium coccineum* Buch.-Ham. ex Sm. and *Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm.

Rodjanacorn Chuengpanya[1], Supasuta Karoojee[2], Maytida Lekbamroong[1], Atchara Muangkroot[1] and Ngarmnij Chuenboonngarm[1*]

Received: April 6, 2020
Revised: August 26, 2020
Accepted: August 27, 2020

ABSTRACT

Hedychium coccineum Buch.-Ham. ex Sm. and *Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm. (Zingiberaceae) produce beautiful inflorescences and have a high potential for use as the new ornamental plants. To apply them for economic crop, it is necessary to have sufficient number of plants. Therefore, this study provided a method for propagating both plants by plant tissue culture. Seeds were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium. Then, axenic regenerated shoots with a height of 5-6 cm were selected and excised. The remains of leafy-shoot bases at 1.5 cm in length were cultured on MS medium augmented with 0, 1, 2, 4, and 8 mg/L N^6-benzyladenine (BA). After culturing leafy-shoot bases for 8 weeks, *H. coccineum* showed the best response to MS medium supplemented with 1 mg/L BA. In this medium, 5.00 ± 0.30 shoots/explant and 10.00 ± 0.39 roots/explant with 4.76 ± 0.50 cm of shoots height and 5.50 ± 0.37 cm of roots length were found. Meanwhile, *H. ellipticum* showed the best response from MS medium supplemented with 2 mg/L BA. This medium could induce 3.30 ± 0.42 shoots/explant with a height of 4.76 ± 0.50 cm and 5.50 ± 0.37 roots/explants with a length of 5.84 ± 0.54 cm. This study noticed that new shoots and roots could be developed simultaneously in the same medium. Therefore, it can reduce time for root induction process and *in vitro* plantlets production. The outcomes from this study will be applied to propagate *H. coccineum* and *H. ellipticum* in the industrial scale, which will encourage both plants to be the new economic ornamental plants of Thailand in the future.

Keywords: *Hedychium,* ornamental plant, tissue culture, N^6-benzyladenine

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

บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายของพันธุ์พืชสูงประเทศหนึ่งของโลก โดยพบพันธุ์พืชมากถึง 15,000 ชนิด [1] ซึ่งในบรรดาพืชเหล่านี้พบว่าพืชหลายชนิดมีลักษณะของดอกและใบที่สวยงามที่สามารถนำมาใช้เป็นพืชประดับเชิงพาณิชย์โดยใช้ในรูปของไม้ตัดดอก ไม้ตัดใบหรือไม้กระถาง จากการที่ประเทศไทยมีพันธุ์พืชที่สามารถใช้เป็นพืชประดับได้เป็นจำนวนมาก จึงส่งผลให้ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกพืชประดับที่สำคัญประเทศหนึ่ง โดยกล้วยไม้สกุลหวาย บอนสี หน้าวัว โกสน และกุหลาบ คือพืชที่มีประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกรายใหญ่สู่อุตสาหกรรมพืชประดับของโลก [2] อย่างไรก็ตาม ตลาดไม้ดอกไม้ประดับทั้งในและต่างประเทศมีความต้องการพืชสายพันธุ์ใหม่อยู่เสมอเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคและเพิ่มศักยภาพให้สามารถแข่งขันในอุตสาหกรรมพืชประดับได้ ดังนั้นการหาพืชลูกผสม หรือสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีลักษณะสวยงามมาใช้และพัฒนาต่อยอดให้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งการนำพืชพื้นเมืองที่มีพันธุกรรมดั้งเดิมแต่มีลักษณะสวยงามสามารถนำมาใช้พัฒนาพันธุกรรมพืชเพื่อให้เกิดเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่มีความเด่นทางพันธุกรรมร่วมด้วย เช่น ทนทานต่อโรค เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มจุดแข็งให้แก่อุตสาหกรรมพืชประดับของประเทศไทย [2] ในปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งเสริมให้นำพืชวงศ์ขิงมาใช้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ [2-3] เพราะพืชวงศ์นี้มีลักษณะของช่อดอกและลวดลายบนใบที่สวยงามซึ่งสามารถสร้างความผ่อนคลายและดึงดูดความสนใจจากผู้พบเห็นได้เป็นอย่างดี [4-6] ตัวอย่างของพืชวงศ์ขิงจากประเทศไทยที่ประสบความสำเร็จในเวทีอุตสาหกรรมพืชประดับของโลก เช่น ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) ซึ่งชาวต่างชาติรู้จักกันในชื่อว่า “Siam Tulip” [2, 7]

ในบรรดาพืชวงศ์ขิงกว่า 26 สกุล และ 300 ชนิดที่พบในประเทศไทย พืชสกุลมหาหงส์ (*Hedychium* J. Koenig) เป็นพืชวงศ์ขิงสกุลหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นพืชประดับ [4, 8] ชื่อสกุลมีที่มาจากภาษากรีกโบราณ ได้แก่ “hedys” หมายถึง หอมหวาน และ “chios” หมายถึง หิมะ ดังนั้นชื่อสกุลของพืชวงศ์นี้จึงมีความหมายว่า “ดอกไม้สีขาวซึ่งมีกลิ่นหอมหวาน” [4] ปัจจุบันมีพืชสกุลมหาหงส์ที่ได้รับการค้นพบมากกว่า 80 ชนิดทั่วโลก โดยมีเขตการกระจายพันธุ์ส่วนมากในทวีปเอเชีย เกาะนิวกินี ทวีปออสเตรเลีย หมู่เกาะโซโลมอน เกาะนิวเฮบริดีส์ (New Hebrides) นิวแคลิโดเนีย (New Caledonia) ประเทศฟิจิและซามัว [9] ซึ่งทางตอนใต้ของประเทศจีนและแนวเทือกเขาหิมาลัยเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของพืชสกุลนี้สูงที่สุด [10] สำหรับในประเทศไทยมีการค้นพบพืชสกุลนี้ทั้งสิ้น 21 ชนิด [11] โดยบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยมีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของพืชสกุลมหาหงส์มากที่สุด [4] พืชสกุลนี้ถูกใช้เป็นพืชประดับในหลายประเทศ เช่น อังกฤษ ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา [8] เพราะช่อดอกของพืชสกุลนี้มีสีสันที่สดใสพร้อมด้วยรูปลักษณ์ที่สวยงามคล้ายผีเสื้อ อีกทั้งยังมีกลิ่นหอม ซึ่งลักษณะดังกล่าวจึงทำให้พืชสกุลนี้มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่าลิลลี่ขิง (Ginger Lily) หรือลิลลี่ผีเสื้อ (Butterfly Lily) [12] พืชสกุลนี้ยังผลิตน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ดังนั้นส่วนดอกและเหง้าจึงถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำหอม ใช้เป็นพืชสมุนไพรและใช้เป็นยาทั้งในตำรับยาแผนโบราณและปัจจุบัน อีกทั้งส่วนลำต้นยังสามารถนำมาใช้ในการผลิตกระดาษ ขณะที่ดอก เหง้า และยอดที่ยังอ่อนอยู่สามารถรับประทานเป็นผักได้อีกด้วย ทั้งนี้พืชสกุลมหาหงส์ที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายและนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ *H. coronarium* [13]

งานวิจัยนี้เลือกต้นข่าไฟ (*Hedychium coccineum* Buch.-Ham. ex Sm.) และต้นตาเหินไหว (*Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm.) มาใช้เป็นพืชทดลอง โดยต้นข่าไฟเป็นพืชที่พบการกระจายพันธุ์ในหลายประเทศของทวีปเอเชีย [14] สำหรับในประเทศไทยนั้นพบการกระจายพันธุ์ในภาคเหนือ [4] และจากรายงานการสำรวจและรวบรวมพันธุ์พืชสกุลมหาหงส์ที่มีศักยภาพต่อการนำมาใช้เป็นพืชประดับในรัฐมณีปุระของประเทศอินเดีย พบว่าต้นข่าไฟมีศักยภาพเป็นอันดับที่ 3 จากทั้งหมด 11 อันดับ [15] เพราะพืชชนิดนี้มีช่อดอกที่สวยงามโดยมีสีแดงหรือส้มสด มีแกนกลางของช่อดอกที่ยาวจึงทำให้มีดอกจำนวนมากต่อหนึ่งช่อ ลักษณะดังกล่าวจึงส่งผลให้ต้นข่าไฟมีความน่าสนใจต่อการนำมาส่งเสริมให้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย อีกทั้งยังพบว่าพืชชนิดนี้สร้างสาร (E)-Nerolidol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย [16] สำหรับต้นตาเหินไหว ซึ่งเป็นพืชทดลองอีกชนิดนั้น มีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่แนวเทือกเขาหิมาลัย ประเทศพม่าและไทย [17] โดยในประเทศไทยนั้นพบการกระจายพันธุ์ในป่าดิบเขาทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ระดับความสูง 1,000–1,800 เมตร [18] ต้นตาเหินไหวมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทยอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีช่อดอกซึ่งประกอบไปด้วยดอกย่อยขนาดใหญ่จำนวนมาก ดอกย่อยมีกลิ่นหอมและมีกลีบดอกสีขาวแกมเหลืองอ่อนซึ่งตัดกับก้านชูอับเรณูที่มีสีส้มเข้ม นอกจากนี้ ยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดในต้นตาเหินไหว [16] ซึ่งสารบางชนิดจากส่วนเหง้า เช่น villosin และ 11,13-trien-15,16-olide มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่สูงอีกด้วย [19] ถึงแม้ว่าต้นตาเหินไหวมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นพืชประดับหรือพืชสมุนไพร แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้ในวงกว้างได้เพราะมีจำนวนในธรรมชาติที่จำกัด ทั้งยังถูกจัดให้เป็นพืชหายากของประเทศไทยอีกด้วย [1, 18]

ดังจะเห็นว่าพืชทั้งสองชนิดมีศักยภาพต่อการนำมาใช้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม การนำมาใช้ยังไม่เป็นที่แพร่หลายเพราะพืชสกุลมหาหงส์โดยมากขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยเจริญให้ต้นใหม่ผ่านเหง้า (rhizome) ซึ่งต้องขึ้นกับฤดูกาลและได้จำนวนต้นใหม่น้อย อีกทั้งยังใช้เวลานาน [13] จากข้อจำกัดในด้านปริมาณและระยะเวลาในการขยายพันธุ์นี้ จึงส่งผลให้พืชสกุลมหาหงส์หลายชนิดรวมถึงต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคหรือนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ [13, 20-21] ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงถูกนำมาใช้เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณพืชต้นใหม่ได้ในระยะเวลาจำกัดโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล จึงทำให้มีจำนวนต้นพืชมากเพียงพอที่จะตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้ [13] อีกทั้งพืชต้นใหม่ที่ได้ยังมีความสามารถในการผลิตสารชีวเคมีได้คล้ายคลึงกับต้นแม่อีกด้วย [20-21] ด้วยเหตุดังกล่าววิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงถูกนำมาใช้ในพืชสกุลมหาหงส์หลายชนิด เช่น *H. bousigonianum* [22] *H. coronarium* [13, 20-21, 23-31] *H. gardnerianum* [32] *H. muluense* [33] *H. roxburghii* [34] *H. spicatum* [35-37] และ *H. stenopetalum* [38] เพื่อวัตถุประสงค์ในด้านอนุรักษ์พันธุ์ การผลิตพืชต้นใหม่ให้ได้จำนวนมากเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมไม้ดอกไม้ประดับ การผลิตสารสำคัญและผลิตน้ำหอม การปรับปรุงพันธุ์ เป็นต้น ทั้งนี้ ยังไม่พบการรายงานการขยายพันธุ์ต้นตาเหินไหวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขณะที่มีการศึกษาการชักนำให้ต้นข่าไฟเกิดยอดใหม่ผ่านกลุ่มเซลล์แคลลัส [39] ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) ของต้นพืช จนได้พืชชนิดใหม่ที่มีลักษณะสวยงามสามารถนำไปใช้เป็นพืชประดับเศรษฐกิจชนิดใหม่ได้ [40] อย่างไรก็ตาม การชักนำให้เกิดพืช

ต้นใหม่ผ่านกลุ่มเซลล์แคลลัสเป็นวิธีการที่มีความซับซ้อน และอาศัยระยะเวลานาน [41] ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะขยายพันธุ์พืชทั้งสองชนิดนี้โดยชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นพืชทดลองโดยตรงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินชนิดเบนซิลอะดีนิน (N^6-benzyladenine; BA) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ในหลอดทดลองของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหว เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณพืชทั้งสองชนิดนี้ ทั้งนี้ข้อดีของการชักนำให้เกิดยอดใหม่โดยตรงจากชิ้นพืชทดลอง คือ ได้พืชต้นใหม่ในระยะเวลาอันสั้นด้วยวิธีการที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งเป็นหลักสำคัญของการผลิตพืชในระดับอุตสาหกรรม [20-21] ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ขยายพันธุ์ต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเพื่อผลักดันพืชทั้งสองชนิดให้กลายเป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทยต่อไป ทั้งยังสามารถนำไปใช้เพื่อสนับสนุนในการศึกษาด้านพฤกษเคมี การอนุรักษ์พันธุ์พืชนอกถิ่นอาศัย หรือการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดของต้นพืชทดลอง

นำเมล็ดของต้นข่าไฟซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดเชียงใหม่ และต้นตาเหินไหวซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดมหาสารคาม มาขัดและล้างให้สะอาดด้วยน้ำสบู่ก่อนนำไปผ่านน้ำไหล นาน 15 นาที จากนั้นนำเมล็ดไปแช่ในเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่เติมสารลดแรงตึงผิว Tween-20 (ICI Americas Inc., UK) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร ร่วมกับคลอร็อกซ์ (Clorox, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 และ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำเมล็ดไปล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที น้ำกลั่นที่ใช้ตลอดการฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดนี้ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำร้อนแรงดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2. การเพิ่มปริมาณพืชทดลอง

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวมาเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) [42] และบันทึกร้อยละการปลอดเชื้อของเมล็ดหลังเพาะบนอาหารสูตรดังกล่าวครบ 1 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงจนได้ต้นกล้าที่มีความสูง 5-6 เซนติเมตร นำต้นกล้ามาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นเพียง 1.5 เซนติเมตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA (Sigma, USA) เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 สัปดาห์ ก่อนย้ายชิ้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS อีก 8 สัปดาห์ (เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) เพื่อลดอิทธิพลของ BA ซึ่งอาจส่งผลต่อการทดลองในขั้นถัดไป วิธีการข้างต้นนี้เป็นวิธีการพื้นฐานของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการเพิ่มปริมาณพืชทดลองให้เพียงพอต่อการดำเนินงานวิจัย ทั้งนี้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใช้การศึกษานี้มีองค์ประกอบพื้นฐานคือ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร และผงวุ้น 7.3 กรัม/ลิตร มีระดับความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 5.7-5.8 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับน้ำกลั่น แต่ใช้เวลานึ่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที ขวดแก้วเลี้ยงต้นพืชแต่ละขวดบรรจุอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร และพืชทดลองจำนวน 1 ชิ้น ตลอดการศึกษานี้เลี้ยงพืชทดลองภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และให้แสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนท์สีขาวโทนเย็นที่มีความเข้มแสง 37 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที (ฟิลิปส์ ประเทศไทย)

3. การศึกษาผลของ BA ต่อการเพิ่มปริมาณต้นข่าดงและต้นตาเหินไหวในหลอดทดลอง

ยอดใหม่จากขั้นตอนก่อนหน้าที่มีความสูง 5-6 เซนติเมตร ถูกนำมาตัดให้เหลือส่วนโคนลำต้นสูง 1.5 เซนติเมตร และนำชิ้นพืชส่วนดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 4 และ 8 มิลลิกรัม/ลิตร เลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารสูตรดังกล่าวนาน 8 สัปดาห์ (ย้ายชิ้นพืชสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์) เพื่อความชัดเจนของอิทธิพลของ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการขยายพันธุ์พืชทดลอง

ในขั้นตอนนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยใช้ 20 ชิ้นพืช/ชุดทดลอง บันทึกผลการทดลองทุก 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 1 และ 2) จากการที่ลำต้นเหนือดินของพืชวงศ์ขิงเป็นลำต้นเทียมซึ่งเรียกว่า leafy-shoot [4] ดังนั้นความสูงของยอดใหม่ในการศึกษานี้จึงวัดจากส่วนล่างสุดของโคนลำต้นจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด ข้อมูลความสูงของยอดใหม่และรากใหม่วัดจากยอดและรากที่สูงและยาวที่สุดของแต่ละขวดทดลอง ข้อมูลการเจริญของยอดและรากใหม่ถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) ด้วยการทดสอบเอฟ (F-test) และนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error: S.E.) ซึ่งหากค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยถูกนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างต่อด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's multiple range test: DMRT) การวิเคราะห์ทางสถิติทุกขั้นตอนของการศึกษานี้วิเคราะห์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 20.0

ผลการทดลอง

1. ผลการฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ดและการชักนำให้เกิดต้นพืชในหลอดทดลองของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหว

หลังจากนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวของพืชทั้งสองชนิดมาเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ เมล็ดเริ่มงอกเป็นต้นกล้าขนาดเล็กเมื่อเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงจนครบ 10 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ามีความสูงประมาณ 5-6 เซนติเมตร ซึ่งมีความสมบูรณ์แข็งแรงพร้อมต่อการนำไปใช้เพิ่มปริมาณพืชทดลองให้มีจำนวนเพียงพอต่อการดำเนินงานวิจัย

2. ผลของ BA ต่อการเจริญของยอดใหม่ของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวในหลอดทดลอง

ใน 4 สัปดาห์แรกหลังเลี้ยงชิ้นพืช พบว่า มียอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชทดลองโดยตรงที่บริเวณฐานของชิ้นพืชทดลอง ซึ่งแต่ละสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่แตกต่างกันไป ยกเว้นต้นตาเหินไหวที่เลี้ยงบนอาหารชุดควบคุมซึ่งไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1) และเมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ พบว่าส่วนโคนลำต้นของต้นข่าไฟที่เลี้ยงบนอาหารชุดควบคุมยังคงมียอดใหม่เจริญขึ้นเพียง 1 ยอด/ชิ้นส่วนเริ่มต้นเช่นเดียวกับสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่สูตรอาหารซึ่งมี BA ร่วมด้วย ให้จำนวนยอดใหม่ที่สูงกว่าสูตรอาหารชุดควบคุมและมากกว่ายอดที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 โดยอาหารที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นมากที่สุด (5.00 ± 0.30 ยอด) ถึงแม้ชุดควบคุมเจริญให้จำนวนยอดใหม่น้อยที่สุด แต่ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีความสูงมากที่สุด (5.75 ± 0.08 เซนติเมตร) ทั้งนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์ส่งผลให้จำนวนและความสูงของยอดใหม่ของต้นข่าไฟลดลง (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) สำหรับในต้นตาเหินไหวพบว่ายังคงไม่มียอดใหม่เกิดขึ้นจากส่วนโคนลำต้นเช่นเดียวกับในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 1, รูปที่ 2)

ขณะที่จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น (3.30 ± 0.42 ยอด) และความสูงของยอดใหม่ (5.05 ± 0.66 เซนติเมตร) ที่มากที่สุดพบจากส่วนโคนลำต้นที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BA เข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้การเจริญของยอดใหม่ของต้นตาเหินไหวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์มากกว่าความเข้มข้นข้างต้น (ตารางที่ 1, รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 การเจริญของยอดและรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 และ 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ต้นตาข่าไฟ		ต้นตาเหินไหว	
	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นส่วนเริ่มต้น	ความสูงของยอดใหม่ (ซม.)	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นส่วนเริ่มต้น	ความสูงของยอดใหม่ (ซม.)
4 สัปดาห์				
0	1.00 ± 0.00^{B}	4.25 ± 0.08^{A}	0^{C}	0^{C}
1	2.60 ± 0.16^{A}	2.64 ± 0.09^{B}	1.40 ± 0.27^{A}	3.69 ± 0.57^{A}
2	2.50 ± 0.17^{A}	2.51 ± 0.07^{B}	2.30 ± 0.37^{A}	3.44 ± 0.30^{A}
4	2.40 ± 0.16^{A}	1.71 ± 0.08^{C}	2.10 ± 0.23^{AB}	3.10 ± 0.29^{A}
8	2.40 ± 0.16^{A}	1.21 ± 0.04^{D}	1.60 ± 0.31^{AB}	1.83 ± 0.37^{B}
F-test	*	*	*	*
8 สัปดาห์				
0	1.00 ± 0.00^{E}	5.75 ± 0.08^{A}	0^{C}	0^{C}
1	5.00 ± 0.30^{A}	3.34 ± 0.11^{B}	1.90 ± 0.31^{B}	5.05 ± 0.66^{A}
2	4.30 ± 0.21^{B}	3.14 ± 0.07^{B}	3.30 ± 0.42^{A}	4.76 ± 0.50^{A}
4	3.70 ± 0.15^{C}	2.50 ± 0.05^{C}	2.90 ± 0.43^{AB}	4.31 ± 0.25^{A}
8	2.70 ± 0.15^{D}	2.03 ± 0.08^{D}	2.60 ± 0.34^{B}	3.12 ± 0.21^{B}
F-test	*	*	*	*

ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย ± S.E. หาก F-test ของข้อมูลแต่ละสดมภ์พบความแตกต่างทางสถิติ (*) ค่าเฉลี่ยถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการ DMRT และแสดงความแตกต่างทางสถิติด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษ การศึกษานี้วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3. ผลของ BA ต่อการเจริญของรากใหม่ของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวในหลอดทดลอง

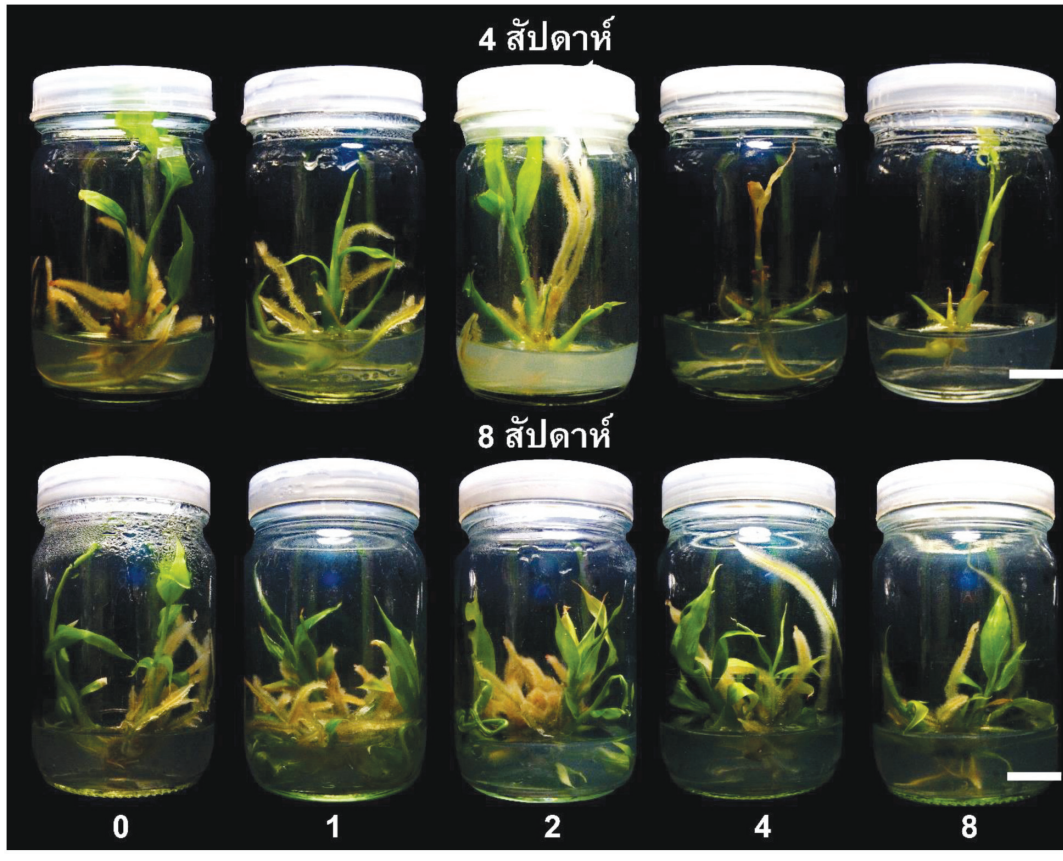
หลังจากเลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA เข้มข้นแตกต่างกันนาน 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นพืชจากแต่ละสูตรอาหารสามารถเจริญให้รากใหม่ได้ โดยมีจำนวนรากที่เกิดขึ้นใหม่และความยาวรากแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อครบสัปดาห์ที่ 8 ของการเลี้ยงพืชทดลอง พบว่าการเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นข่าไฟบนอาหารที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น (10.00 ± 0.39 ราก) และความยาวราก (5.96 ± 0.54 เซนติเมตร) สูงที่สุด (ตารางที่ 2, รูปที่ 1) ขณะที่ต้นตาเหินไหวซึ่งเลี้ยงบนอาหารที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ดีที่สุด (จำนวนรากใหม่ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นเฉลี่ย 5.50 ± 0.37 ราก, ความยาวรากใหม่เฉลี่ย 5.84 ± 0.54 เซนติเมตร) (ตารางที่ 2, รูปที่ 2) ทั้งนี้ผลการทดลองยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์เกินกว่าระดับที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดส่งผลให้การเจริญของรากใหม่ในต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2, รูปที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 2 การเจริญของรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 และ 8 สัปดาห์

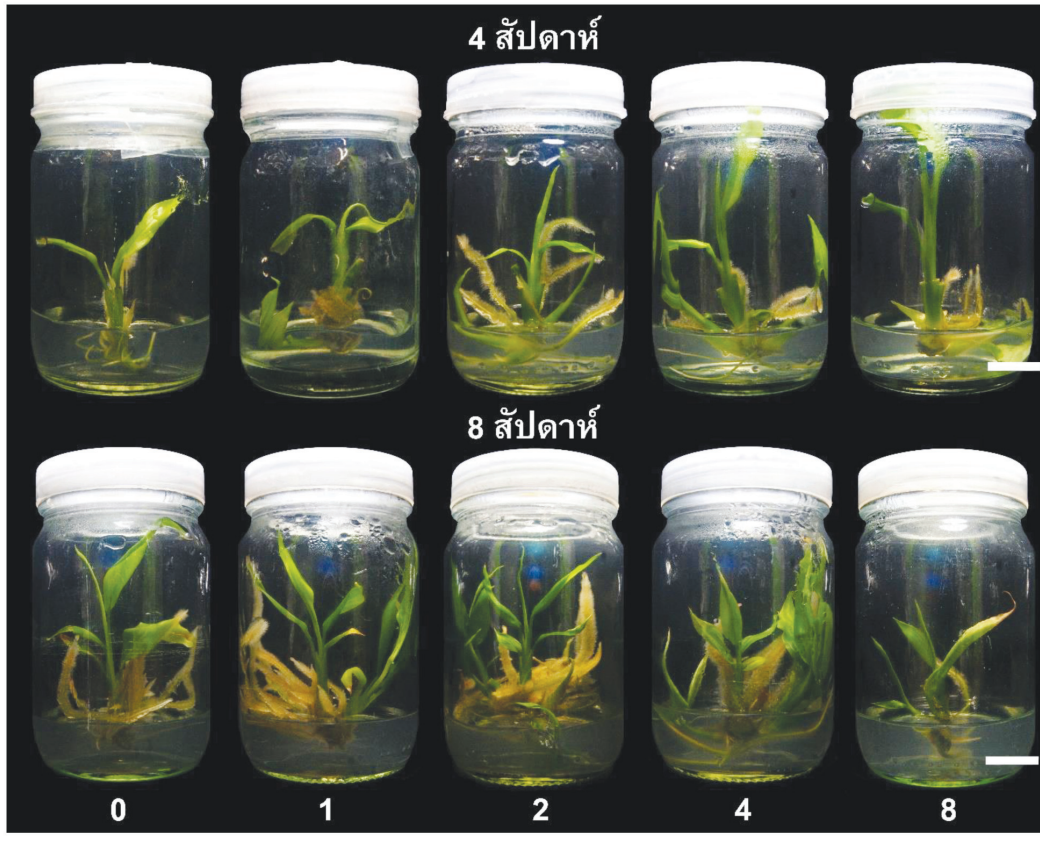
ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ต้นตาข่าไฟ		ต้นตาเหินไหว	
	จำนวนรากใหม่/ชิ้นส่วนเริ่มต้น	ความยาวของรากใหม่ (ซม.)	จำนวนรากใหม่/ชิ้นส่วนเริ่มต้น	ความยาวของรากใหม่ (ซม.)
4 สัปดาห์				
0	4.90 ± 35^{A}	3.11 ± 0.50^{A}	2.10 ± 0.23	2.40 ± 0.41^{B}
1	4.70 ± 0.26^{A}	3.76 ± 0.77^{A}	1.70 ± 0.30	2.53 ± 0.48^{B}
2	4.30 ± 0.45^{A}	2.93 ± 0.35^{A}	2.40 ± 0.31	3.58 ± 0.34^{A}
4	3.40 ± 0.22^{B}	2.23 ± 0.48^{AB}	2.00 ± 0.26	1.94 ± 0.27^{BC}
8	2.30 ± 0.15^{C}	1.11 ± 0.60^{B}	1.80 ± 0.36	0.97 ± 0.27^{C}
F-test	*	*	–	*
8 สัปดาห์				
0	8.20 ± 0.44^{B}	4.40 ± 0.43^{B}	3.70 ± 0.40^{C}	4.05 ± 0.43^{B}
1	10.00 ± 0.39^{A}	5.96 ± 0.54^{A}	4.30 ± 0.33^{BC}	5.78 ± 0.36^{A}
2	7.80 ± 0.25^{B}	3.41 ± 0.46^{BC}	5.50 ± 0.37^{A}	5.84 ± 0.54^{A}
4	4.30 ± 0.45^{C}	3.17 ± 0.28^{BC}	5.00 ± 0.33^{AB}	4.46 ± 0.21^{B}
8	3.20 ± 0.13^{D}	2.49 ± 0.46^{C}	2.30 ± 0.33^{D}	1.36 ± 0.16^{C}
F-test	*	*	*	*

ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย ± S.E. หาก F-test ของข้อมูลแต่ละสดมภ์พบความแตกต่างทางสถิติ (*) ค่าเฉลี่ยถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการ DMRT และแสดงความแตกต่างทางสถิติด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษ การศึกษานี้วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลทั้งหมดแล้ว อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นข่าไฟในหลอดทดลอง เนื่องจากอาหารสูตรนี้มีการเจริญของยอดและรากใหม่สูงกว่าอาหารสูตรอื่น โดยมีผลกระทบต่อความสูงของยอดใหม่ในระดับปานกลาง (3.34 ± 0.11 เซนติเมตร) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (5.75 ± 0.08 เซนติเมตร) (ตารางที่ 1 และ 2, รูปที่ 1) ขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ต้นตาเหินไหวในหลอดทดลอง คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร โดยอาหารสูตรดังกล่าวเจริญให้ยอดและรากใหม่ได้ดีที่สุด โดยมีผลกระทบต่อความสูงของยอดใหม่เล็กน้อย (4.76 ± 0.50 เซนติเมตร) เมื่อเทียบกับชุดทดลอง BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร (5.05 ± 0.66 เซนติเมตร) (ตารางที่ 1 และ 2, รูปที่ 2)



รูปที่ 1 การเจริญของยอดและรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นข่าไฟบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 และ 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)



รูปที่ 2 การเจริญของยอดและรากใหม่หลังจากเลี้ยงส่วนโคนลำต้นของต้นตาเหินไหวบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 และ 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากตามธรรมชาติของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวซึ่งเป็นพืชในวงศ์ขิงนั้นมักขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศผ่านเหง้าที่อยู่ในดิน จึงทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลมหาหงส์ส่วนใหญ่ใช้ส่วนต่างๆ จากเหง้ามาเป็นชิ้นพืชเริ่มต้น [20, 25-30, 32, 34-35] แต่การใช้เหง้ามาเป็นชิ้นพืชทดลองเริ่มต้นมีปัจจัยเสี่ยงจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งจากผิวของเหง้าเองและจากเนื้อเยื่อของเหง้า เพราะเหง้าเป็นส่วนที่สัมผัสกับดินจึงมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพสูง [43] ประกอบกับต้นตาเหินไหวซึ่งเป็นพืชทดลองในการศึกษานี้ถูกจัดเป็นพืชหายากของประเทศไทย [1, 18] ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดที่ไม่สามารถได้เหง้าของพืชชนิดนี้เป็นจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงใช้เมล็ดของพืชทั้งสองชนิดเป็นชิ้นพืชเริ่มต้นเพื่อลดข้อจำกัดในด้านปริมาณเหง้าและลดปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลมหาหงส์หลายชนิดได้ใช้เมล็ดเป็นชิ้นพืชเริ่มต้นเช่นกัน [23-24, 33, 36-37] และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *H. coronarium* ที่ใช้เมล็ดเป็นชิ้นพืชเริ่มต้นในการฟอกฆ่าเชื้อผิวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นพืชในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย [21] ในการทดลองนี้เมื่อฟอกฆ่าเชื้อผิวและเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 1 สัปดาห์ ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพในทุกเมล็ด อันเป็นการแสดงถึงประสิทธิภาพของวิธีการฟอกฆ่า

เชื้อผิวในการศึกษานี้ ซึ่งมีปัจจัยมาจากเมล็ดของพืชทั้งสองชนิดมีผลห่อหุ้มอยู่จึงไม่ได้สัมผัสกับสภาพแวดล้อมมากนัก และเมล็ดของพืชสกุลนี้มีเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนาและแข็ง ทำให้มีความทนทานสูง จึงสามารถใช้สารเคมีที่ระดับความเข้มข้นสูงร่วมกับการใช้เวลาที่นานในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้โดยที่ไม่เป็นอันตรายต่อคัพภะ (embryo) ที่อยู่ภายในเมล็ด

พืชสกุลมหาหงส์หลายชนิดสามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่จำนวนมากโดยผ่านแคลลัส [22, 25, 31] หากแต่วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการที่มีความซับซ้อน เนื่องจากมีขั้นตอนที่ต้องดำเนินการมากกว่าวิธีการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นพืชทดลองโดยตรง จึงอาจต้องอาศัยระยะเวลานาน [41] ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ของการผลิตพืชในระดับอุตสาหกรรม [20-21] ดังนั้น การศึกษานี้จึงใช้ส่วนโคนลำต้นยาว 1.5 เซนติเมตร ซึ่งตัดจากต้นพืชปลอดเชื้อที่มีความสูง 5-6 เซนติเมตร เป็นชิ้นพืชทดลอง และพบว่ามียอดใหม่เจริญขึ้นจากชิ้นพืชทดลองโดยตรงภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ของการเลี้ยงชิ้นพืช ทั้งนี้เพราะชิ้นพืชส่วนดังกล่าวมีตาข้างและเนื้อเยื่อเจริญอยู่ [4] ขณะที่การชักนำให้เกิดยอดใหม่ผ่านกลุ่มเซลล์แคลลัสของพืชสกุลมหาหงส์ต้องใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 27-32 สัปดาห์ [22, 25, 31] สำหรับการชักนำให้เกิดยอดโดยตรงในพืชสกุลมหาหงส์ชนิดอื่นสามารถพบได้จากชิ้นพืชหลายชนิด เช่น ข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง [21] ปลายยอดของต้นกล้า [23-24, 36-37] ตาหรือตาข้างจากส่วนเหง้า [26-27, 29-30, 32, 35] ปลายยอด [28, 38] และส่วนฐานของเหง้า [34] แต่การที่จะได้มาซึ่งชิ้นพืชทดลองข้างต้นอาจมีกรรมวิธีที่มากกว่าและใช้เวลาที่นานกว่าในการทำการทดลอง ดังนั้นการนำส่วนโคนของลำต้นเหนือดินมาใช้จึงก่อให้เกิดความสะดวกและรวดเร็วในการปฏิบัติงานกับต้นพืชจำนวนมาก นอกจากนี้พืชวงศ์ขิงบางชนิด เช่น ต้นดอกดิน *(Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škornick.) ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ส่วนโคนลำต้นในการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากในหลอดทดลองได้ [44]

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชในหลอดทดลอง ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินชนิด BA มาศึกษาผลต่อการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหว เนื่องจาก BA มีราคาถูกและมีความเป็นพิษต่อเซลล์พืชต่ำ [45] ทั้งยังสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าไซโทไคนินบางชนิด เช่น ไคนิทีน (kinetin) หรือซีเอทิน (zeatin) [20-21, 30] อีกทั้งยอดใหม่ที่ได้มีลักษณะปกติ ไม่แคระแกร็น [20] และมีความสูงของยอดใหม่ที่สูงกว่าต้นพืชที่ถูกขยายพันธุ์ด้วยการใช้ไทเดียอะซูรอน (thidiazuron) [20-21, 30, 37] ในการศึกษานี้ เมื่อนำส่วนโคนลำต้นของพืชทดลองทั้งสองชนิดไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้นแตกต่างกันนาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA สามารถเจริญให้ยอดใหม่ได้หลายยอดต่อชิ้นพืช ขณะที่ชิ้นพืชทดลองของต้นตาเหินไหว ซึ่งเลี้ยงบนสูตรอาหารชุดควบคุมไม่พบการเจริญของยอดใหม่เลย หรือในกรณีของต้นข่าไฟที่พบยอดใหม่เพียง 1 ยอด/ชิ้นพืช ทั้งนี้เป็นเพราะไซโทไคนินมีฤทธิ์ยับยั้งการข่มของตายอด (apical dominance) ทำให้ตาข้างพ้นจากช่วงการพักตัว (break dormancy) ทั้งยังกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ [46] และเป็นสัญญาณเคมีให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell differentiation) ให้ไปทำหน้าที่จำเพาะ จึงเกิดการสร้างเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดยอดใหม่ขึ้น [47] ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลมหาหงส์หลายชนิดที่พบว่า BA เพียงชนิดเดียว [38] หรือเมื่อใช้ร่วมกับออกซินที่ความเข้มข้นต่ำ [24, 26, 32, 35] สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้จำนวนมาก โดยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถ

ชักนำให้ต้นข่าไฟเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด ขณะที่ต้นตาเหินไหวเกิดยอดใหม่ได้สูงสุดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งการใช้ความเข้มข้นของ BA ที่ต่างไปจากระดับนี้ส่งผลให้ได้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชที่ลดลง ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการขยายพันธุ์พืชสกุลมหาหงส์หลายรายงานที่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนินในอาหารสังเคราะห์ทำให้ได้จำนวนยอดใหม่ลดลง [20-21, 23-24, 26, 30, 32, 35, 37-38] เพราะการใช้ไซโทไคนินเข้มข้นเกินกว่าระดับที่เหมาะสมจะยับยั้งและชะลอการแบ่งเซลล์ตลอดจนปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ในเนื้อเยื่อเจริญ [48] จึงทำให้ได้จำนวนของยอดใหม่ลดลง [46] นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่าต้นตาเหินไหวมีระดับความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสม (2 มิลลิกรัม/ลิตร) ที่สูงกว่าต้นข่าไฟ (1 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่กลับเจริญให้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นพืชที่ต่ำกว่า ซึ่งผลที่ได้นี้อาจเป็นข้อบ่งชี้ที่สนับสนุนการจัดสถานะของต้นตาเหินไหวให้เป็นพืชหายากของประเทศไทย [18] สำหรับในด้านความสูงของยอดใหม่นั้น ผลการศึกษาพบว่าความสูงของยอดใหม่ในพืชทดลองทั้งสองชนิดลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่พบผลในลักษณะเดียวกันนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซโทไคนิน [20-21, 24, 30, 37-38] เนื่องจากไซโทไคนินที่ระดับความเข้มข้นสูงมีผลต่อการยืดยาวของยอด [46] โดยมีรายงานว่า BA ที่ความเข้มข้นสูงสามารถชักนำให้เกิดก๊าซเอทิลีนซึ่งส่งผลกระทบให้ยอดใหม่มีความสูงที่ลดลงได้ [49]

ระบบรากของพืชมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืชในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นการนำต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมจริงได้นั้น ต้นพืชจำเป็นต้องมีระบบรากที่ดี [26] อย่างไรก็ตาม การใช้ไซโทไคนินในการชักนำให้เกิดยอดในหลอดทดลองนั้น มีผลกระทบตามมา เนื่องจากสารชนิดนี้ออกฤทธิ์ตรงกันข้ามกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซิน ทำให้สามารถชะลอหรือยับยั้งการเกิดรากใหม่ได้ [46] ซึ่งมีการศึกษาที่พบว่าการใช้ BA ที่ความเข้มข้นต่างกัน สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชและต่อการเกิดรากได้ระยะเวลาหนึ่ง แม้ย้ายต้นพืชไปเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้วก็ตาม [44] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของ BA ที่มีต่อการเกิดรากใหม่ในพืชทดลองทั้งสองชนิดร่วมด้วย โดยพบว่ายังคงมีรากเกิดขึ้นในทุกสูตรอาหารที่มี BA ร่วมอยู่ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการขยายพันธุ์พืชสกุลมหาหงส์หลายชนิดที่พบการเจริญของรากใหม่ไปพร้อมกับยอดใหม่บนอาหารสังเคราะห์ที่เติม BA หรือไซโทไคนิน [20-21, 23, 26-28, 32, 34-36] การที่ BA ไม่สามารถยังยั้งการเกิดรากในพืชทดลองทั้งสองชนิดนี้อาจมีสาเหตุมาจากระดับความเข้มข้นของ BA ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มากพอที่จะส่งผลยับยั้งการเจริญของรากใหม่ ผลการทดลองยังพบว่าความเข้มข้นของ BA ที่ 1 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้ต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวเกิดรากใหม่สูงสุดอีกด้วย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในพืชสกุลมหาหงส์หลายรายงานที่พบว่าการเลี้ยงชิ้นพืชบนอาหารสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของไซโทไคนินที่เหมาะสมสามารถสนับสนุนให้เกิดการเจริญของรากได้ [20-21, 27] ทั้งนี้เพราะไซโทไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อเจริญที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดรากได้ [47] อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ปริมาณ BA ที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด แต่หากความเข้มข้นของ BA ที่ใช้มากเกินกว่าระดับดังกล่าว อาจส่งผลชะลอต่อการเจริญของรากใหม่ทั้งในแง่จำนวนและความยาวได้ดังที่พบในการศึกษานี้ หรือดังที่ปรากฏในการศึกษาการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของพืชสกุลมหาหงส์หลายรายงาน [20-21, 32] ทั้งนี้เพราะการเพิ่มความเข้มข้นของ BA ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นพืช ทำให้ต้นพืชมีปริมาณสะสม

ของไซโทไคนินที่สูงกว่าออกซินจึงส่งผลให้การเจริญของรากใหม่ลดลง ซึ่งหากใช้ความเข้มข้นของไซโทไคนินที่สูงเกินไปจะส่งผลยับยั้งการเจริญของรากใหม่ได้ [32, 46] นอกจากนี้ การที่ต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวเจริญให้ยอดและรากใหม่ไปพร้อมกันจากการเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันยังเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่าย ระยะเวลาและแรงงาน เพราะไม่จำเป็นต้องหาสูตรอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดราก จึงทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตพืชเชิงอุตสาหกรรมได้เพราะวิธีการขยายพันธุ์ไม่ซับซ้อน ต้นทุนต่ำ ทำได้ง่ายและสะดวกรวดเร็ว [20-21, 27] อีกทั้งรายงานการขยายพันธุ์พืชสกุลมหาหงส์หลายรายงานยังพบว่าเมื่อนำต้นพืชที่มีการเจริญของยอดและรากไปพร้อมกันมาอนุบาลออกปลูกโดยข้ามขั้นตอนการหาสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดรากในหลอดทดลอง พบว่าต้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 80-100% [20-21, 26]

การศึกษานี้ได้วิธีการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของพืชทั้งสองชนิดซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้น 18 สัปดาห์ โดยชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่จากชิ้นพืชโดยตรงในขั้นตอนเดียว ด้วยการนำส่วนโคนลำต้นปลอดเชื้อของต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งต้นพืชที่ได้นี้พร้อมต่อการนำอนุบาลออกปลูกต่อไป ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีในการเพิ่มปริมาณต้นข่าไฟและต้นตาเหินไหวให้ได้จำนวนมากเพื่อส่งเสริมให้พืชทั้งสองชนิดนี้เป็นพืชประดับเชิงเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย และยังอาจใช้เป็นวิธีการอนุรักษ์พันธุ์พืชนอกถิ่นอาศัยหรือใช้เป็นวิธีการผลิตต้นพืชเพื่อให้ได้วัตถุดิบจำนวนมากสำหรับการศึกษาด้านพฤกษเคมีหรือปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ทยา เจนจิตติกุล อาจารย์ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการระบุชนิดพืชทดลอง การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Center of Excellence on Biodiversity: BDC-PERDO) หมายเลขทุนอุดหนุน BDC-PG3-160014

เอกสารอ้างอิง

1. Saensouk, S. (2011). Endemic and rare plants of ginger family in Thailand. *KKU Research Journal, 16*(3), 306–329. (In Thai)
2. Wannakrairoj, S. (2008). Status of ornamental plants in Thailand. *Acta Horticulturae, 788,* 29–36.
3. Boonkorkaew, P., Suksathan, P., & Yangkhamman, P. (2013). *Development of Globba for Commercial Purpose and Studying Postharvest Physiology.* Bangkok, National Research Council of Thailand. (In Thai).
4. Larsen, K., & Larsen, S. (2006). *Ginger of Thailand.* Chaing Mai, Queen Sirikit Botanic Garden, The Botanical Garden Organization.
5. Chuengpanya, R., Chuenboonngarm, N., Thammasiri, K., Jenjittikul, T., Soonthornchainaksaeng, P., & Muangkroot, A. (2017). Investigation of colchicine incubation time

on the regeneration rate of *Globba williamsiana* 'Dok Khao'. *Acta Horticulturae, 1167,* 149–156.

6. Soonthornkalump, S., Chuenboonngarm, N., Jenjittikul, T., Thammasiri, K., & Soontornchainaksaeng, P. (2016). Morphological and stomatal guard cell characteristics of *in vitro* Kaempferia rotunda L. (Zingiberaceae) through colchicine induced polyploidy. *Walailak Journal of Science and Technology, 14*(3), 235–242.
7. Ruamrungsri, S., Suwanthada, C., Apavatjrut, P., Ohtake, N., Sueyoshi, K., & Ohyama, T. (2005). Effect of nitrogen and potassium on growth and development of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. *Acta Horticulturae, 673,* 443–448.
8. Sakhanokho, H. F., & Rajasekaranb, K. (2010). Pollen biology of ornamental ginger (Hedychium spp. J. Koenig). *Scientia Horticulturae, 125,* 129–135.
9. Larsen, K., Lock, J. M., Maas, H., & Maas, P. J. M. (1998). Zingiberaceae. In: *Flowering Plants–Monocotyledons.* Kubitzki, K. (Ed.), pp. 474–495. Berlin/Heidelberg: Springer.
10. Hayes, L., Barton, J., Bezar, C., & Faville, N. (2009). Treading gingerly in India. *Landcare Research, 48,* 1–2.
11. Wongsuwan, P., & Picheansoonthorn, C. (2011). Taxonomic revision of the genus Hedychium J. Konig (Zingiberaceae) in Thailand (part I). *The Journal of the Royal Institute of Thailand, 3,* 126–149.
12. Sanoj, E., Sabu, M., & Kumar, T. R. (2010). *Hedychium forrestii* (Zingiberaceae) with a new synonymy and a variety from India. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas, 4*(2), 633–639.
13. Behera, S., Rath, S., Akhtar, M. S., & Naik, S. K. (2018). Biotechnological intervention through tissue culture in *Hedychium coronarium:* a potential anticancer plant. In M. S. Akhtar, & M. K. Swamy (Eds.), *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implement* (pp. 551–564). Springer.
14. Larsen, K., & Delin, W. (2000). *Hedychium coccineum.* In: *Flora of China. Vol. 24 (Flagellariaceae through Marantaceae).* Wu, Z. Y., & Raven, P. H. (Eds.), pp. 375. St. Louis: Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press.
15. Sarangthem, N., Talukdar, N.C., & Thongam, B. (2012). Collection and evaluation of *Hedychium* species of Manipur, Northeast India. *Genetic Resources and Crop Evolution, 60,* 13–21.
16. Sakhanokho, H. F., & Rajasekarun, K. (2019). *Hedychium* essential oils: composition and uses. In: *Essential Oil Research–Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production.* Malik, S. (Ed.), pp. 49–60. Cham: Springer Nature.

17. Ashokan, A., & Gowda, V. (2019). *Hedychium ziroense* (Zingiberaceae), a new species of ginger lily from Northeast India. *PhytoKeys, 117,* 73–84.
18. Chamchumroon, V. (2017). *Threatened plants in Thailand.* Bangkok: Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation.
19. Songsri, S., & Nuntawong, N. (2016). Cytotoxic labdane diterpenes from *Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm. *Molecules, 21*(6), 749. DOI:10.3390/molecules21060749.
20. Behera, S., Kamila, P. K., Rout, K. K., Barik, D. P., Panda, P. C., & Naik, S. K. (2018). An efficient plant regeneration protocol of an industrially important plant, *Hedychium coronarium* J. Koenig and establishment of genetic & biochemical fidelity of the regenerants. *Industrial Crops & Products, 126,* 58–68.
21. Behera, S., Kar, S. K., Rout, K. K., Barik, D. P., Panda, P. C., & Naik, S. K. (2019). Assessment of genetic and biochemical fidelity of field-established *Hedychium coronarium* J. Koenig regenerated from axenic cotyledonary node on meta-topolin supplemented medium. *Industrial Crops & Products, 134,* 206–215.
22. Sakhanokho, H. F., Kelly, R. Y., & Rajasekaran, K. (2009). Somatic embryogenesis in *Hedychium bousigonianum. Hort Science, 44,* 1487–1490.
23. Rungjindamai, C., Thammasiri, K., Chuenboonngarm, N., & Jenjittikul, T. (2014). Micropropagation of *Hedychium coronarium. Acta Horticulturae, 1025,* 223–229.
24. Bisht, S., Bisht, N. S., & Bhandari, S. (2012). *In vitro* plant regeneration from seedling explants of *Hedychium coronarium* J. Koenig. *Journal of Medicinal Plants Research, 6*(43), 5546–5551.
25. Verma, M., & Bansal. Y. K. (2012). Induction of somatic embryogenesis in endangered butterfly ginger *Hedychium coronarium* J. Koenig. *Indian Journal of Experimental Biology, 50,* 904–909.
26. Mohanty, P., Behera, S., Swain, S. S., Barik, D. P., & Naik, S. K. (2013). Micropropagation of *Hedychium coronarium* J. Koenig through rhizome bud. *Physiology & Molecular Biology of Plants, 19*(4), 605–610.
27. Parida, R., Mohanty, S., & Nayak, S. (2013). *In vitro* propagation of *Hedychium coronarium* Koen. through axillary bud proliferation. *Plant Biosystems, 147*(4), 905–912.
28. Mohanty, S., Parida, R., Sahoo, S., & Nayak, S. (2014). *In vitro* conservation of nine medicinally and economically important species of Zingiberaceae from Eastern India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 84*(3), 799–803.
29. Verma, M., & Bansal, Y. K. (2013). Effect of additives on plant regeneration in *Hedychium coronarium* J. Koenig an endangered aromatic and medicinal herb. *International Journal*

of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 23, 105–110.

30. Verma, M., & Bansal, Y. K. (2014). Effect of a potent cytokinin thidiazuron (TDZ) on *in vitro* regeneration of *Hedychium coronarium* J. Koenig - a valuable medicinal plant. *International Journal of Recent Biotechnology, 2*(1), 38–44.
31. Wang, X., Hongyan, T., & Ailing, Z. (2016). Embryogenic callus induction and plant regeneration from *Hedychium coronarium via* somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae Sinica, 43,* 1605–1612.
32. Dohling, S. (2012). *In vitro* propagation of *Hedychium gardnerianum* Sheppard ex Ker Gawl., an important ornamental plant. *Keanean Journal of Science, 1,* 31–35.
33. Sakhanokho, H. F., Kelly, R. Y., & Rajasekaran, K. (2008). First report of plant regeneration *via* somatic embryogenesis from shoot apex derived callus of *Hedychium muluense. Journal of Crop Improvement, 21,* 191–200.
34. Tripathi, B. K., & Bitaillon, C. (1985). *In vitro* plant regeneration of *Hedychium roxburghii* blume through rhizome-meristem culture. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture, 4*(1), 11–17.
35. Koul, S., Raina, V., & Sharma, S. K. (2005). Conservation and propagation of high altitude medicinal and aromatic plant: *Hedychium spicatum. Journal of Plant Bilshemistry and Biotechnology, 14*(1), 57–59.
36. Badoni, A., Bisht, C., & Chaunhan, J. S. (2010). Micropropagation of *Hedychium spicatum* Smith using *in vitro* shoot tip. *Stem Cell, 1*(1), 11–13.
37. Giri, D., & Tamta, S. (2011). Effect of plant growth regulators (PGRs) on micropropagation of a vulnerable and high value medicinal plant *Hedychium spicatum. African Journal of Biotechnology, 10*(20), 4040-4045.
38. Rodpradit, S., Songnun, K., & Shusuwanaruk, K. (2017). *In vitro* microrhizome induction in *Hedychium stenopetalum* Lodd. *Acta Horticulturae, 1167,* 163–168.
39. Sailas, B., Preethi, T. P., Shinija, K., Rakhi, K. P., Sabu, M. (2009). Micropropagation and chemical profiling of *Alpinia malaccensis* and *Hedychium coccineum. Journal of Tropical Medicinal Plants. 10*(1). 95-99.
40. Sakhanokho, H. F., Rajasekaran, K., Tabanca, N., Sampson, B. J., Nyochembeng, L. M., Pounders, C. T., Wedge, D. E., Islam-Faridi, N., & Spiers, J. M. (2010). Induced polyploidy and mutagenesis of embryogenic cultures of ornamental ginger (*Hedychium* J. KOENIG). *Acta Horticulturae, 935,* 121–128.
41. Pourhosseini, L., Kermani, M. J., Habashi, A. A., & Khalighi, A. (2013). Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of *Rosa hybrida. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 112,* 101–108.

42. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473–497.
43. 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.
44. Chuengpanya, R., Chuenboonngarm, N., Kongtook, N., Longsaward, R., Nopporncharoenkul, N., Muangkroot, A., Jenjittikul, T., & Soonthornchainaksaeng, P. (2019). *In vitro* propagation of *Curcuma candida* (Wall.) Techapr. & Škornick., a vulnerable plant of Thailand. *Srinakharinwirot Science Journal, 35*(2), 31–50. (in Thai).
45. Thomas, T. H. (1982). *Plant Growth Regulator Potential and Practice.* Croydon: British Crop Protection Council.
46. van Staden, J., Zazimalova, E., & George, E. F. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In E. F. George, M. A. Hall, & G. J. De-Klerk (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture* (*3rd ed.,* pp. 205–226). Dordrecht: Springer.
47. Bianco, M. D., Giustini, L., & Sabatini, S. (2013). Spatiotemporal changes in the role of cytokinin during root development. *New Phytologist, 199,* 324–338.
48. Can, E., Celiktas, N., & Hatipoglu, R. (2008). Effect of auxin type and concentrations in different media on the callus induction and shoot formation of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn). *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 22,* 782–786.
49. 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.