รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย :** การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** : พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์
   กิจกรรม : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในกระทือ

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :** การขยายพันธุ์กระทือด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Temporary Immertion Systems in Zingiber Micropropagation

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :	นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน :	นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวนาตยา ดำอำไพ	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

กระทือเป็นพืชตระกูลขิงอยู่ในสกุล Zingiber ใช้ประโยชน์เป็นอาหาร พืชสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับ กำลังได้รับความนิยมเป็นไม้ตัดดอก เพราะใบประดับที่เหมือนดอกมีรูปทรงแปลกตา สีสวยงาม นิยมขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ ทำให้ขยายพันธุ์ได้ช้า การศึกษาการขยายพันธุ์กระทือโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์จะช่วยให้สามารถขยายพันธุ์กระทือได้เป็นจำนวนมากเชิงพาณิชย์ ดำเนินการโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียมของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith และกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. เพิ่มปริมาณยอด และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือพิลาส พบว่ากระทือพิลาสสามารถเจริญเติบโตเป็นยอดและรากได้ทั้งบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่ศึกษา การเจริญของชิ้นส่วนกระทือบนอาหารเพาะเลี้ยงมีความแปรปรวน แม้ว่าจะเป็นชิ้นส่วนที่มาจากยอดเดียวกันและเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน แต่ให้ผลต่างๆ กัน ดังนั้นเมื่อนำมาศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ โดยมีระยะเวลาของการให้อาหารเหลว 6 ระดับ และจำนวนครั้งในการให้ 2 ระดับ การ

เจริญของชิ้นส่วนกระทือเกิดได้ในทุกสิ่งทดลอง แต่ไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าสิ่งทดลองไหนให้ผลดีกว่า กระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ เมื่อย้ายออกปลูกลงดิน มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89.74 – 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นแข็งแรงสมบูรณ์

6. คำนำ

กระทือเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี จัดอยู่ในอันดับ Zingiberales วงศ์ Zingiberaceae สกุล Zingiber มีลำต้นประเภทเดียวกับไพล หรือขิง ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน สีเหลืองซีดๆ เหง้ามีขนาดใหญ่ เนื้อข้างในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว แตกแขนงเป็นกอ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ใบยาวเรียวรูปหอกสีเขียวซ้อนกันเป็นแผงติดต่อกันหุ้มเป็นลำต้นเทียม ก้านช่อดอกแบบตั้งตรงแทงออกมาจากเหง้าใต้ดิน ใบประดับที่มีลักษณะเหมือนส่วนดอกเรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ ดอกโผล่ออกมาจากซอกใบประดับ เมื่อออกดอกแล้วจะเหลือแต่เหง้าใต้ดิน และจะแทงหน่อใหม่ในช่วงฤดูฝน เป็นพรรณไม้ที่มีการขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อ เจริญเติบโตได้ดีในดินอุดมร่วนซุย

กระทือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber zerumbet* Smith มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่ากระทือป่า กระทือบ้าน กะแวน กะแอน แฮวดำ เฮียวแดง เฮียวดำ แสมดำ ลำต้นเทียมสูงได้ถึง 1 เมตร ใบกว้าง 3-10 เซนติเมตร ยาว 14-40 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 14-45 เซนติเมตร ใบประดับสีเขียวแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม มี 10-25 ใบ เรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ รูปไข่กลับกว้างหรือเกือบกลม ดอกสีขาวอมเหลือง โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก ผลแบบผลแห้งแตก รูปไข่กลับ ขนาดเล็ก ผิวเรียบ สีแดง ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร **เมล็ด**รูปขอบขนาน ค่อนข้างกลม มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นริ้วสีขาว เมล็ดสีดำเป็นมัน ออกดอกเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ติดผลราวเดือนตุลาคม หน่ออ่อน เนื้ออ่อนในลำต้น ช่อดอกอ่อน รับประทานเป็นผักสดได้ (ฐานข้อมูลสมุนไพร, 2553 ; วิกิพีเดีย, 2558)

กระทือพิลาส มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber spectabile* Griff. มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น ได้แก่ กระทือช้าง กระทือแดง กระทือป่า จะเงาะ ดางเงาะ ดาเงาะ ไพลเหลือง ลำต้นเทียมมีความสูง 2-3 เมตร ใบกว้าง 6-10 ซม. ยาว 30-50 ซม. ใบประดับเรียงซ้อนอัดกันแน่นเป็นช่อสีเหลือง รูปทรงกระบอกแข็ง กว้าง 6-7 ซม. ยาว 10-30 ซม. กลีบรองดอกสีครีม ยาวถึง 3.5 ซม. ผิวเกลี้ยง ดอกเป็นกรวย ยาว 3 ซม. ปลายกว้างถึง 1 ซม. กลีบปาก แยกเป็น 3 แฉก สีม่วงดำมีจุดสีเหลือง ปลายแฉก ตรงกลางเว้าตื้นอ้า เป็น 2 แฉกเล็ก เกสรผู้อันเดียว ก้านสั้น อับเรณูยาว 1.2 ซม. ก้านชูเกสรตัวเมียสีม่วง รังไข่มีขนประปรายสีดำ ผล รูปรีกว้าง 1 ซม. ยาว 3 ซม. พบในมาเลเซีย ในประเทศไทยพบทางภาคใต้ ขึ้นในป่าดงดิบ ริมลำธารหรือชายป่า ที่

ระดับความสูงถึง 300 เมตร ออกดอกช่วงเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน ติดผลช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม เป็นพืชหายาก ปัจจุบันนอกจากจะนำมาปลูกเป็นไม้ประดับแล้ว ชาวบ้านในภาคใต้ยังนิยมนำยอดอ่อนมาต้มกินเป็นผักแกล้มอีกด้วย(สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2555 ; Myfirstbrain.com, 2012)

กระทือเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายด้าน คือ ใช้เป็นอาหารโดย หน่ออ่อน เนื้ออ่อนในลำต้น และช่อดอกอ่อน นิยมนำมาแกงเผ็ด แกงไตปลา ต้มจิ้มน้ำพริก ผัด ยำ กระทือมีรสชาติเผ็ดร้อนเล็กน้อยและกลิ่นค่อนข้างฉุน ประโยชน์ที่สำคัญ คือ ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร ใช้เป็นยาแก้เบื่ออาหาร ยาขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ จุกเสียด ปวดท้อง บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ เสมหะเป็นพิษ และบำรุงน้ำนม ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยพบว่า zerumbone มีฤทธิ์ต้านการหดเกร็งตัวของลำไส้ และพบว่า zerumbone ยับยั้งการเกิดมะเร็ง และสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากเหง้ากระทือ มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวกลุ่ม Giardia จึงมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระทือมาใช้ในทางเภสัชวิทยาและเวชสำอาง ปัจจุบันกระทือเป็นไม้ตัดดอกเมืองร้อนที่กำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากกระทือมีลักษณะเด่นที่ดอกมีสีสันสวยงาม รูปทรงแปลกตามีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีความคงทน มีอายุการใช้งานนาน เหมาะสำหรับใช้ในการจัดแจกันและจัดช่อดอกไม้ในงานพิธีต่างๆ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ตัดดอก ตลาดต่างประเทศเริ่มให้ความสนใจ มีการส่งกระทือเหลืองไปยังประเทศญี่ปุ่น

กระทือขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ ทำให้ขยายพันธุ์ได้ช้า ถ้าความต้องการมีสูงขึ้น จะทำให้ขยายได้ไม่ทันต่อความต้องการ วิธีที่ดีที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นปริมาณมากและรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์สามารถผลิตพืชได้ในเชิงพาณิชย์ ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์มีหลักการดังนี้ คือ มีการแยกภาชนะออกเป็น 2 ภาชนะ ภาชนะหนึ่งสำหรับใส่อาหาร อีกภาชนะหนึ่งสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช ภาชนะทั้งสองมีจุดเชื่อมต่อกันเพื่อให้อาหารเหลวไหลผ่านจากภาชนะหนึ่งไปสู่อีกภาชนะหนึ่ง โดยใช้แรงลมและแรงโน้มถ่วง ทำให้ต้นไม้ไม่จมอยู่ในอาหารตลอดเวลา อากาศที่เข้า-ออกในไบโอรีแอคเตอร์จะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศ ที่กรองเชื้อจุลินทรีย์ ฝุ่นละออง และไอน้ำ ระบบอากาศภายในภาชนะจึงเป็นระบบอากาศที่ปลอดเชื้อ เป็นระบบที่มีการจัดการที่ง่าย และลดแรงงานในการย้ายเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ (Loyola-Vasgas และ Vazquez-Flota, 2006)

Christine Stanly และ Keng Chan Lai (2007) ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์กระทือ โดยเพาะเลี้ยงตาจาก rhizomes ในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA และ

IBA ปริมาณ 0.5 มก./ล. แต่ละยอดที่เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มปริมาณเฉลี่ยเป็น 3.9 ยอดในอาหารแข็ง และ 6.4 ยอดในอาหารเหลว หลังจากปรับสภาพและย้ายลงดิน ต้นทั้งหมดมีชีวิตรอด

ห้องปฏิบัติการหลายแห่งได้ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ เพื่อขยายพันธุ์เป็นปริมาณมากในเชิงการค้าในพืชหลายชนิด ได้แก่ เฟิร์น เดหลี ฟิลโลเดนดรอน กล้วย มันฝรั่ง ลิลลี่ คริตสมาส อ้อย และพืชที่ปลูกเป็นสวนป่าบางชนิด เช่น ยูคาลิปตัส ระบบนี้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการขยายพันธุ์ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนนิซิสลงได้ถึง 35 % และเมื่อใช้ระบบนี้แบบกึ่งอัตโนมัติ สามารถลดต้นทุนการผลิตในการขยายพันธุ์ผ่านกระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจนนิซิสลงได้ 24 % (Cervelli และ Senaratna, 1995)

Park และคณะ (2002) ใช้ Protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ฟาเลนนอฟซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาศึกษาในการเพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์และเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ พบว่า การเพาะเลี้ยง PLBs ในแบบระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ให้ผลดีที่สุด สามารถเพิ่มปริมาณ PLBs ได้ประมาณ 18,000 ชิ้น จาก 1,000 ชิ้น ภายใน 8 สัปดาห์

Paek และคณะ (2005) ได้ศึกษาการใช้เทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ในการผลิตพืชเป็นปริมาณมากในพืชสวนและพืชที่ใช้ทางยา ได้แก่ *Anoectochilus* แอปเปิ้ล *Chrysanthemum* กระเทียม โสม องุ่น *Lilium* *Phalaenopsis* และมันฝรั่ง พบว่า ต้นทุนและแรงงานในการขยายพันธุ์ยอด ตา และโซมาติกเอมบริโอของพืชที่ศึกษาลดลงเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเดิม

ดังนั้น การศึกษาการขยายพันธุ์กระทือโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์จะช่วยให้สามารถขยายพันธุ์กระทือได้เป็นจำนวนมากเชิงพาณิชย์

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ต้นกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith
2. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ สารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
3. เครื่องชั่ง เครื่องชั่งอย่างละเอียด เครื่องกวนสารละลาย เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้อบ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดแบ่งเนื้อเยื่อ
4. กระบอกตวง เครื่องแก้ว มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และเครื่องเขย่า
5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 ° C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

6. ชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ประกอบด้วย กระบอกกรองสองชั้น (Polycarbonate Filter-Holder) แผ่นกรองอากาศ (Midisard 2000) เครื่องปั้มลม ท่อลม สายยางซิลิโคน วาล์วปิดเปิด ตัวควบคุมเวลาการทำงานของปั้มลม

- วิธีการ

ก. ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและชนิดของชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพืช และเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สำหรับทำงานวิจัย

2. การฟอกฆ่าเชื้อและเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยง ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม เหง้า ใบอ่อน และเมล็ดของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith ส่วนกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม โดยนำชิ้นส่วนต่างๆมาทำการตัดส่วนที่ไม่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือส่วนที่ได้รับความเสียหาย หรือติดโรค ทิ้งไปให้เหลือแต่ชิ้นส่วนที่สมบูรณ์ ล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนด้วยการฟอกน้ำสบู่เพื่อชะล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ชิ้นส่วนพืชในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคในเบื้องต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อดังกล่าวไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี ล้างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ และเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยงบนอาหาร ดังนี้

- ชิ้นส่วนลำต้นเทียม ตัดลำต้นเทียมเป็นท่อนสั้นๆ ใช้ปากคีบจับชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อฟอกฆ่าเชื้อ เติม tween20 1-2 หยดเพื่อลดแรงตึงผิว แล้วนำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 15 20 และ 25 นาที เพื่อให้คลอร็อกซ์เข้าไปฆ่าเชื้อโรคบนชิ้นส่วนลำต้นเทียมได้ทั่วถึง เมื่อครบเวลานำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เติม tween20 1-2 หยด นำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าให้น้ำไปล้างคลอร็อกซ์ออกจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อประมาณ 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนที่มีตาติดอยู่ออกมาให้ได้ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยง

- ชิ้นส่วนเหง้า ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาทีและตามด้วยคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที การเตรียมเนื้อเยื่อตัดเนื้อเยื่อรอบนอกที่ถูกสารคลอรอกซ์ทำลายออก ตัดชิ้นส่วนให้ได้ขนาดประมาณ 1x1x0.5 เซนติเมตร เตรียมรอนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

- ชิ้นส่วนใบอ่อน นำชิ้นส่วนใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และตามด้วยคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดใบอ่อนขนาดกว้างยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

- เมล็ดกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

3. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตาจากต้นเทียมและเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนเหง้าและใบอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2-4,D 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นยอดและแคลลัส

4. เมื่อเนื้อเยื่อกระทือมีการเจริญเติบโต นำมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณไปเรื่อยๆ จนปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง จึงนำไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม

ข. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์กระทือในสภาพปลอดเชื้อ

1. ตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อการทดลอง
2. ดำเนินการทดลองนำเนื้อเยื่อของ *Zingiber spectabile* Griff. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในระดับต่างๆ รวม 16 สูตร โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ สิ่งทดลอง คือ สูตรอาหารเพาะเลี้ยง มีดังนี้

1. MS
2. MS + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. MS + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
5. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
6. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
7. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
8. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
9. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
10. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
11. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
12. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
13. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
14. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
15. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

16. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ

4. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค. ศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการให้อาหารในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

1. ประกอบชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์และทดสอบการใช้งาน

2. นำเนื้อเยื่อกระทือที่ขยายปริมาณได้ไปศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวที่ต่างกัน วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 7 สิ่งทดลองๆ อย่างละ 8 ชิ้นส่วน ดังนี้

- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งตามปกติ

3. ย้ายต้นออกปลูกลงดิน

4. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกลงดิน

5. วิเคราะห์ข้อมูล

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2554 - กันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ก. ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและชนิดของชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

ผลการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของกระทือ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ชิ้นส่วนตาจากต้นเทียมเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยือกระทือ เพราะชิ้นส่วนปลอดการปนเปื้อน 14.3 และ 11.9 เปอร์เซ็นต์ ในกระทือ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith

ตามลำดับ หลังจากฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา30 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที และชิ้นส่วนตาที่ปลอดเชื้อทุกชิ้นสามารถเจริญเติบโตเป็นยอดได้บนอาหาร MS

ชิ้นส่วนเหง้าของ *Zingiber spectabile* Griff. มีการเจริญเกิดแคลลัสบนอาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ต่อมาเกิดเชื้อปนเปื้อนที่มาจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ไม่พบการเกิดแคลลัสในชิ้นส่วนเหง้าของ *Zingiber zerumbet* Smith

ชิ้นส่วนใบอ่อนของกระทือทั้งสองพันธุ์แม้จะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงกว่าชิ้นส่วนตาจากต้นเทียม แต่ไม่มีการเจริญเติบโตบนสูตรอาหารทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง ส่วนเมล็ดของ *Zingiber zerumbet* Smith เกิดเชื้อปนเปื้อนทั้งหมด

ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ ของกระทือทั้งสองพันธุ์ เกิดเชื้อปนเปื้อนสูงมาก นักวิจัยหลายท่านมีความเห็นตรงกันว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดเชื้อปนเปื้อนสูงมาก และเป็นสาเหตุให้ประสบความสำเร็จยาก (Saensouk, 2011)

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อของชนิดชิ้นส่วนและวิธีการฟอกในกระทือทั้งสองพันธุ์

พันธุ์	ชิ้นส่วน	วิธีการฟอก	ปลอดเชื้อ(%)
1	ตาจากลำต้นเทียม	คลอร็อกซ์ 10% 15 นาที 5% 10 นาที	5
		คลอร็อกซ์ 10% 20 นาที 5% 10 นาที	9.5
		คลอร็อกซ์ 10% 25 นาที 5% 10 นาที	11.8
		คลอร็อกซ์ 10% 30 นาที 5% 10 นาที	14.3
	เหง้า	คลอร็อกซ์ 10% 30 นาที 5% 10 นาที	3.4
	ใบอ่อน	คลอร็อกซ์ 10% 15 นาที 5% 10 นาที	16.7
2	ตาจากลำต้นเทียม	คลอร็อกซ์ 10% 30 นาที 5% 10 นาที	11.9
	เหง้า	คลอร็อกซ์ 30% 15 นาที 5% 10 นาที	3.6
	ใบอ่อน	คลอร็อกซ์ 10% 15 นาที 5% 10 นาที	13.9
	เมล็ด	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% 5 นาที	0

1 = *Zingiber spectabile* Griff. 2 = *Zingiber zerumbet* Smith

ข. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์กระทือในสภาพปลอดเชื้อ

ดำเนินการทดลองนำเนื้อเยื่อของ *Zingiber spectabile* Griff. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในระดับต่างๆ รวม 16 สูตร โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ พบว่ากระทือมีการเจริญเติบโตเป็นยอดได้ในอาหารทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง จำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือบนอาหาร MS ที่มี BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ย
1. MS	2.22 ab
2. MS + NAA 0.25 มก./ล.	1.61 a
3. MS + NAA 0. 5 มก./ล.	1.72 a
4. MS + NAA 1มก./ล.	1.77 ab
5. MS + BA 1 มก./ล.	1.88 ab
6. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 0.25 มก./ล.	2.23 ab
7. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 0. 5 มก./ล.	1.78 ab
8. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.	1.73 a
9. MS + BA 3 มก./ล.	2.67 ab
10. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 0.25 มก./ล.	2.13 ab
11. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 0. 5 มก./ล.	2.10 ab
12. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.	2.73 ab
13. MS + BA 5 มก./ล.	1.98 ab
14. MS + BA 5 มก./ล. + NAA 0.25 มก./ล.	3.14 b
15. MS + BA 5 มก./ล. + NAA 0. 5 มก./ล.	1.66 a
16. MS + BA 5 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.	1.44 a

CV = 34.6

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

เห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของกระทือ เพราะค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการสังเกต การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงมีความแปรปรวนสูง การเจริญของชิ้นส่วนให้ผลแตกต่างกัน แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน หรือตัดแบ่งเนื้อเยื่อมาจากยอดเดียวกัน ความแปรปรวนที่พบ ได้แก่ ชิ้นส่วนไม่มีการเจริญเติบโตแต่ไม่เหลืองตาย ชิ้นส่วนเกิดตาจำนวนมากอัดกันแน่นเป็นกระจุกและไม่เติบโตเป็นยอด จำนวนยอดที่พบมีตั้งแต่ 0-10 ยอด เป็นต้น(ภาพที่ 1) กระทือสามารถเกิดยอดและรากบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดียวกัน แม้ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกระตุ้นให้เกิดราก กระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีต้นใหญ่แข็งแรงเกิดยอดและราก

ภาพที่ 1 แสดงความแตกต่างของการเจริญของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน

ไม่ได้ดำเนินการทดลองศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงในกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith เนื่องจากการขยายเพิ่มปริมาณได้ไม่เพียงพอต่อการทดลอง

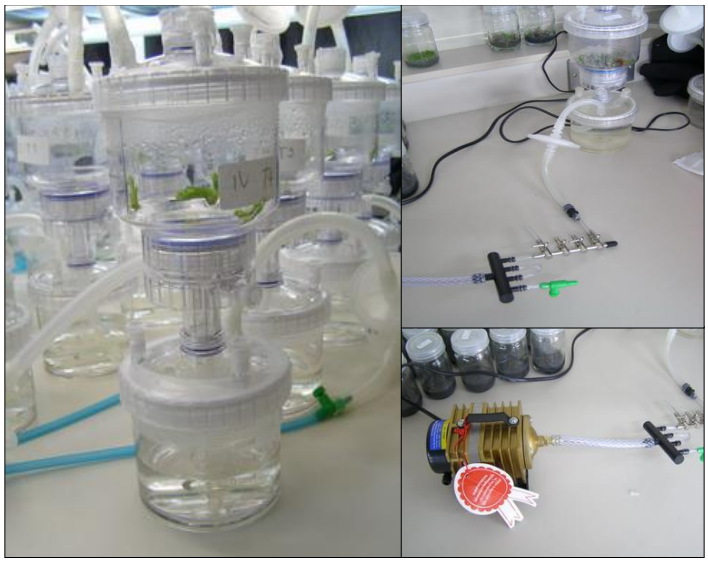
ได้ลองนำยอดที่ได้จากการขยายปริมาณในอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดการเจริญเป็นกระจุกตาขึ้น เมื่อตัดแยกตาออก

แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่ ตาสามารถเพิ่มปริมาณ ลักษณะการเจริญและเพิ่มปริมาณเหมือน protocorm like bodies ในกล้วยไม้(ภาพที่ 2)

ภาพที่2 ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเกิดกระจุกตา และตาสามารถเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว

ค. ศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการให้อาหารในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองดำเนินการประกอบขึ้นเองโดยใช้กระบอกกรอง Polycarbonate filter Holder ของ Sartorius stedim biotech ประกอบด้วยกระบอกสองอันซึ่งใช้ในการกรองสารละลาย แต่ได้นำมาปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชโดยกระบอกอันบนใช้ใส่เนื้อเยื่อพืช กระบอกอันล่างใช้ใส่อาหารเหลว ต่อที่กรองอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Midisard 2000 0.20 µm) เข้ากับกระบอกอันล่าง และที่กรองอากาศอีกอันเข้ากับกระบอกอันบน เพื่อให้อากาศที่เข้าสู่กระบอกกรองที่ใช้เป็นเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ปราศจากเชื้อ ต่อชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ประกอบนี้เข้ากับปั๊มลม เมื่อเปิดการทำงานของปั๊มลม แรงลมจากปั๊มลมจะดันของเหลวคืออาหารเพาะเลี้ยงจากกระบอกชั้นล่างขึ้นไปยังกระบอกชั้นบนซึ่งเป็นที่อยู่ของเนื้อเยื่อพืช ทำให้เนื้อเยื่อพืชได้รับอาหารอย่างทั่วถึง และเมื่อปิดการทำงานของปั๊มลม อาหารเหลวที่อยู่ในกระบอกชั้นบนจะค่อยๆ ไหลลงสู่กระบอกชั้นล่างตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนหมด (ภาพที่ 3) ปลั๊กของปั๊มลมจะต่อเข้ากับที่ตั้งเวลา ทำให้ควบคุมเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวกับเนื้อเยื่อพืชได้ หลังจากทดสอบการทำงานของระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์จนเห็นว่าระบบทำงานได้สมบูรณ์แล้ว จึงดำเนินการศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวเนื้อเยื่อกระทือ



ภาพที่ 3 เทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ประกอบขึ้นใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่มีตาอยู่ใส่ในกระบอกกรองอันบน และใส่อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในกระบอกกรองอันล่างของชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ วางชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์บนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ(ภาพที่ 4) ต่อเชื่อมเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์กับปั๊มลมที่ถูกควบคุมการทำงานด้วยตัวตั้งเวลา ซึ่งปั๊มลมจะทำงานและหยุดตามเวลาที่ตั้งไว้ บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 3 เดือน (ภาพที่ 5) เนื่องจากข้อมูลไม่ครบ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติได้

ภาพที่ 4 การศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ในภาพเห็นอาหารเหลวถูกแรงลมดันขึ้นไปอยู่ในกระบอกอันบนที่มีเนื้อเยื่อกระทืออยู่

เก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4 เดือน ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้ เนื่องจากข้อมูลไม่ครบ เพราะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในขณะเพาะเลี้ยงในบางสิ่งทดลอง และชิ้นส่วนทุกชิ้นในบางสิ่งทดลองไม่มีการเจริญเติบโต ได้ทดลองซ้ำอีกครั้งโดยเก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 10 สัปดาห์ จากข้อมูลที่ได้การเจริญเติบโตของกระทือในการเพาะเลี้ยงมีความแปรปรวนมากดังที่กล่าวไว้ในเบื้องต้นแล้ว ข้อมูลที่ได้จึงไม่ชัดเจนพอที่จะบอกความแตกต่างได้ (ตารางที่ 3) แต่กระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ รากที่เกิดขึ้นในขณะเพาะเลี้ยงจะพันกันไปหมด เวลาย้ายออกปลูก ต้องดึงรากให้แยกหลุดออกจากกัน ทำให้รากขาดบอบช้ำ เป็นผลเสียต่อการย้ายปลูกได้

เมื่อย้ายต้นกระทือที่ทดลองเพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ที่มีระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารต่างกัน ออกปลูกลงดิน โดยใช้ดินใบก้ามปูผสมเม็ดดินเผาเป็นวัสดุปลูก พบว่า กระทือมีอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายออกปลูกสูงมาก คือ 89.74 -100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ต้นแข็งแรงสมบูรณ์ดี(ภาพที่ 5)

ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์มีการเจริญเติบโตดี

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนยอดและความสูงของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ให้อาหารเหลวเป็นระยะเวลาและจำนวนครั้งที่ต่างกัน เป็นเวลา 4 เดือน และ 9 สัปดาห์

เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน								
สิ่งทดลอง	จำนวนยอดเฉลี่ย				ความสูงเฉลี่ย			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4
1	1.68	2.2	1.86	2.25	4.03	3.14	5.55	4.83
2	1.25	C	2.34	1.88	4.98	C	4.47	5.35
3	1.67	2	2.25	2.17	4.62	5.72	4.77	5.36
4	N	N	3	3.38	N	N	4.84	4.64
5	3.25	2.5	1.67	1.13	1.76	1.8	2.33	3.57
6	C	N	C	3.5	C	N	C	5.39
7	2	1.33	1.25	4.46	6.64	4.23	7.69	5.14
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์								
สิ่งทดลอง	จำนวนยอดเฉลี่ย				ความสูงเฉลี่ย			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4
1	N	1.4	1	1.2	N	2.03	0.5	4.48
2	1	3.2	1.5	2.6	0.4	0.83	0.83	3.95
3	1.6	3	1.4	2.25	2.31	2.1	1.63	2.44
4	1	2	1	2.67	1.63	1.26	0.5	1.25
5	1.6	2.5	1.5	2.6	2.88	1.38	3.82	5.06
6	1	3	N	1.2	3.5	0.94	N	1.4
7	2.4	2.8	2.2	1.8	2	3.04	2.04	1.18

C = เกิดเชื้อปนเปื้อน N = ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงไม่มีชิ้นส่วนใดมีการเจริญเติบโต

สิ่งทดลอง 1 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน

2 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน

3 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน

4 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน

5 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน

6 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน

7 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของกระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ เมื่อย้ายออกปลูกลงดิน

กระทือเพาะเลี้ยง	อัตราการรอดชีวิต(%)
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน	90.32
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน	89.74
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน	92.86
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน	95.45
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน	95.00
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน	100.00
บนอาหารแข็ง	93.33

ภาพที่ 5 ต้นกระทือย้ายออกปลูกลงดิน มีอัตราการรอดชีวิตสูง

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียมเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

2. ชิ้นส่วนตาจากต้นเทียมของกระทือพิลาสสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ด้วยอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่เพาะเลี้ยงยอดที่ได้นำมาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณได้

3. เนื้อเยื่อกระทือสามารถเจริญเป็นยอดได้ในทุกสูตรอาหารที่ศึกษา แต่ไม่ใช่ทุกชิ้นส่วนสามารถเจริญได้ และการเจริญของกระทือแม้จะบนอาหารสูตรเดียวกัน หรือเป็นเนื้อเยื่อมาจากยอดเดียวกัน การเจริญมีความแตกต่างแปรปรวน ซึ่งไม่ทราบปัจจัยที่ควบคุม

4. ชิ้นส่วนกระทือ เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ที่ให้อาหารเหลวเป็นระยะเวลาและจำนวนครั้งแตกต่างกัน มีการเจริญใกล้เคียงกัน กระทือที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจะมีต้นสูงกว่าและดูแข็งแรง

5. กระทือเมื่อย้ายออกปลูกลงดินมีอัตราการชีวิตรอดสูง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์กระทือ หรือในงานวิจัยที่ต้องการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง

1.

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง :

ฐานข้อมูลสมุนไพร. 2553. กระทือ. สืบค้นจาก : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200 [15 กรกฎาคม 2558].

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. กระทือ. สืบค้นจาก : https://th.wikipedia.org/wiki/กระทือ [15 กรกฎาคม 2558].

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. กระทือพิลาส. สืบค้นจาก: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=879 [11 สิงหาคม 2555].

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Cervelli, R., and T. Senaratna. 1995. Economic analysis of automated embryogenesis.

Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. The Netherlands. 1995 : 29-64.

Christine Stanly, and Chan Lai, Keng . 2007. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith.. *Biotechnology*, 6 (4) : 555-560.

Lamseejan, S., P. Jompook, A. Wongpiyasatid, P. Kwanthammachart and R. Meesat. 2001. Improvement of ornamental plants through induced mutation. Pp. 19-20. *In* FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pacific Region. Makati City, The Philippines.

Loyola-Vasgas, V. M. and F. Vazquez-Flota. 2006. Methods in Molecular Biology, vol. 318. Plant cell Culture Protocols, 2 ed. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 246 p.

Myfirstbrain.com. 2012. กระทือช้าง. Retrieved August 11, 2012, from http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=61668

Paek, K. Y., D. Chakrabarty and E. J. Hahn. 2005. Application of Bioreactor Systems for Large Scale Production of Horticulture and Medicinal Plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 81, No. 3 : 287 – 300.

Park, S. Y., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2000. Mass Multiplication of Protocorm-like Bodies Using Bioreactor System and Subsequent Plant Regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell, tissue and Organ Culture. Vol. 63, No. 1 : 67-72.

Sultana A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman and S. Moonmoon. 2009. In Vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. Pak. J. Bot., 41 (4) : 1667-1676