THAI JOURNAL OF BOTANY 4 (Special Issue): 87-92. 2012.

วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 4 (ฉบับพิเศษ): 87-92. 2555.

ผลของไซโตไคนินและออกซินต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงขมิ้นขาว (*Curcuma mangga* Valeton & Zijp.)

Effect of Cytokinins and Auxins on Development of *Curcuma mangga* Valeton & Zijp. Cultured *in vitro*

พันธิตรา กมล อุรัสยาน์ บูลย์ประมุข* และ อนุพันธ์ กงบังเกิด
PUNTITRA KAMOL, URASSAYA BOONPRAMUK* & ANUPAN KONGBANGKERD

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000
Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

บทคัดย่อ. จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาว (*Curcuma mangga* Valeton & Zijp.) ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige & Skoog (MS) (1962) ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA, Kinetin (Kn) และ TDZ ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0 และ 5.0 mg/l ตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kn ความเข้มข้น 5.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด (2.7 ยอดต่อชิ้นส่วน) และจำนวนรากมากที่สุด (7.3 รากต่อชิ้นส่วน) และการทดลองเพาะเลี้ยงต้นบนอาหาร MS ที่เติม NAA (0, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/l) ร่วมกับ BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 mg/l) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงสุด (3.6 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากได้สูงสุด (8.2 รากต่อชิ้นส่วน) โดยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนสามารถชักนำให้เกิดความยาวยอดและจำนวนใบสูงสุด

ABSTRACT. *In vitro* shoot culture of *Curcuma mangga* Valeton & Zijp. was conducted on Murashige & Skoog (MS) (1962) semi–solid basal medium supplemented with various concentrations (0, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/l) of BA, Kinetin (Kn) and TDZ for eight weeks. The results indicated that the highest number of shoots (2.7 shoots per explant) and roots (7.3 roots per explant) could obtain when cultured on medium with 5.0 mg/l Kn. *In vitro* morphogenesis of cultured shoots was also performed on MS medium with a combination of NAA (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l) and BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/l) for eight weeks. The results showed that

*Corresponding author: pigadika@hotmail.com

the highest shoots number (3.6 shoots per explant) was obtained when cultured on medium with 2.0 mg/l BA only, whereas the highest roots induction number (8.2 roots per explant) were found on medium with 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA. However, the highest shoot length and leave number were found on MS with no hormone.

คำสำคัญ: ขมิ้นขาว, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ,ไซโตไคนิน
Keywords: *Curcuma mangga* Valeton & Zijp., Micropropagation, Cytokinin

บทนำ

ขมิ้นขาว (*Curcuma mangga* Valeton & Zijp.) จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน ลำต้นและใบเหมือนกับขมิ้น เหง้าใต้ดินมีสีขาว มีกลิ่นหอม เจริญเติบโตฤดูฝน และพักตัวฤดูแล้ง มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขมิ้นขาวนอกจากจะใช้ประกอบอาหารแล้ว ยังเป็นยาสมุนไพรมีคุณสมบัติรักษาโรค เช่น รักษาแผลในลำไส้ ขับลม ระงับเชื้อ รักษาโรคผิวหนัง เป็นยาบำรุง ขับปัสสาวะ บรรเทาอาการท้องขึ้น และรักษาไข้ผอมเหลือง ปัจจุบันมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นขาว พบว่า มีสารในกลุ่ม Curcumanggoside ซึ่งพบเฉพาะในขมิ้นขาว และสารในกลุ่มต่างๆ เช่น scopolitin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และสาร curcumin ซึ่งนอกจากจะใช้ในทางยาแล้วยังใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลายชนิดด้วย (Abas *et al.*, 2005) สำหรับการขยายพันธุ์ขมิ้นขาวในธรรมชาติทำได้เพียงปีละครั้งเท่านั้น รวมทั้งมีระยะการพักตัวจึงทำให้การขยายพันธุ์จำนวนน้อย และอาจมีปัญหาเรื่องการติดเชื้อโรคได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถขยายพันธุ์ขมิ้นขาวได้จำนวนมากและปลอดโรค ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดจำนวนยอดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีการทดลอง

นำชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาวอายุ 2 เดือน ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดใบและรากออกให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แปรผันระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของขมิ้นขาวในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาวที่แตกออกจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงตาเหง้า มาตัดใบและรากออกให้มีความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ BA, Kn และ TDZ ซึ่งแปรผันความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 5.0 mg/l เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และสูตรที่ไม่เติมฮอร์โมนเป็นสูตรควบคุม

การทดลองที่ 2 ผลของไซโตไคนินร่วมกับออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาขมิ้นขาว

นำชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาวที่ได้จากการชักนำจากตายอดบนเหง้า ทำการตัดรากและใบออก

ให้มีความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0, 2.0 และ 5.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 mg/l เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในทุกการทดลองจะวางเลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุม คือ ความเข้มแสง 30 μmol $m^{-2}s^{-1}$ อุณหภูมิ 25±2°C ช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

การบันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ การสร้างยอดและรากใหม่ และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ จำนวน 30 ซ้ำต่อหน่วยการทดลอง โดยการทดลองที่ 1 วางแผนแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) การทดลองที่ 2 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นขมิ้นขาว เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในการชักนำให้เกิดยอดนั้น ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม Kn ความเข้มข้น 5.0 mg/l สามารถชักนำให้จำนวนยอดเฉลี่ยได้สูงสุด คือ 2.7 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่สูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ทุกความเข้มข้น ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดใหม่ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสูตรที่เติม Kn ความเข้มข้น 5.0 mg/l (ภาพที่ 1) ลักษณะของยอดใหม่ที่ได้จากการชักนำมีลักษณะสมบูรณ์ คือ ลำต้นเทียมและใบสีเขียว และรากสีขาวโคนสีเขียว (ภาพที่ 2 ข) ถึงแม้ว่าสูตรอาหารที่เติม Kn ที่ความเข้มข้น 5.0 mg/l จะสามารถชักนำให้มีจำนวนยอดและรากเฉลี่ยได้มากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดพบว่า ไม่มีความสม่ำเสมอ ซึ่งเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่เติม BA พบว่า เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นจะมีแนวโน้มชักนำให้มีจำนวนยอดและจำนวนรากเพิ่มขึ้นด้วย รวมทั้งได้ต้นใหม่ที่มีความสมบูรณ์ (ภาพที่ 1 และ 2 ค) ดังนั้นการทดลองที่ 2 จึงเลือกที่จะนำฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 3.6 ยอดต่อชิ้นส่วน (ภาพที่ 3 และ 4 ข) ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 1.0 mg/l สามารถชักนำให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 8.2 รากต่อชิ้นส่วน (ภาพ 3 และ 4 ค) ซึ่งทั้งสองสูตรอาหารให้ลักษณะยอดใหม่ที่สมบูรณ์เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม (ภาพที่ 4 ก) และสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ร่วมกับ NAA เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำจำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนราก และจำนวนใบลดลง ลักษณะของลำต้นผิดปกติ โดยเฉพาะที่อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นสูงๆ (2.0-5.0 mg/l) จะมีลักษณะลำต้นไม่ยืดยาว มีสีเหลืองอมเขียว ใบคลี่จากบริเวณรอยตัด รากไม่เจริญ และพบลักษณะอาการฉ่ำน้ำในบางต้นอีกด้วย (ภาพที่ 4 ง)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาวบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ BA, Kn และ TDZ เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุมที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน พบว่าอาหารสูตรที่เติม BA 1.0, 2.0 และ Kn 5.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารสูตรที่เติม Kn มีแนวโน้มให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ Kn 5.0 mg/l ให้จำนวนยอด 2.73 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะเดียวกันก็สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากได้สูงสุดเช่นเดียวกัน คือ 7.27 รากต่อชิ้นส่วน สำหรับอาหารสูตรที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้น พบว่าชิ้นส่วนมีลักษณะบวมพอง มีการเกิดยอดและรากใหม่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมและสูตรที่เติม BA และ Kn ทั้งนี้เนื่องจาก TDZ มีฤทธิ์แรง เพราะเป็นไซโตไคนินในกลุ่ม phenylureas ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายไซโตไคนินในพืช ทำให้ TDZ ถูกทำลายได้ช้าด้วยเอนไซม์ cytokinin oxidases (เอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อกำจัดไซโตไคนินที่เกินความจำเป็น) ทำให้ TDZ มีความเสถียรและออกฤทธิ์คล้าย adenine-type cytokinins ในความเข้มข้นต่ำ TDZ จึงมีประสิทธิภาพสูง (Mok *et al.,* 1987) แต่ในความเข้มข้นสูงก็จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของพืชด้วย

แม้ว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นทั้งยอดและรากนั้นต้องการทั้งฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสม แต่ในทางปฏิบัตินั้นพบว่ารายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ส่วนใหญ่มีการเติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว โดยไม่ต้องเติมออกซินก็สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดได้ดี เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชสามารถสร้างออกซินได้เองในปริมาณที่เพียงพอจึงไม่ต้องการออกซินเพิ่มจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (อนุพันธ์ กงบังเกิด, 2547) จากการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาว บนอาหารสูตรที่เติม NAA ร่วมกับ BA พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA 2.0 mg/l เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (3.61 ยอดต่อชิ้นส่วน) และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (5.0 mg/l) จะชักนำให้จำนวนยอดและจำนวนรากลดลง แต่มีแนวโน้มชักนำให้เกิดตายอดเพิ่มขึ้น ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด (8.19 รากต่อชิ้นส่วน) การเติม NAA ร่วมกับ BA เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จะมีแนวโน้มทำให้จำนวนยอดและจำนวนรากลดลง ตามความเข้มข้นของ NAA และ BA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยของอนุพันธ์ กงบังเกิด และ พันธิตรา กมล (2549), Nayak (2000) และ Rahman *et al.* (2004) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุลกระเจียว โดยใช้อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 2.0-5.0 mg/l เพื่อชักนำเพิ่มจำนวนยอดใหม่ได้มากที่สุด และจากการทดลองชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดความยาวยอดและจำนวนใบได้สูงสุด

เอกสารอ้างอิง

อนุพันธ์ กงบังเกิด. 2547. **เอกสารประกอบการเรียนวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

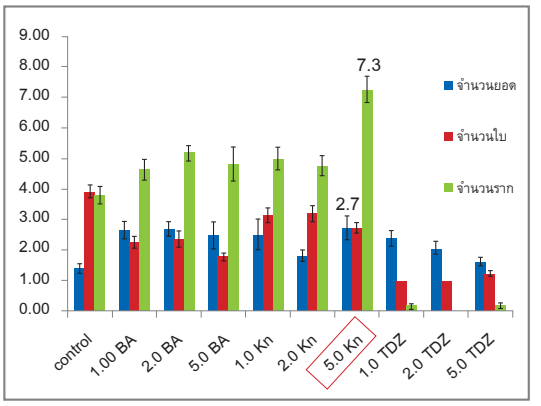
อนุพันธ์ กงบังเกิด และ พันธิตรา กมล. 2549. ผลของไซโทไคนินและออกซินต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกระเจียวขาว. **NU Science Journal** 2(2): 183-201.

Abas, F., Lajis, N.H., Shaari, K., Israf, D.A. & Stanslas, J. 2005. A labdane diterpene glucoside from the rhizomes of *Curcuma mangga*. **Journal Natural Product** 68(7): 1090-1093.

Mok, M., Mok, D., Turner, J. & Mujer, C. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience** 22(6): 1194-1197.

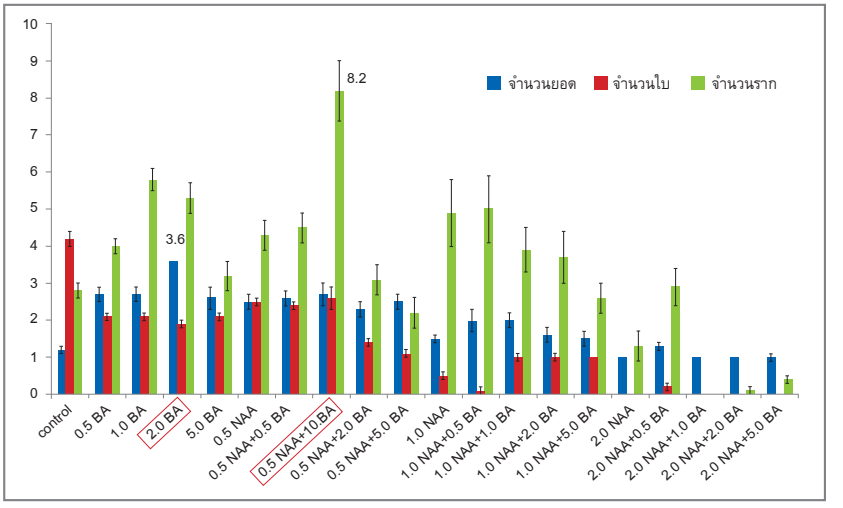
Nayak, S. 2000. *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb. **Plant Growth Regulation** 32: 41-47.

Rahman, M.M., Amin, M.N., Jahan, H.S. & Ahmed, R. 2004. *In vitro* Regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. A valuable spice plant in Bangaladesh. **Asian Journal of Plant Science** 3(3): 306-309.

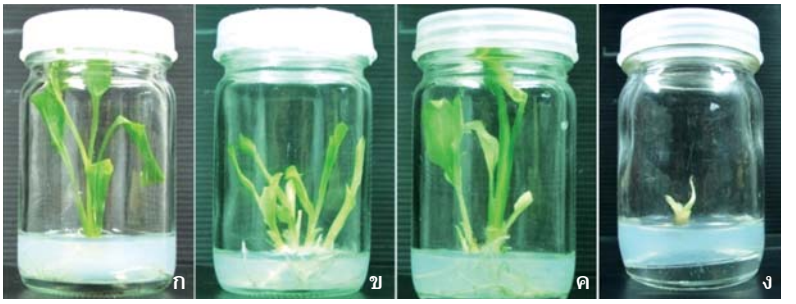


ภาพที่ 1 จำนวนยอด ใบ และรากเฉลี่ยของขมิ้นขาวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA, Kn และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ อายุ 8 สัปดาห์

ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของขมิ้นขาวบนอาหารสูตรต่างๆ ก. อาหารสูตรควบคุม; ข. อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม Kn ความเข้มข้น 5.0 mg/l; ค. อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 5.0 mg/l



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนทางสัณฐานวิทยาของขมิ้นขาวบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของขมิ้นขาวบนอาหารสูตรต่างๆ ก. อาหารสูตรควบคุม; ข. อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 mg/l; ค. อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 mg/l; ง. อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 5.0 mg/l