*บทความวิจัย*

# การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ด้วยตายอดจากเหง้าอ่อน

**กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล**[1*]


## บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดยอดอย่างมีประสิทธิภาพในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) 2 ชนิด ที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุนและอำเภอท่าชนะในสภาพปลอดเชื้อ โดยการตัดปลายยอดจากเหง้าอ่อนไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม Malt extract 100 มก./ล. และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน ผลการทดลองพบว่า BAP ความเข้มข้น 3.5 มก./ล. ทำให้เกิดหน่อเฉลี่ยสูงสุดทั้งสองชนิด (4.58 และ 4.21 หน่อ ตามลำดับ) เมื่อทดลองย้ายหน่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมหลายชั่วรุ่นพบว่าอัตราการเกิดหน่อมีแนวโน้มลดลงทั้งสองชนิด หน่อที่เกิดขึ้นสามารถเกิดรากได้เองในอาหารที่เติม BAP ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน เมื่อเติมผงถ่าน 100 มก./ล. สามารถทำให้เกิดรากอย่างรวดเร็วและจำนวนมาก การอนุบาลต้นขมิ้นชันที่มีรากสมบูรณ์ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า ต้นขมิ้นชันที่ตัดใบละครึ่งนำลงปลูกในกระถางดินแล้วครอบด้วยถุงพลาสติกใส ทำให้มีอัตรารอดตายสูงสุดทั้งสองชนิด (ร้อยละ 95 และ 98.5 ตามลำดับ) จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานของต้นขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงตายอดจากเหง้าอ่อนทั้งสองชนิดจำนวนมาก ไม่พบลักษณะผิดปกติที่แตกต่างจากต้นแม่


**คำสำคัญ:** ขมิ้นชัน การขยายพันธุ์ ตายอด เหง้าอ่อน

[1]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: koarapatchaikol@gmail.com

# Micropropagation of Turmeric (*Curcuma longa* L.) *via* Shoot Tip Culture from Juvenile Rhizome

**Korn Koarapatchaikol**[1*]

## ABSTRACT

In order to develop an efficient regeneration protocol for turmeric (*Curcuma longa* L.) shoot-tip cultures which sample plants collected from Bantakhun and Thachana Districts. The sterile shoot-tips were dissected from juvenile rhizome and initiated on MS medium supplemented with 100 mg/L malt extract and various concentrations of BAP for 45 days. The results showed that the MS medium containing 3.5 mg/L BAP fortified the maximum buds number production (4.58 and 4.21 shoots, respectively). Multiplication rates studied by subculturing every 45 days interval for ten times tended to decreased shoot buds numbers significantly. The shoot bud clusters were rooted spontaneously in the multiplied medium containing BAP, which applying in a long period. Adding 100 mg/L activated charcoal in the rooting medium ameliorated the number and quality of roots. Leaves clipping in half and transparent plastic bags covering were the best result to thriving acclimatization, and transplantation was taken successful under high humidity and low light intensity resulting in highest survival rate (95 and 98.5%, respectively). Morphological traits investigation of numerous turmeric plants derived from *in vitro* culture did not differ with maternal plants.

**Keywords:** Turmeric, Propagation, Shoot-tip, Juvenile rhizome

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

[*]Corresponding author, e-mail: koarapatchaikol@gmail.com

## บทนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพร (Medicinal plant) ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนถึงกึ่งร้อน กระจายพันธุ์ปลูกอยู่ทั่วไปในประเทศเขตร้อน เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา เป็นต้น ประเทศที่เป็นผู้นำการผลิตได้แก่ อินเดีย ศรีลังกา และอินโดนีเซีย ส่วนประเทศไทยมีการปลูกเพื่อใช้ประกอบอาหารและใช้เป็นยาสมุนไพรภายในประเทศและมีส่วนน้อยที่ส่งออกไปยังต่างประเทศ พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคใต้เพราะมีสภาพอากาศเหมาะสม โดยการปลูกแซมในสวนยางพารา อาทิเช่น จังหวัดพัทลุง สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช พบว่าให้ผลผลิตที่มีเภสัชกรรมสารปริมาณมาก [1]

สารเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoid) ในเหง้าของขมิ้นชันที่มีสีเหลืองเป็นสารที่มีความสำคัญประกอบด้วยสารหลักคือ Curcumin รองลงมาได้แก่ Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin และสารอื่นๆ อีกหลายชนิด สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ต้านโรคต่างๆ ในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด ได้แก่ รักษาแผลไฟไหม้ (Thermal injury) ต้านมะเร็ง (Anti-cancer) ต้านอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ต้านเซลล์ชราภาพ (Anti-aging) และโรคอื่นๆ อีกหลายชนิด [2, 3] ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสำคัญกับพืชชนิดนี้เป็นอย่างมาก เพราะนอกจากใช้รักษาโรคได้หลายชนิดแล้วยังนำมาใช้ผสมอาหาร ทำสีและผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลายชนิด รวมทั้งทำส่วนผสมในเครื่องสำอางเกี่ยวกับผิวหนัง [4]

โดยปกติขมิ้นชันขยายพันธุ์โดยใช้เหง้าแก่ จึงมีโรคระบาดได้ง่ายและผู้ปลูกต้องเผชิญกับปัญหาค่าต้นพันธุ์ที่มีค่าใช้จ่ายสูง ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์มาใช้ได้ผลดีและประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด รวมทั้งไม้ดอกไม้ประดับและพืชสวน [5] ด้วยเหตุที่ความต้องการผลผลิตสูงขึ้นและประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ขมิ้นชันให้ได้ต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อปริมาณมากเพียงพอและมีคุณภาพสูง จึงศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน

มีรายงานการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชันไว้บ้างแล้วได้แก่ Mukhri และ Yamaguchi [6] เพาะเลี้ยงตาจากเหง้าโดยใช้อาหารสูตร MS [7] ที่เติม BAP (6-Benzyl amino purine) ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ทำให้เกิดต้นและราก ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ BAP สูงถึง 10 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. จะเกิดแคลลัสและเอ็มบริออยด์ (Embryoid) เมื่อเติม BAP ความเข้มข้น 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA 15 มก./ล. จะเกิดแคลลัส เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BAP ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. จะเกิดยอดจำนวนมาก ต่อมา Zapata และคณะ [8] เพาะเลี้ยงต้นที่ติดกับเหง้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.5 มก./ล. ชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาไปเป็นต้นบนอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ Kinetin เมื่ออนุบาลโดยวิธี Hydroponic system ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง หลังจากนั้น Rahman และคณะ [9] รายงานการเพาะเลี้ยงตาจากเหง้าของขมิ้นชันเช่นเดียวกับ Mukhri และ Yamaguchi [6] และพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล. ทำให้เกิดหน่อจำนวนมาก และเกิดรากในอาหารที่ลดปริมาณธาตุอาหารสูตร MS ลงกึ่งหนึ่งแล้วเติม NAA, IBA หรือ IAA 0.1-1.0 มก./ล. แต่ IBA ชักนำให้เกิดจำนวนรากและความยาวรากดีที่สุด ในปีเดียวกันนี้ Islam และคณะ [10] ได้รายงานว่าอาหารที่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 9 ให้ผลในการชักนำให้เกิดหน่อขมิ้นชันดีที่สุด และ NAA ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 12.0 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดหน่อใหม่ได้มากที่สุด ต่อมา Nayak และ Naik [11] เพาะเลี้ยงเหง้าหลักของขมิ้นชันในอาหารเหลวสูตร

MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ และน้ำตาลทรายร้อยละ 6 เกิดหน่อเล็กๆ (Micro-shoots) จำนวนมากบริเวณฐานของตาที่เพาะเลี้ยง จากการศึกษาผลผลิตเหง้าของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกจากเหง้าในธรรมชาติ พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ผลผลิตมากกว่า

รายงานการวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของขมิ้นชันยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง โดยมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อพัฒนาขั้นตอนและวิธีการ (Protocol) ในการขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยใช้เหง้าในสภาพปลอดเชื้อที่เหมาะสม สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมเกษตรได้อย่างแท้จริง ต่อมา Panda และคณะ [12] ได้พัฒนาขั้นตอนและวิธีการขยายพันธุ์ขมิ้นชัน โดยใช้ตาข้าง (Lateral bud) พบว่า ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. และไม่พบการกลายพันธุ์ของต้นขมิ้นชันที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า NAA ช่วยให้เกิดหน่อเพิ่มขึ้น แต่ Naz และคณะ [13] พบว่าการใส่ NAA ร่วมกับ BA จะส่งผลเสียทำให้จำนวนหน่อเกิดใหม่ลดลงอย่างชัดเจน และ TDZ (Thidiazuron) ชักนำให้เกิดหน่อใหม่ได้น้อยกว่า BA แสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจะส่งผลต่อการเกิดหน่อใหม่ของขมิ้นชัน ต่อมา Roopadarshini [14] ได้พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชันเศรษฐกิจสายพันธุ์ Suguna ได้สำเร็จ พบว่าอาหารสูตร LBSM ที่มี BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดหน่อจำนวนมาก ส่วนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดแคลลัสเนื้อแน่นสีขาวครีมจากตายอดและพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3.5 มก./ล. หน่อจะเกิดรากได้เองโดยไม่ต้องย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ และย้ายปลูกมีอัตรารอดตายร้อยละ 95

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเพาะเลี้ยงตายอดจากเหง้าอ่อนของขมิ้นชันที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุน ที่มีเนื้อเหง้าสีส้ม และอำเภอท่าชนะที่มีเนื้อเหง้าสีเหลือง เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ขมิ้นชันทั้งสองชนิดให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในเวลาสั้นเพื่อประยุกต์ใช้ทางการเกษตรต่อไป

## วิธีการทดลอง

### พืชทดลองและการเตรียมชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง

เก็บเหง้าขมิ้นชันสำหรับทดลองมาจากอำเภอบ้านตาขุนที่มีเนื้อเหง้าสีส้มและอำเภอท่าชนะที่มีเนื้อเหง้าสีเหลือง นำมาตัดเป็นท่อนๆ ให้มีตาติดอยู่ 2-3 ตา นำวางเรียงในกระบะดินให้มีระยะห่างพอเหมาะแล้วโรยดินผสมปุ๋ยคอก 1:1 กลบทับให้มิด วางเพาะในที่ร่ม หลังจากนั้นรดน้ำให้ชุ่มวันละครั้ง ประมาณ 2 เดือน จะมีหน่อขมิ้นชันเกิดขึ้น เมื่อหน่อยาวประมาณ 5-10 ซม.จึงตัดแยกมาใช้ทดลอง

### การฟอกฆ่าเชื้อ

ตัดแยกหน่อขมิ้นชันที่มีความยาวประมาณ 5-10 ซม. นำมาล้างทำความสะอาด แล้วใช้มีดตัดให้เหลือเฉพาะเหง้าอ่อนและตายาวประมาณ 2-4 ซม. ลอกกาบใบด้านนอกออกให้หมด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox) เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร นาน 10 นาที แล้วตามด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตัดตายอดให้ติดส่วนของเหง้าอ่อนมีความยาวไม่เกิน 10 มม. วางเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง

**อาหารเพาะเลี้ยง**

อาหารเพาะเลี้ยงใช้สูตร MS [7] บรรจุในขวดแก้วขนาด 4 ออนน์ ขวดละ 20 มล. ปรับค่ากรด-ด่างที่ 5.7 ด้วย HCl และ NaOH 1 N ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อ (Explants) ลงเพาะเลี้ยงแล้วนำไปวางเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

**การศึกษาผลของ BAP**

คัดเลือกหน่อที่มีความยาวใกล้เคียงกัน ตัดให้เหลือส่วนที่มีตายาวประมาณ 5 ซม. ลอกกาบใบออก นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร นาน 10 นาที แล้วตามด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากฆ่าเชื้อแล้วตัดตายอดให้ติดส่วนของเหง้าอ่อนมีความยาวประมาณไม่เกิน 5 มิลลิเมตร นำลงวางเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม Malt extract 100 มก./ล. และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ (0, 1.5, 3.5, 5.5 และ 7.5 มก./ล.) รวม 5 สูตร ทำการทดลองซ้ำสูตรละ 10 การทดลองเมื่อครบ 45 วัน บันทึกผลจำนวนตาที่เกิดหน่อและจำนวนหน่อที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งถ่ายภาพประกอบ

**การเพิ่มจำนวนหน่อโดยการย้ายเลี้ยง**

ศึกษาอัตราการเกิดหน่อโดยการย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมหลายๆ รุ่น โดยสุ่มเลือกหน่อที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงมาตัดแต่งให้เหลือส่วนของตาขนาดไม่เกิน 1 ซม. นำลงวางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Malt extract 100 มก./ล. และ BAP 3.5 มก./ล. ทำการย้ายเลี้ยงทุก 45 วัน รวม 10 ครั้ง ทำซ้ำชุดละ 10 การทดลองบันทึกผลจำนวนหน่อที่เกิดขึ้นในแต่ละเดือนก่อนย้ายเลี้ยง

**การชักนำให้เกิดรากด้วยผงถ่านกัมมันต์**

ตัดแยกหน่อขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงที่มีความยาว 5-10 ซม. นำลงเพาะเลี้ยงชักนำรากในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 100 มก./ล. โดยมีชุดที่ไม่เติมผงถ่านเป็นชุดควบคุม ทำซ้ำชุดละ 10 การทดลอง เมื่อครบกำหนด 30 วัน บันทึกผลจำนวนรากที่เกิดขึ้นแต่ละชุดทดลอง และถ่ายภาพประกอบ

**การอนุบาลและย้ายปลูก**

การอนุบาลและย้ายปลูกโดยนำมาทดลองอนุบาล 4 วิธี คือ I) ไม่ตัดใบและไม่ครอบด้วยถุงพลาสติกใส II) ไม่ตัดใบและครอบด้วยถุงพลาสติกใส III) ตัดใบและครอบด้วยถุงพลาสติกใส และ IV) ตัดใบและไม่ครอบถุงด้วยพลาสติกใส โดยนำหน่อขมิ้นชันที่มีรากและแข็งแรงดี นำมาล้างน้ำ เอาวุ้นที่ติดรากออกให้หมด เมื่อนำลงปลูกในกระถางขนาดเล็กที่มีดินผสมปุ๋ยคอกและปุ๋ยเคมีในอัตราส่วน 2:1:1 นำไปวางอนุบาลในที่ร่มมีแสงอ่อนๆ รดน้ำให้ชุ่มวันละครั้ง ทำการทดลองซ้ำ 10 การทดลองบันทึกอัตรารอดตายและลักษณะของต้นขมิ้นชันที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับต้นแม่

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

ข้อมูลเชิงปริมาณนำมาหาค่าร้อยละและหาค่าเฉลี่ย โดยใช้เทคนิค LSD (Least Significant Difference) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ส่วนข้อมูลเชิงคุณภาพใช้วิธีการพรรณนาเปรียบเทียบลักษณะจากการสังเกต

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

**การศึกษาผลของ BAP**

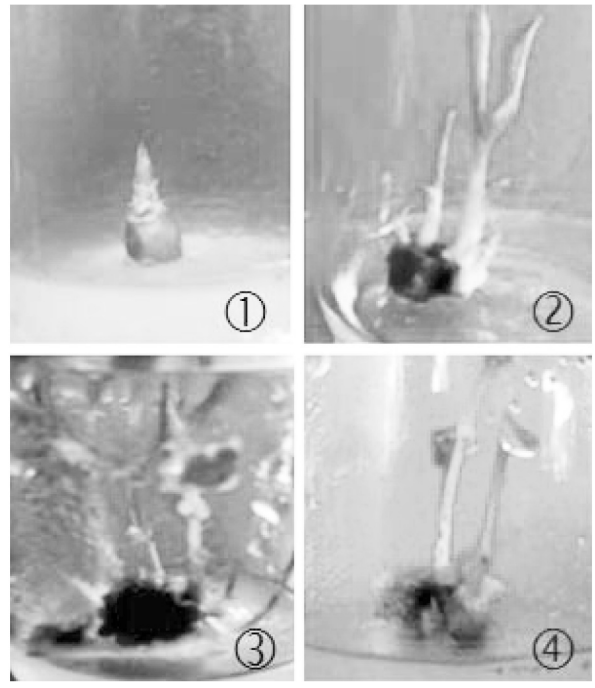
จากการทดลองนำตาขมิ้นชันทั้งสองชนิดลงเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม Malt extract 100 มก./ล. และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ รวม 5 สูตร (0, 1.5, 3.5, 5.5, 7.5 มก./ล.) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ตาขมิ้นชันตอบสนองต่อ BAP ได้ดี ทุกสูตรมีอัตราการตอบสนองร้อยละ 100 ยกเว้นสูตรที่เป็นชุดควบคุม ที่มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด ส่วนสูตรที่มีการตอบสนองดีที่สุดคือสูตรที่เติม BAP 3.5 มก./ล. มีปริมาณหน่อเฉลี่ยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกสูตร ที่ระดับ 0.05 โดยขมิ้นชันจากอำเภอบ้านตาขุนมีจำนวนหน่อเฉลี่ย 4.58 หน่อ ส่วนขมิ้นชันจากอำเภอท่าชนะมีหน่อเฉลี่ย 4.21 หน่อ แนวโน้มการชักนำให้เกิดหน่อของ BAP มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น ถ้าปริมาณ BAP ในอาหารเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้ปริมาณการเกิดหน่อใหม่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** การเกิดหน่อของขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน

| BAP (มก./ล.) | บ้านตาขุน | ท่าชนะ |
|---|---|---|
| 0 | $1.0^{d}$ | $0.7^{d}$ |
| 1.5 | $3.04^{b}$ | $2.42^{b}$ |
| 3.5 | $4.58^{a}$ | $4.21^{a}$ |
| 5.5 | $2.17^{c}$ | $2.08^{b}$ |
| 7.5 | $1.42^{d}$ | $1.32^{c}$ |

$LSD_{05}$ ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

ในช่วง 20 วันแรกหลังจากเพาะเลี้ยง พบว่าตาขมิ้นชันมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหลังจากวันที่ 20 อย่างชัดเจน โดยจะเห็นหน่อเล็กๆ ปรากฏขึ้นมาในช่วงวันที่ 21-30 และจะยืดยาวออกมาอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 30-45 โดยเฉพาะในอาหารสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.5 มก./ล. จะเห็นการแผ่ของใบและมีหน่อเล็กๆ หลายหน่อโผล่ออกมาจากด้านข้างรอบๆ ตา ส่วนสูตรที่เติม BAP ความเข้มข้นสูง (5.5 และ 7.5 มก./ล.) จะเกิดหน่อน้อยและหน่อมีลักษณะอวบสั้นเจริญเติบโตช้า นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 60 วัน หน่อเล็กๆ จะเกิดรากขึ้นได้เองเกือบทุกสูตร แต่จากการประเมินเปรียบเทียบเบื้องต้นด้วยการสังเกตพบว่าแต่ละสูตรเกิดปริมาณรากแตกต่างกัน สูตรที่เจริญเติบโตดีจะมีปริมาณรากมาก ส่วนสูตรอาหารที่เป็นชุดควบคุม (ไม่เติม BAP) การเจริญเติบโตจะมีน้อยและไม่มีหน่อใหม่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 1




**ภาพที่ 1** ลักษณะการเกิดหน่อของขมิ้นชันที่เก็บเหง้ามาจากอำเภอบ้านตาขุนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน, 0 มก./ล. ①, 1.5 มก./ล. ②, 3.5 มก./ล. ③ และ 5.5 มก./ล. ④

จากผลการทดลองตัดตาขมิ้นชันลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า BAP สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มหน่อจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเข้มข้น 3.5 มก./ล. เกิดหน่อเฉลี่ยมากที่สุด ถ้าความเข้มข้น BAP สูงขึ้นจะมีแนวโน้มยับยั้งการเกิดหน่อ ผลการทดลองจึงมีความสอดคล้องกับรายงานของ Balachandran และคณะ [15] ที่ทดลองนำตาขมิ้นชันลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ทำให้เกิดหน่อเฉลี่ยมากที่สุด เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับความเข้มข้นของ BAP น้อยจะกระตุ้นให้เกิดหน่อได้น้อย และที่ความเข้มข้นเหมาะสมระดับหนึ่งจะชักนำให้เกิดหน่อได้มากที่สุด แต่ถ้าความเข้มข้นมากเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงและทำให้ปริมาณหน่อหรือยอดเกิดใหม่ลดลงและอาจจะทำให้เกิดความผิดปกติมากขึ้น [16, 17] เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินจะชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของตาข้าง (Lateral buds) และกระตุ้นแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นพืชได้แต่ต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม ดังรายงานผลการทดลองในถั่วพุ่ม [18, 19, 20] กล้วยเล็บมือนางและกล้วยสา [21] ยาสูบ [7] ข้าว [22] และหม่อน [23] เมื่อเปรียบเทียบผลของ BAP ต่อการเกิดหน่อของขมิ้นชันทั้งสองชนิด พบว่ามีแนวโน้มไปในทำนองเดียวกัน

**การเพิ่มจำนวนหน่อโดยการย้ายเลี้ยง**

การทดลองย้ายเลี้ยงตาของขมิ้นชันทั้งสองแหล่งตัวอย่างไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.5 มก./ล. ไป 10 รุ่น รุ่นละ 45 วัน เพื่อประมวลความสามารถในการเกิดหน่อ พบว่ากลุ่มตาขมิ้นชันดังกล่าวสามารถสร้างหน่อใหม่ได้ดีในรุ่นที่ 1 เท่านั้น ส่วนรุ่นที่ 2-8 การเกิดหน่อมีแนวโน้มลดลงและแตกต่างจากรุ่นที่หนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยเฉพาะอย่างยิ่งตั้งแต่รุ่นที่ 3-10 มีอัตราการเกิดหน่อค่อนข้างต่ำ โดยที่ขมิ้นชันทั้งสองแหล่งมีแนวโน้มไปในทำนองเดียวกัน (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับผลการทดลองใน *Balanites aegyptiaca* L. (Del.) [24] ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการสะสมของ BAP ในต้นพืชมากเกินไปทำให้เกิดยอดลดลง [25]

**ตารางที่ 2** การเกิดหน่อของขมิ้นชันทั้งสองชนิดที่ย้ายเลี้ยง 10 รุ่น แต่ละรุ่นเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3.5 มก./ล. นาน 45 วัน

| รุ่นที่ย้ายเลี้ยง | จำนวนหน่อ ($\overline{X}$) | |
|---|---|---|
| | บ้านตาขุน | ท่าชนะ |
| 1 | 4.22[a] | 4.43[a] |
| 2 | 3.14[b] | 3.62[b] |
| 3 | 2.52[c] | 2.33[c] |
| 4 | 2.15[c] | 2.51[c] |
| 5 | 2.24[b] | 2.45[c] |
| 6 | 2.71[c] | 2.61[c] |
| 7 | 2.54[c] | 2.45[c] |
| 8 | 2.86[c] | 2.81[c] |
| 9 | 2.38[c] | 2.27[c] |
| 10 | 2.61[c] | 2.56[c] |

$LSD_{05}$ ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

**การศึกษาผลของผงถ่านต่อการเกิดราก**

จากการสังเกตพบว่าหน่อที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงสามารถเกิดรากได้เองในอาหารที่ชักนำให้เกิดหน่อ ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้นต่ำๆ แต่ต้องเพาะเลี้ยงไว้โดยไม่ย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานไม่น้อยกว่า 45 วัน การปล่อยให้เกิดรากเองในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เสียเวลานานเกินไปกว่าจะได้ต้นขมิ้นชันที่มีรากสมบูรณ์เพื่อย้ายปลูกลงดิน จากการทดลองนำหน่อขมิ้นชันทั้งสองพันธุ์ที่เกิดขึ้นลงเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 100 มก./ล. เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมผงถ่าน โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงไปช่วยให้เกิดราก พบว่าอาหารที่เติมผงถ่านสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าอาหารที่ไม่

เติมผงถ่าน หน่อที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมผงถ่านเกิดรากช้าและน้อยกว่า ลักษณะรากที่เกิดขึ้นในอาหารที่ผสมผงถ่านจะเจริญดีมีรากฝอยจำนวนมาก รากไม่เจริญกระจายขึ้นข้างบนและมีทิศทางตามแนวแรงโน้มถ่วงของโลก (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** การเกิดหน่อของขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน

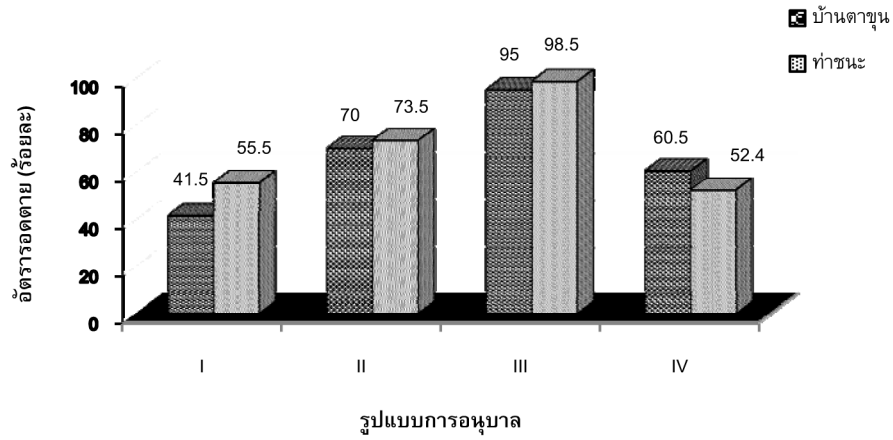
| ปริมาณผงถ่าน (มก./ล.) | จำนวนราก ($\overline{X}$) | |
|---|---|---|
| | อำเภอบ้านตาขุน | อำเภอท่าชนะ |
| 0 | $3.42^{b}$ | $3.55^{b}$ |
| 100 | $7.22^{a}$ | $6.81^{a}$ |

$LSD_{05}$ ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

จากผลการทดลองพบว่า ต้นกล้าขมิ้นชันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดมีลักษณะเหมือนพืชที่มีลำต้นใต้ดินหรือเหง้าชนิดอื่นๆ เช่น กล้วย เป็นต้น กล่าวคือสามารถเกิดรากได้เองในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้น [21] แต่การเกิดรากได้เองของขมิ้นชันต้องใช้เวลานาน การใช้สารอื่นๆ เติมลงในอาหารชักนำรากจะช่วยให้เกิดรากเร็วและปริมาณมาก ดังเช่นรายงานของ Rahman และคณะ [9] ที่พบว่า NAA, IBA และ IAA ความเข้มข้น 0.1-1.0 มก./ล. ชักนำให้หน่อขมิ้นชันเกิดรากอย่างรวดเร็วและคุณภาพดี นอกจากนี้ การชักนำรากโดยเก็บไว้ที่มืดระยะเวลาหนึ่งก่อนย้ายมาเลี้ยงในที่มีแสง ทำให้เกิดรากได้ดีกว่าการชักนำรากในที่มีแสง [26] ส่วนผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการใส่ผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้เกิดรากจำนวนมากและมีคุณภาพดี [27, 28] อาจเนื่องจากผงถ่านมีสีดำรากพืชจึงเจริญเข้าหาและช่วยดูดซับสารพิษต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการนึ่งฆ่าเชื้อหรือชิ้นส่วนพืชปล่อยออกมา และเพิ่มระดับ pH ทำให้เกิดรากได้มากขึ้น [29, 30]

**การอนุบาลและย้ายปลูกลงดิน**

ต้นกล้าขมิ้นชันที่เกิดรากสมบูรณ์แข็งแรงดีแล้ว เมื่อนำมาล้างน้ำเอาวุ้นออกจากรากหมดแล้วนำไปทดลองอนุบาลเปรียบเทียบ 4 วิธี พบว่าวิธีการตัดใบครึ่งใบร่วมกับครอบถุงพลาสติกใสมีต้นกล้าขมิ้นชันรอดตายมากที่สุด ทั้งต้นขมิ้นชันที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุน (95%) และอำเภอท่าชนะ (98.5%) ส่วนต้นกล้าขมิ้นชันที่อนุบาลโดยการไม่ตัดใบและไม่ครอบถุงพลาสติกใสมีอัตรารอดตายต่ำสุด (ภาพที่ 2) เมื่อย้ายลงปลูกในกระถางที่ผสมดิน ปุ๋ยคอกและปุ๋ยเคมี ในสัดส่วน 2:1:1 วางกระถางไว้ในเรือนเพาะชำให้น้ำอย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง หลังจากนั้น 2-3 เดือน ต้นขมิ้นชันจะปรับตัวเจริญเติบโตแข็งแรงดีมีการแตกหน่อรอบๆ ต้นเดิมจำนวนมาก (ภาพที่ 3)




**ภาพที่ 2** เปรียบเทียบอัตรารอดของต้นกล้าขมิ้นชันจากการเพาะเลี้ยงตายอดหลังจากอนุบาล 4 วิธี I) ไม่ตัดใบและไม่ครอบด้วยถุงพลาสติกใส II) ไม่ตัดใบและครอบด้วยถุงพลาสติกใส III) ตัดใบและครอบด้วยถุงพลาสติกใส และ IV) ตัดใบและไม่ครอบถุงด้วยพลาสติกใส

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานพบว่า ต้นขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงตายอดจากเหง้าอ่อน ที่มีการย้ายเลี้ยงถึง 10 รุ่น ไม่พบความแตกต่างจากต้นขมิ้นต้นเดิม เมื่อนำลงปลูกในแปลงพบว่าต้นที่เกิดจากต้นแม่จากอำเภอท่าชนะเนื้อของเหง้ายังคงมีสีเหลืองและต้นแม่ที่เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอบ้านตาขุนยังคงมีสีเนื้อของเหง้าสีส้มเหมือนเดิม

**ภาพที่ 3** ต้นขมิ้นชันอายุ 2 เดือน ที่ปลูกลงกระถางดินเกิดจากการเพาะเลี้ยงเหง้าอ่อนของขมิ้นชันที่เก็บพืชตัวอย่างมาจากอำเภอท่าชนะ

มีหลายวิธีที่ใช้ในการอนุบาลต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะการอนุบาลก่อนการย้ายปลูกลงดินมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการรอดตายของต้นพืช สาเหตุเพราะต้นพืชที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงมีความชื้นสูงและอาหารอุดมสมบูรณ์เป็นอย่างยิ่ง โดยปกติการย้ายต้นพืชออกปลูก ต้นพืชต้องการเวลาสำหรับปรับตัว 2-3 สัปดาห์ สำหรับการอนุบาลให้ปรับตัวเข้ากับสภาพความชื้นในอากาศที่น้อยกว่า [31, 32] เพื่อป้องกันการเหี่ยวอย่างฉับพลันจากการสูญเสียน้ำ เพราะปัญหาการลำเลียงน้ำและระบบการเชื่อมต่อของท่อลำเลียง [33] ซึ่งเรื่องนี้ Pospisilova และคณะ [34] ทำการอนุบาลอย่างมีระบบที่ดีจะช่วยให้ต้นพืชแข็งแรงเร็วขึ้นโดยการลดการคายน้ำ อาจจะใช้ ABA หรือการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงโดยการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดลองดังกล่าวจึงสอดคล้องกับการตัดบางส่วนของใบขมิ้นชันจะช่วยลดอัตราการคายน้ำทางปากใบและการครอบด้วยถุงพลาสติกใสทำให้ควบคุมระดับความชื้นในถุงไว้ได้ ทำให้ขมิ้นชันที่อนุบาลมีอัตรารอดมากกว่าวิธีการอนุบาลโดยวิธีอื่นๆ ซึ่งใช้หลักการเดียวกับรายงานข้างต้นและการอนุบาลต้นกล้าของ *Garcinia indica* Chois [35] และ *Gloriosa superba* L. [36]

## สรุปผลการทดลอง

1. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม Malt extract 100 มก./ล. และ BAP 3.5 มก./ล. ชักนำให้ตายอดขมิ้นชันจากเหง้าอ่อนเกิดหน่อมากที่สุด เหมาะสมที่จะใช้เพาะเลี้ยงเพื่อสร้างต้นพันธุ์ขมิ้นชัน

2. การย้ายเลี้ยงหน่อขมิ้นชันต่อเนื่องไปหลายๆ รุ่น จะทำให้อัตราการเกิดหน่อแต่ละรุ่นลดลง

3. หน่อขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจากตายอดสามารถเกิดรากได้เอง แต่การเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดรากจำนวนมากและมีคุณภาพดี เมื่ออนุบาลและย้ายปลูกจะมีอัตรารอดตายสูง

4. ขมิ้นชันที่เก็บตัวอย่างจากอำเภอบ้านตาขุนและอำเภอท่าชนะ มีการตอบสนองต่อการเกิดหน่อ การเกิดราก การอนุบาลและย้ายปลูกไม่แตกต่างกัน

5. ต้นกล้าขมิ้นชันที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงตายอดจากเหง้าอ่อน มีลักษณะทางสัณฐานปกติไม่แตกต่างจากต้นแม่

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี หมวดเงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2555

## เอกสารอ้างอิง


1. ชูลีรัตน์ คงเรือง และ อนุวัต สงสม. 2547. การผลิตและการตลาดขมิ้นชันและผลิตภัณฑ์ในตำบลลานข่อย อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง. รายงานวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ 2547.
2. Surh, Y.J. and Chun, K.S. 2007. Cancer Chemopreventive Effects of Curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 595: 149-172.
3. Palve, Y.P. and Nayak, P.L. 2012. Curcumin: A Wonder Anticancer Drug. *International Journal of pharma and bio sciences.* 3: 60-69.
4. ธนภร อำนวยกิจ. 2009. เวชสำอาง. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 4: 94-110.*
5. Torres, K.C. 1988. Tissue Techniques for Horticulture Crops. Van Nostrand, Reinhold, New York.
6. Mukhri, T. and Yamaguchi, H. 1986. *In vitro* Plant Multiplication from Rhizomes of Turmeric (*Curcuma domestica* Val.) and Ternoe Lawak (*C. xanthorhiza* Roxb.). Plant Tissue Culture Letters. 3: 28-30.
7. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revise Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum.* 15: 417-473.
8. Zapata, E.V., Morales, G.S., Lauzardo, A.N,H., Bonfil, B.M., Tapia, G.T., Sanchez, A.D.J., Valle, M.V.D. and Aparicio, A.J. 2003. *In vitro* Regeneration and Acclimatization of Plants of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in a Hydroponic System. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 20: 25-31.
9. Rahman, M.M., Amin, M.N., Jahan, H.S. and Ahmed, R. 2004. *In vitro* Regeneration of Plantlets of *Curcuma longa* L. a Volume Spice Plant of Bangladesh. Asian J*ournal of Plant Sciences.* 3: 306-609.
10. Islam, M.A., Kloppstech, K. and Jacobsen, H.J. 2004. Efficient Procedure for *in vitro* Microrhizome Induction in *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae)-A Medicinal Plant of Tropical Asia. *Plant Tissue Culture* and *Biotechnology.* 14:123-134.
11. Nayak, S. and Naik, P.K. 2006. Factors Affecting *in vitro* Microrhizome Formation and Growth *in Curcuma longa* L. and Improved Field Performance of Micropropagated Plants. *ScienceAsia.* 32: 31-37.
12. Panda, M.K., Mohanty, S., Subudhi, E., Acharya, L. and Nayak, S. 2007. Assessment of Genetic Stability of Micropropagated Plants of *Curcuma longa* by Cytophotometry and RAPD Analyses. *International Journal of Integrative Biology.* 1: 189-195.

13. Naz, S., Ilyas, S., Javad, S. and Ali, A. 2009. *In vitro* Clonal Multiplication and Acclimatization of Different Varieties of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pakistan Journal of Botany.* 41: 2807-2816.
14. Roopadarshini, V. 2010. High Frequency Shoots Multiplication and Callus Regeneration of Turmeric. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry.* 6: 723-733.
15. Balachandran, S.M., Bhat, S.R. and Chandel, K.P.S. 1990. *In vitro* Clonal Multiplication of Turmeric (*Curcuma* spp.) and Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Reports.* 8: 521-524.
16. Jafari, N., Othman, R.Y. and Khalid, N. 2011. Effect of Benzylaminopurine (BAP) Pulsing on *in vitro* Shoot Multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. *African Journal of Biotechnology.* 10: 2446-2450.
17. Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V. and Bhagyalakshmi, N. 2007. Micropropagation in Banana using High Levels of Cytokinins does not Involve any Genetic Changes as Revealed by RAPD and ISSR Markers. *Plant Growth Regulation.* 51: 192-205.
18. Tie, M., Luo, Q., Zhu, Y. and Li, H. 2013. Effect of 6-BA on the Plant Regeneration *via* Organogenesis from Cotyledonary Node of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Journal of Agricultural Science.* 5: 1-5.
19. Tang, Y., Chen, L., Li, X.M., Li, J., Luo, Q., Lai, J. and Li, H.X. 2012. Effect of Culture Conditions on the Plant Regeneration *via* Organogenesis from Cotyledonary Node of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *African Journal of Biotechnology.* 11: 3270-3275.
20. Raveendar, S., Premkumar, A., Sasikumar, S., Ignacimuthu, S. and Agastian, P. 2009. Development of a Rapid Highly Efficient System of Organogenesis in Cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *South African Journal of Botany.* 75: 17-21.
21. Srangsam, A. and Kanchanapoom, K. 2007. Establishment of *in vitro* Culture of *Musa* AA Group 'Kluai Sa' and Musa AA group 'Kluai Leb Mue Nang' and the Analysis of Ploidy Stability. *ScienceAsia.* 33: 437-442.
22. Ramesh, M., Murugiah, V. and Gupta, A.K. 2009. Efficient *in vitro* Plant Regeneration *via* Leaf Base Segments of Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology.* 47: 68-74.
23. Anis, M., Faisal, M. and Singh, S.K. 2003. Micropropagation of Mulberry (*Morus alba* L.) Through *in vitro* Culture of Shoot Tip and Nodal Explants. *Plant Tissue Culture.* 13: 47-51.
24. Siddique, I. and Anis, M. 2009. Direct Plant Regeneration from Nodal Explants of *Balanites aegyptiaca* L. (Del.): A Valuable Medicinal Tree. *New Forests.* 37: 53-62.

25. Albarello, N.C.S., Rosas, P.F.G., de Castro, T.C., Gianfaldoni, M.G., Callado, C.H., Mansur, E. 2006. *In vitro* Propagation of *Cleome spinosa* (Capparaceae) using Explants from Nursery-Grown Seedlings and Axenic Plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 42: 601-606.
26. Cheong, E. and Pooler, M.R. 2003. Micropropagation of Chinese redbud *(Cercis yunnanensis)* through Axillary Bud Breaking and Induction of Adventitious Shoots from Leaf Pieces. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 39: 455-458.
27. Sharma, T., Modgil, M. and Thakur, M. 2007. Factors Affecting Induction and Development of *in vitro* Rooting in Apple Rootstocks. *Indian Journal Experimental Biology.* 45: 824-829.
28. Bivadi, V., Zakaria, R.A., Zare, N. and. Yazdani, B. 2014. Effects of Different Tissue Culture Conditions in Hairy Roots Induction in *Hypericum perforatum* L., *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* 8: 597-604.
29. Smith, D.L and Kirkorian, A.D. 1990. Somatic Proembryo Production from Excised, Wounded Zygotic Carrot Embryos on Hormone-Free Medium: Evaluation of the Effects of pH, Ethylene and Activated Charcoal. *Plant Cell Reports.* 9: 468-470.
30. Weatherhead, M.A., Burdon, J. and Henshaw, G.G. 1979. Some Effects of Activated Charcoal as an Additive to Plant Tissue Culture Media. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie.* 89: 141-147.
31. Preece, J.E. and Sutter, E.J. 1991. Acclimatization of Micropropagated Plants to the Greenhouse and Field. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Ed.) Micropropagation Technology and Application London: Kluwer Academic. 71-93.
32. Bolar, J.P., Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. and Hanke, V. 1998. An Efficient Method for Rooting and Acclimation of Micropropagated Apple Cultivars. *HortScience.* 37: 1251-1252.
33. Fila, G., Ghashghaie, J., Hoarau, J. and Cornic, G. 1998. Photosynthesis, Leaf Conductance and Water Relations of *in vitro* Cultured Grapevine Rootstock in Relation to Acclimatization. *Physiologia Plantarum.* 102: 411-418.
34. Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlecek, P., Haisel, D. and Plzakova, S. 1999. Acclimatization of Micropropagated Plants to *ex vitro* Conditions. *Biologia Plantarum.* 42: 481-497.
35. Chabukswar M. M., Deodhar M. A. 2005. Rooting and Hardening of *in vitro* Plantlets of *Garcinia indica* Chois. *Indian Journal of Biotechnology.* 4: 409-413.
36. Sayeed, H. and Roy, S.K. 2005. Micropropagation of *Gloriosa superba* L. through High Frequency Shoot Proliferation. *Plant Tissue Culture.* 15: 67-74.

*ได้รับบทความวันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2558*
*ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 31 มีนาคม 2558*