บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กระเจียวเป็นไม้ในสกุลขมิ้น (Genus Curcuma) Tribe Hedychieae ซึ่งอยู่ในตระกูล Zingiberaceae พืชสกุลนี้มีไม่น้อยกว่า 100 ชนิด (พิมพ์ใจและคณะ, 2539) โดยกระจายพันธุ์ตั้งแต่ทวีปออสเตรเลีย จีน อินเดีย พม่า ไทย กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย เรื่อยมาจนถึงทวีปแอฟริกามีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ตามภาคต่างๆ ของประเทศไทยไม่ต่ำกว่า 50 ชนิด (พิมพ์ใจ, ติดต่อส่วนตัว) ในระดับความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงประมาณ 1,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล (สุรวิช,2539) โดยมักขึ้นในป่าผลัดใบแถบมรสุมที่มีปริมาณน้ำฝน 1,000-2,000 มม/ปี (กฤษณา,2527) นอกจากนี้ยังมีลูกผสมที่ได้รับการพัฒนาพันธุ์ขึ้น

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ทั่วไป

ลำต้น มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้า (rhizome) ซึ่งทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหาร โดยมีลำต้นเทียม (pseudostem) เหนือดินซึ่งเกิดจากการห่อตัวกันแน่นของกาบใบ

ใบ แผ่นใบเป็นใบเดี่ยวเป็นแบบ lamina lanceolate หรือ oblong โดยแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด โดยมีกาบใบห่อตัวกันแน่นเป็นลำต้นเทียม (จามจุรี,2533)

ช่อดอก ออกดอกเป็นช่อแบบ compact spike โดยการออกดอกของพืชกลุ่มกระเจียวนั้นบางชนิดช่อดอกเกิดจากเหง้าก่อนที่ลำต้นเทียมจะงอกขึ้นมา บางชนิดมีดอกและลำต้นเทียมงอกขึ้นมาพร้อมๆ กันและบางชนิดเกิดดอกที่ปลายยอดของลำต้นเทียม ช่อดอกประกอบด้วยกลีบของใบประดับ (spathe) เวียนซ้อนกันเป็นช่อทรงกระบอกซึ่งอาจมีกลีบขนาดเท่ากันหรือกลีบประดับส่วนบน (coma bract) ค่อนข้างบานออกก็ได้ (สุรวิช,2537)

ดอก ประกอบด้วยวงกลีบเลี้ยง (calyx) และวงกลีบดอก (corolla) (จามจุรี,2534) ดอกจริงของพืชสกุลนี้ไม่มีก้านดอกย่อย ดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ อยู่เหนือรังไข่เชื่อมกันเป็นหลอดหุ้มส่วนโคนของกลีบดอกไว้ วงกลีบดอกแยกเป็น 3 ส่วน โดยแปรรูปมาจากเกสรตัวผู้วงนอกซึ่งเป็นหมันโดย 1 อัน เปลี่ยนรูปไปเรียกว่าปาก (labellum) (สุรวิช,2537) เกสรตัวผู้วงในลดรูปไป 1 อันเหลืออับละอองเรณู (anther) 2 อันที่ทำหน้าที่ตามปกติ (สุรวิช,2539) ซึ่งเมื่อแก่จะแตกออกตามยาว รังไข่มี 3 ช่อง ก้านเกสรตัวเมีย (style) มีลักษณะผอมบางเป็นเส้นยาวขึ้นไปตามก้านเกสรตัวผู้ (filament) แล้วยอดเกสรตัวเมีย (stigma) แทรกอยู่ระหว่างกลางอับละอองเกสร ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 2 ส่วนและมีขนโดยรอบ (จามจุรี,2534)

สำหรับกระเจียวพลอยทักษิณ ซึ่งใช้ในงานทดลองชุดนี้ เป็นประเภทใบกว้าง ใบเขียวเส้นกลางใบเห็นชัด ขอบใบเป็นคลื่นเล็กน้อย มีก้านใบยาว ต้นมีลักษณะแตกกอง่าย ออกดอกกลางต้น ก้านช่อโผล่พ้นส่วนกลางต้นมาเห็นได้ชัด ส่วนของช่อดอกมีกลีบประดับรองดอกมีสีส้ม ในแต่ละกลีบมีดอกจริงสีเหลืองทะยอยบานตรงโคนออกเขียวอ่อน ส่วนริ้วประดับ (coma bract) ซึ่งอยู่ส่วนบนของช่อมีสีชมพูอ่อน (ภาพที่ 1 และ 2)

ภาพที่ 1 ต้นกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 2 ดอกกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ฝักและเมล็ด ฝักเป็นแบบ capsule (ฝักกลมๆ) เมื่อแตกออกจะแบ่งเป็น 3 ส่วน ภายในแต่ละส่วนจะเป็นที่อยู่ของเมล็ดซึ่งมีรูปร่างคล้ายเมล็ดองุ่น ปลายแหลมของแต่ละเมล็ดมีเยื่อบางสีขาวติดอยู่เพื่อช่วยในการลอยน้ำเหมาะต่อการกระจายพันธุ์ (สุรวิช,2539)

ราก รากของพืชสกุลนี้เป็นระบบรากฝอย รากส่วนหนึ่งมีปลายที่บวมพองออก มีลักษณะเป็นตุ้ม (tuberous root) ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหาร (กฤษณา,2527)

การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์พืชสกุลนี้ทำได้หลายวิธีคือ

1. การเพาะเมล็ด

ดำเนินการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับการเพาะเมล็ดขนาดกลางทั่วไปโดย นำเมล็ดเพาะในกระบะบรรจุทรายผสมถ่านแกลบ อัตราส่วน 1 : 1 โดยให้เมล็ดจมลงในวัสดุปลูกประมาณ 0.5 - 1 ซม. (สุรวิช,2537)

2. การแยกเหง้า

ในหนึ่งฤดูปลูกเหง้า 1 เหง้า เกิดเป็นลำต้นเทียม ซึ่งจะแตกหน่อออกไประหว่างฤดูปลูกประมาณ 2 - 20 หน่อ ขึ้นกับชนิดของพืชนั้นๆ เมื่อสิ้นฤดูปลูกแล้วแต่ละกอจะมีเหง้าหลายเหง้า เชื่อมติดกันแต่สามารถหักกลุ่มของเหง้าออกเป็นเหง้าเดี่ยวๆ ได้ง่าย (สุรวิช,2537)

3. การผ่าเหง้า

วิธีนี้เป็นการนำเหง้าที่ได้จากการแยกเหง้ามาผ่าแบ่งตามยาวเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ชิ้นเหง้าที่ได้ควรมีตาข้างที่สมบูรณ์ไม่น้อยกว่า 1 ตา และมีรากสะสมอาหารติดมาด้วยอย่างน้อย 1 ราก (สุรวิช,2537)

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้สำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ช่อดอกอ่อน ตา ชิ้นส่วนของหัวและใบ เป็นต้นโดยมีการใช้ส่วนประกอบของอาหารตลอดจนความเข้มข้นที่แตกต่างกันทั้งธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต ตลอดจนการปรับสภาพแวดล้อม รวมทั้งความแตกต่างของภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานการวิจัยในพืชชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องดังนี้

ในปี 1989 Hill et al. สามารถเพาะเลี้ยงรังไข่จากช่อดอกอ่อนของ Hosta sieboldiana ลงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม thiamine 0.4 มก/ล glycine 2.0 มก/ล พบว่าแคลลัสจะเกิดได้ดีที่สุดบนอาหารที่เติม NAA 5.4 μM และ BA 4.4 μM ส่วนยอดเกิดได้ดีบนอาหารที่เติม BA 0.4 μM โดยจะเกิดจากบริเวณฐานของรังไข่

ในปีต่อมา Gawel et al. (1990) ได้เพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของ Miscanthus sinensis Andress. พันธุ์ Gracilimus Variegatus และ Zebrinus บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม 2,4-D 9.0 μM น้ำตาลซูโครส 20 ก/ล Gelrite 2.0 ก/ล และ$MgCl_2$ 0.75 ก/ล โดยพบว่าจะมีการพัฒนาของยอดและรากผ่านแคลลัส ภายในระยะเวลา 8 - 12 สัปดาห์ และจะพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีบนอาหารสูตร MS(1962) ความเข้มข้น 1/2 เท่า โดยปราศจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ซึ่งเมื่อนำออกปลูกก็จะเกิดดอกขึ้นภายในระยะเวลาสั้น

ในปีเดียวกัน George and Eapen (1990) สามารถชักนำให้เกิดต้นและ somatic embryogenesisจากช่อดอกอ่อนของ Eleusine coracana บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับzeatin หรือน้ำมะพร้าว หรือในอาหารที่เติม picloram ร่วมกับ kinetin และน้ำตาลซูโครส 3%

และ Goh and Wong (1990) ได้เพาะเลี้ยงส่วนยอดของช่อดอกของกล้วยไม้ลูกผสม Aranda พันธุ์ Deborah ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร Kundson C ที่เติมน้ำมะพร้าว น้ำตาล

และ BA แต่จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวและน้ำตาลซูโครส และต้นที่เกิดขึ้นจะพัฒนาได้ดีบนอาหารวุ้นสูตร VW ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นเพาะเลี้ยงจนถึงนำออกปลูกประมาณ 10 เดือน

Wang et al. (1991) ได้เพาะเลี้ยงเซลในส่วนผิวช่อดอกอ่อนของ Freesia refracta บนอาหารดัดแปลงสูตร N_6 ที่เติม IAA 2 มก/ล BA 3 มก/ล ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดทั้ง embryoid และ callus ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ต่อไปหรือย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม IAA 2 มก/ล BA 0.5 มก/ล และ NAA 0.5 มก/ล โดยต้นที่ได้จะมีลักษณะและจำนวนโครโมโซมเป็นปกติ

ในปี 1993 Arya et al. ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของ Amaranthus paniculatus บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม kinetin 3 - 6 มก/ล พบว่าช่อดอกจะพัฒนาไปสู่ช่อดอกระยะที่ 2 ในขณะที่ต้นและใบจะพัฒนาจากช่อดอกที่เลี้ยงในอาหารที่เติม kinetin 8 - 5 มก/ล หรือ BAP 5 - 10 มก/ล ซึ่งในส่วนของรากนั้นจะพัฒนาขึ้นในอาหารที่เติม kinetin 12 มก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15% โดยมีการพัฒนาของดอกเกิดขึ้นภายในต้นขณะทำการเพาะเลี้ยงด้วย

ในปีเดียวกันนี้ Chang and Criley ได้ใช้เวลาถึง 9 เดือนในการกระตุ้นให้มีการพัฒนาของต้นและรากของ Pink gingers (Alpinia purpurata (veill) K. Schum.) โดยใช้กลีบ-ประดับจากช่อดอกของพันธุ์ Ginoza Hybrid NO. 5 โดยใช้เวลา 5 เดือนในการเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม น้ำมะพร้าว 15% และน้ำตาลซูโครส 2% pH 5.6 หลังจากนั้นเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม Difco Bacto agar 0.8% เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 - 26 °ซภายใต้ความเข้มแสง 25 $\mu mol\ s^{-1}\ m^{-2}$ เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นใช้เวลา 1 เดือน ในการพัฒนาต้นและรากบนอาหารวุ้นดัดแปลง 0.5 MS ที่เติม BA 4.4 μM และน้ำตาลซูโครส 2%

นอกจากนี้ Onisei et al. (1993) ได้ทำการเพาะเลี้ยงปลายของช่อดอกอ่อนอายุ 3 เดือน ซึ่งมีขนาดยาว 0.5 - 1.0 ซม จาก Digitalis lanata และ D. purpurea ลงบนอาหารดัดแปลง

สูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการตอบสนองของทั้งสองชนิด ไม่แตกต่างกันแต่ต้นของ D. purpurea แข็งแรงกว่าและมีการพัฒนาของส่วนต่างๆ เร็วกว่า ในอาหารที่เติมBA 2.0 มก/ล พืชทั้งสองชนิด เกิดต้นประมาณ 10 - 15 ต้น/ชิ้นส่วน จำนวนรากของ D. lanata น้อยกว่า D. purpurea รวมทั้งอัตราการรอดตายเมื่อนำออกปลูกก็ต่ำกว่าคือประมาณ 65 - 70% เมื่อเทียบกับ D. purpurea ที่มีอัตราการรอดตายถึง 95-98%

ในปี 1994 Jehan et al. ได้เพาะเลี้ยงส่วนของฐานใบ ดอกและส่วนของหัวพันธุ์ของ Iris pallida Lam. และ Iris germanica L. พบว่าการใช้ส่วนดอกดีที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus บนอาหารดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติม kinetin 0.1 มก/ล NAA 1 มก/ล และ 2,4-D 1 มก/ล หรือ kinetin และ 2,4-D อย่างละ 1 มก/ล ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 50 ก/ล โดยเกิด callus ธรรมดา ถึง 50% และ embryogenic callus 2 - 4% ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ด้วยอาหารดัดแปลงสูตร MS หรือ N_6 ที่เติม 2,4-D 1 มก/ล kinetin 0.1 มก/ล proline ที่มีความเข้มข้น 0 - 2.9 ก/ล และน้ำตาลซูโครส 50 ก/ล

ปี 1995 Richwine et al. สามารถชักนำให้เกิดต้น โดยการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของ Aloe, Gasterna และ Haworthia บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม zeatin riboside โดยต้นจะเกิดได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5.4 μM หรือ BA 4 μM ซึ่งจะเกิดต้นได้ภายใน 8-12 สัปดาห์ และพบว่ามีการพัฒนาของรากด้วย

นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชตระกูล Zingiberaceae ดังนี้ ในปี 1978 Hosoki and Sagawa ได้ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงตาจากหัวพันธุ์ของขิง (Zingiber officinale Roscoe.) บนอาหารที่มีส่วนผสมของธาตุอาหารหลักสูตร MS และธาตุอาหารรองและวิตามินสูตร Ringe - Nitsch ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 2% และ BA 1 สตล (ppm) ซึ่งสามารถเกิดต้นและรากเป็นจำนวนมาก

ในปีเดียวกัน Nadgauda et al. (1978) ได้ทำการเพาะเลี้ยงตาจากหัวขมิ้นพันธุ์ Duggirala และ Tekurpeta บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว kinetin และ BA หรืออาหารดัดแปลงสูตร Smith ที่เติม น้ำมะพร้าว kinetin และ inositol ซึ่งต้นที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลวสูตร White โดยใช้น้ำตาลซูโครส 2% ซึ่งจะได้ต้นที่มีรากแข็งแรง สามารถนำไปปลูกเลี้ยงภายนอกได้ดี

Pillai and Kumar (1982) สามารถกระตุ้นให้ขิงเกิดยอดใหม่จากฐานของยอดจาก หัวพันธุ์ บนอาหารดัดแปลงสูตร SH ภายในระยะเวลา 3 เดือน ต้นใหม่ที่เกิดขึ้นเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมก็สามารถเกิดต้นบริเวณฐานของต้นเดิมได้ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากโดยการเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่วางอยู่เหนืออาหารเหลว ภายใน 2 - 3 สัปดาห์ แต่ callus ซึ่งเกิดขึ้นในสภาพเดียวกันนี้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

นอกจากนี้ Shetly et al. (1982) สามารถชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงตาจากหน่อของขมิ้นสายพันธุ์ 15B บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย kinetin 0.2-0.5 มก/ล และน้ำตาลซูโครส 40 ก/ล pH 5.6 โดยพบการพัฒนาของ callus ขึ้นก่อนและเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในบริเวณที่ได้รับแสง callus สามารถสร้างตา และพัฒนาเป็นต้นโดยมีอัตรา 10 - 12 ต้น/ชิ้นส่วน

ในปี 1985 Kuruvinashetti และ Iyer พบว่าวิธีที่จะได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นจากการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Curcuma domestica คือการใช้ตาจากหน่อของหัวพันธุ์

ปี 1986 Nel พบว่าการผลิตขิงซึ่งปลูกเป็นการค้าในแอฟริกาใต้ประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอย Meloidogyne incognita และ M. javanica จึงมีการผลิตหัวพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนยอดของขิง ทำให้ได้หัวพันธุ์ที่ปราศจากโรค

และ Sakamura et al. (1986) ได้เพาะเลี้ยงขิงพันธุ์ Oshoga เพื่อทำการผลิตน้ำมันหอมระเหย ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของส่วนยอดบนอาหารดัดแปลงสูตร Gamborg B5 และ MS ที่เติม NAA และ BA พบว่าน้ำมันจากหัวพันธุ์ของต้นที่เจริญจากอาหารสูตร Gamborg B5 จะประกอบด้วยกลุ่มออกซิเจนหลักที่เป็นแบบ monoterpenes ในขณะที่อาหารสูตร MS จะให้น้ำมันหอมระเหยที่มีกลุ่มออกซิเจนหลักแบบ sesquiterpenes เป็นส่วนใหญ่

เช่นเดียวกับ De Lange et al. (1987) ได้ผลิตขิง (Zingiber officinale Roscoe.) ที่ปราศจากโรคซึ่งเกิดจากไส้เดือนฝอย โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนยอดที่งอกจากตาของหัวพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) ธาตุอาหารรองและวิตามินสูตร Ringe and Nitsch (1968) ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 4 % BAP 1 มก/ล และ Difco bacto agar 0.8 % pH 6.0 โดยทำการย้ายชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงทุกๆ 1 เดือน พบว่าต้นที่เกิดขึ้นจะปราศจากไส้เดือนฝอย และการเกิดปมของรากในทุกๆการทดลอง และมีอัตราการอยู่รอดถึง 90 % เมื่อนำออกปลูก

ปี 1988 Bhagyalakshmi and Singh ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของขิงสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีและยังไม่มีจุดกำเนิดใบ พบว่าต้นสามารถพัฒนาบนอาหารสูตร MS (1962) ความเข้มข้น 1/3 เท่า ที่เติมน้ำตาลซูโครส 6% น้ำมะพร้าว 20% ascorbic acid 100 มก/ล glutamine 400 มก/ล activated charcoal 250 มก/ล BA 0.5 มก/ล IBA 0.4 มก/ล และวุ้น 0.8% ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญที่พัฒนาเป็นต้นแล้วสามารถนำไปขยายพันธุ์บนอาหารสูตร MS(1962) ความเข้มข้น 1/3 เท่า ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% ascorbic acid 100 มก/ล BA 4 - 5 มก/ล และวุ้น 0.8% ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน พบว่าให้ผลดีน้อยกว่าในอาหารวุ้น การใช้ kinetin และ NAA ที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0.01 - 0.8 มก/ล โดยใช้ร่วมกับ BA และ IBA หรือไม่มีการใช้จะไม่ช่วยให้เกิดการพัฒนาของยอดหรือต้นพืชได้

และ Ilahi and Jabeen (1988) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของ Zingiber officinale L. บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ความเข้มข้น 1/2 เท่า ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ พบว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นไม่เกิดแคลลัส แต่เกิดในเนื้อเยื่อของต้นอ่อน และเมื่อนำแคลลัสนั้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D และ BA จะมีการพัฒนาของจุดกำเนิดตา ซึ่งตาที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถพัฒนาเป็นต้นต่อไปได้

นอกจากนี้ Yasuda et al. (1988) สามารถชักนำให้เกิด callus จากชิ้นส่วนของหัว-พันธุ์ของ Curcuma zedoaria C. domestica และ C. aromatica เพื่อการผลิตน้ำมันหอม-ระเหยโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 1 มก/ล และ kinetin 0.1 มก/ล และเมื่อนำส่วนยอดของ C. zedoaria มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 0-1 มก/ล หรือ BA 0-3 มก/ล ที่ 26°ซ ภายใต้แสง 12 ชม/วัน จะพัฒนาต้นขึ้นซึ่งน้ำมัน-หอมระเหยที่สกัดจาก callus มีคุณสมบัติไม่แตกต่างกับที่ได้จากต้นแม่พันธุ์

Ikeda and Tanabe (1989) ได้นำเอาชิ้นส่วนของลำต้นเทียมที่มีใบและส่วนที่ตัดใบออก (decapitated crown) ของต้นขิงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติม BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าลำต้นเทียมที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มี BA ความเข้มข้น 11 μM ร่วมกับ NAA 0.6 μM ให้จำนวนยอดสูงสุดคือ 5 ยอดและมีรากเฉลี่ย 15.3 รากในส่วนของ decapitated crown เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันจะเกิดยอด 8 ยอด และราก-เฉลี่ย 12.5 รากแต่เมื่อใช้ BA ความเข้มข้น 11 μM เพียงอย่างเดียวให้ยอดถึง 10 ยอด และเกิดรากเฉลี่ย 16.3 ราก และในปีเดียวกันนี้ Winnaar (1989) ได้ใช้ส่วนของตาบนหัวพันธุ์ขมิ้นที่เพิ่งเริ่มงอก ขนาดความสูง 5-10 มม ซึ่งเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญที่มีใบอ่อน มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 1 มก/ล น้ำตาลซูโครส 2% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการย้ายลงอาหารสูตรเดิมอีกครั้ง พบว่ามีการพัฒนายอดและรากภายในระยะเวลา 3 - 4 สัปดาห์ หลังการ-เพาะเลี้ยงโดยเกิดยอดมากกว่า 8 ยอด/ชิ้นส่วน

ในปี 1990 Balachandran et al. ได้เพาะเลี้ยงตาจากหัวพันธุ์ของ Curcuma domestica Val. , C. aeruginosa Roxb. , C. caesia Roxb. และ Zingiber officinale Rosc. บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BAP 0-5.0 มก/ล และ kinetin 1.0 มก/ล พบว่าการใช้ BAP ที่ 3.0 มก/ล มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาของยอดในทุกๆพันธุ์ โดยมีการเริ่มเกิดยอดและรากภายใน 4 สัปดาห์ หลังการเพาะเลี้ยง

และ Inden et al. (1990) สามารถทำการผลิตต้นขิงได้ถึง 750,000 ต้นหรือมากกว่าภายในระยะเวลา 1 ปี โดยการเพาะเลี้ยงส่วนยอดจากหัวพันธุ์บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม BA 5 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล และน้ำตาลซูโครส 20 ก/ล ซึ่งพบว่า 1 ชิ้นส่วนที่เลี้ยงจะพัฒนารากและต้นได้ 4 ต้น ภายในระยะเวลา 9 สัปดาห์ โดยมีความสูงระหว่าง 20 - 30 มม ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งอัตราการเจริญนี้จะไม่ลดลงในการขยายพันธุ์ครั้งต่อๆ ไป เมื่อศึกษาทางด้านเซลล์วิทยา พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซม

Keshavachandran and Khader (1991) ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นจากตาของขมิ้นสายพันธุ์ Co. 1 และ BSR. 1 บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มก/ล BA 1 มก/ล และน้ำตาลซูโครส 40 ก/ล โดยมีจำนวนต้นเฉลี่ยจากตาของสายพันธุ์ Co. 1 ประมาณ 2.5 ต้น และ 2.11 ต้น ในสายพันธุ์ BSR. 1 ภายหลังการเพาะเลี้ยงประมาณ 5 สัปดาห์ สามารถนำต้นออกปลูกในกระถางที่คลุมด้วย polyethylene ภายใต้ร่มเงา ซึ่งต้นสามารถตั้งตัวได้ดีภายใน 2 สัปดาห์หลังการปลูก

ในปี 1992 Malamug et al. ได้ศึกษาการชักนำให้เกิด callus จากยอดของขิงพันธุ์ Kintoki บนอาหารที่มีส่วนผสมของธาตุอาหารหลักสูตร MS และธาตุอาหารรองสูตร Ringe and Nitsch โดยเติม 2,4-D และ BA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ น้ำตาลซูโครส 2% และวุ้น 0.8% พบว่า callus เกิดมากบนอาหารที่เติม 2,4-D 0.5 มก/ล BA 1 มก/ล ซึ่ง callus สามารถเจริญต่อไปได้ในอาหารสูตรเดียวกัน ส่วนการกระตุ้นให้มีการพัฒนาของต้นพบว่า BA ที่ความ-

เข้มข้น 1 และ 3 มก/ล มีผลต่อการเกิดต้นแต่ต้นก็ยังสามารถพัฒนาขึ้นได้ในอาหารที่เติม NAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 5 มก/ล โดยอัตราการเกิดต้นจะลดลงในการย้ายปลูกครั้งที่ 3 ส่วนรากก็สามารถเกิดได้ดีในอาหารสูตรเดียวกัน

Babu et al. (1992) ได้เพาะเลี้ยงใบอ่อนของขิงพันธุ์ Maran เพื่อกระตุ้นให้เกิด callus โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เพิ่ม 2,4-D ความเข้มข้น 2.3-22.6 μM ซึ่ง Callus จะเกิดได้ดีเมื่อใช้ 2,4-D ความเข้มข้นตั้งแต่ 9.0 - 22.6 μM และเมื่อใช้ 2,4-D 0.9 μM ร่วมกับ BA 44.4 μM สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ถึง 15 - 35 ต้นโดยเฉลี่ย และอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการย้ายปลูกในอาหารสูตรเดิม ส่วนรากจะพัฒนาได้ดีในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.4 μM โดยเกิดรากในอาหารเหลวได้ดีกว่าในอาหารวุ้น เมื่อนำไปปลูกในทรายพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตถึง 80% ในปีถัดมา Babu et al. (1993) ยังเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อน (ตาดอกอายุประมาณ 1-10 วัน) ของ Zingiber officinale พันธุ์ Maran บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม BA 10 มก/ล และ 2,4-D 0.2 มก/ล พบว่าสามารถพัฒนาให้เกิดตาได้ โดยตาที่เกิดขึ้นจะพัฒนาเป็นต้นโดยไม่ผ่านแคลลัส และ 38 % ของตาที่เกิดพัฒนาเป็นต้นประมาณ 5-25 ต้น และเมื่อนำส่วนของดอกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน จะพัฒนาเป็นต้นได้ประมาณ 45 % โดยพัฒนาจากส่วนของรังไข่ และ 2 % พัฒนาเป็นผล แต่ต้นที่เกิดจากทั้ง 2 ส่วน สามารถเกิดรากในอาหารที่เติม NAA 1 มก/ล และมากกว่า 80 % เจริญเติบโตได้ดีเมื่อนำออกปลูกในทรายสรุปได้ว่าขิงสามารถใช้ส่วนของช่อดอกอ่อนเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ และยังมีประโยชน์ในเรื่องของการลดการเกิดโรคหัวเน่า (rhizome rot) และโรคเหี่ยวซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย (bacterial wilt) ได้

ในปีเดียวกันนี้ Choi (1993a) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนฐานของลำต้นเทียมของขิง หรือใช้ส่วนของใบโดยแบ่งเป็นส่วนปลาย ส่วนกลาง และส่วนโคน พบว่าทุกส่วนเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้น โดยส่วนกลางและโคนใบจะพัฒนาได้ดีที่สุด แคลลัสเกิดได้ดีที่สุดบน

อาหารที่ประกอบด้วย NAA 0.5 สตล (ppm) ในขณะที่ต้นและรากเกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารที่มี NAA 0.1-1.0 สตล (ppm) ร่วมกับ BA 1.0 สตล (ppm) นอกจากนี้เขายังศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในส่วนยอดของขิง (Zingiber officinale Rosc.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง คือ 3 % ส่วนการเกิดรากและยอดเพิ่มขึ้นเมื่อเติม activated charcoal 2 ก/ล ลงในอาหาร ในปีเดียวกันนี้ Choi ยังร่วมมือกับ Kim เพาะเลี้ยงส่วนยอดของขิงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 0.5 สตล (ppm) ร่วมกับ BA 5.0 สตล (ppm) ทำให้เกิดต้นภายใน 10 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง

และ Kackar et al. (1993) ได้กระตุ้นให้เกิด embryogenic callus ของขิงพันธุ์ Eruttupetta จากใบอ่อนบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในกลุ่มอ๊อกซิน คือ IAA NAA 2.4-D และ Dicamba ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบว่าการใช้ Dicamba ที่ความเข้มข้น 2.7 μM มีประสิทธิภาพกระตุ้นให้เกิด embryogenic callus สูงสุดถึง 70% ในขณะที่การใช้ IAA และ NAA ไม่ช่วยให้เกิด embryogenic callus เกิดขึ้นเลย และ embryogenic callus ที่เกิดขึ้นสามารถกระตุ้นให้เกิดต้นได้ในอาหารที่เติม BA 8.9 μM

Barthakur และ Bordoloi (1994) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Curcuma amada เพื่อการผลิตน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ส่วนของเหง้า บนอาหารดัดแปลงสูตร B5 ที่เติม NAA 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 4 มก/ล โดยมีการเกิดของยอดและรากอย่างรวดเร็วและมีอัตราการรอดชีวิต 60-70 % เมื่อนำออกปลูก

ในปีเดียวกัน Sharma et al. (1994) ได้ผลิตขิงที่ปลอดจากโรคที่เกิดจากการทำลายของ Fusarium oxysporum f. sp. zingiberi ที่ทำให้เกิดโรคสีเหลืองในหัวพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตาด้วยวิธี Encapsulated ใน sodium alginate 4 % ที่เตรียมร่วมกับอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม kinetin 3 มก/ล และน้ำตาลซูโครส 3 % โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ Water agar 2 % , MS basal และ MS ร่วมกับ kinetin 3 มก/ล ที่อุณหภูมิ 25±1 °ซ

ความเข้มแสง 140-145 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ 16 ชม/วัน พบว่ามีการเกิดยอดระหว่าง 16.7-81.8 % ภายในระยะเวลา 5 สัปดาห์ ในอาหารทั้ง 3 สูตร และต้นที่มีความสูงเฉลี่ย 2.3 ซม ความยาวรากเฉลี่ย 1.7 ซม เมื่อนำออกปลูกสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่แสดงอาการของโรค

และในปี 1995 Dogar et al. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Zingiber officinale สายพันธุ์ SG666 และ SDR โดยใช้ตาจากหัวพันธุ์ บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม BA 2.5 มก/ล ร่วมกับNAA 0.5 มก/ล เหมาะสมต่อการเกิดต้น ส่วนรากเกิดในอาหารที่เติม NAA 1 มก/ล

ในปีเดียวกันนี้ Sharma และ Singh (1995) ผลิตหัวพันธุ์ขนาดเล็กของ Zingiber officinale โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร MS ที่เติม BA 1 มก/ล calcium pantothenate 2 มก/ล GA_3 0.2 มก/ล NAA 0.05 มก/ล ซึ่งช่วยให้เกิดต้นในเวลา 4 สัปดาห์ และพัฒนาหัวพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม BA 8 มก/ล และน้ำตาล 75 ก/ล หลังจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±1 °ซ ในที่มืดเป็นเวลา 20 วัน หัวพันธุ์ที่มีตาประมาณ 1-4 ตา น้ำหนัก 73.8-459 มก สามารถนำออกปลูกเมื่ออายุประมาณ 50-60 วัน และหลังจากเก็บรักษาหัวพันธุ์ไว้ในทรายที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้อง พบว่าประมาณ 80 % ของหัวพันธุ์มีการงอกของยอดและราก

Huang (1996) ได้เพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดขนาด 0.2 - 0.9 มม ของขิงบนอาหารสูตร MS 7 ที่เติม BA 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.6 มก/ล พบว่ามีการเกิดของยอดและรากได้ดี โดยมีอัตราการเจริญประมาณ 6 เท่าใน 1 เดือน ในอาหารที่เพิ่ม mantol 3% โดยเพาะเลี้ยงที่ 15°ซ ความเข้มแสงประมาณ 1200 ลักซ์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ส่วนการเพาะเลี้ยงใบในอาหารสูตร MS 4 ที่เติม BA 1.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.6 มก/ล จะเกิดยอดและรากได้เช่นกัน

จามจุรี และ พิมพ์ใจ (1996) ได้ขยายพันธุ์กระเจียวแดง (Curcuma roscoeana Wall.) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถกระทำได้สำเร็จ โดยการเลี้ยงปลายยอดขนาด 0.5x1.0 มม ที่ได้

จากตาอ่อนบนอาหารวุ้นดัดแปลงสูตร MS (1962) + kinetin 0.25 มก/ล พบว่าต้นที่เกิดขึ้นสามารถย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณต่อไป โดยชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปเลี้ยงได้แก่ชิ้นส่วนที่ตัดจากรอยต่อของต้นและรากขนาด 10 มม และแบ่งครึ่งตามยาว ซึ่งให้ต้นใหม่ที่สมบูรณ์เฉลี่ย 2.8 ต้น/ชิ้นส่วนที่เลี้ยง นอกจากนั้นยังพบว่าชิ้นส่วนจากต้นที่เลี้ยงซึ่งมีอายุ 4, 6 และ 8 สัปดาห์ มีความเหมาะสมมากกว่าชิ้นส่วนที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ไม่ว่าจะเลี้ยงบนอาหารวุ้นหรือในอาหารเหลวก็ตาม จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าตาใหม่ที่เกิดขึ้นอาจพัฒนาจากจุดกำเนิดที่มีอยู่ก่อนแล้ว และ/หรือเกิดโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เริ่มเลี้ยงโดยไม่ผ่านแคลลัส เช่นเดียวกับการเกิดราก และพบว่าต้นใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถย้ายออกปลูกในกระถางได้ โดยมีอัตราการอยู่รอดสูงถึง 95 %

นอกจากการศึกษาทางด้านการกระตุ้นให้เกิดต้นและราก จากการใช้สารกระตุ้นการเจริญ-เติบโตดังที่กล่าวมาแล้ว ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการ-เจริญเติบโตขณะทำการเพาะเลี้ยง ดังนี้ Tanaka et al.. (1992) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาชนิดของฟิล์มที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นภาชนะเพื่อการพัฒนาต้นของ Phalaenopsis และ Cymbidium โดยใช้ฟิล์ม 2 ชนิดคือ Neoflon® film (fluorocarbon polymer films) ความหนา 25 μM และ CultuSAK™ (high density polyethylene films) ความหนา 31.8 μM มาทำเป็นภาชนะบรรจุที่แบ่งเป็น 5 ช่องต่อกันแต่ละช่องมีขนาด 6 x 9 นิ้ว เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง(ขนาด 25 มม x 150 มม) พบว่า Phalaenopsis ที่เพาะเลี้ยงใน neoflon film ให้ต้นที่พัฒนาเป็นปกติและมีขนาดต้นที่ใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ CultuSAK™ และในหลอดทดลอง นอกจากนี้แล้วยังมีการทดลองที่ใช้ฟิล์มทั้ง 2 ชนิด มาทำภาชนะเพาะเลี้ยงพืชที่เรียกว่า 'Culture Pack' ขนาดมาตรฐาน 7.5 x 7.5 x 10.5 ซม เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 300 มล. ใน Phalaenopsis และ 500 มล. Cymbidium พบว่าหลังการเพาะเลี้ยง 90 วัน พืชทั้ง 2 ชนิด .ให้ต้นพืชที่เจริญเติบโตใน 'Culture Pack' ที่ทำด้วย neoflon film มีขนาด

ต้นที่ใหญ่และแข็งแรงกว่าต้นพืชที่อยู่ในภาชนะที่ทำจาก CultuSAK™ และในขวดรูปชมพู่ ทั้งนี้เนื่องจาก neoflon film สามารถให้แสงทะลุผ่านได้ดีและมีการถ่ายเทของก๊าซต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าด้วย

หลังจากนั้นในปี 1995 Nagae et al. ได้ทำการศึกษาในทำนองเดียวกันแต่ศึกษาใน Gerbera พันธุ์ Lablinel และพันธุ์ Beatrix อายุ 60 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทำการเพาะเลี้ยงใน 'Culture Pack' ขนาดมาตรฐาน และขนาดใหญ่ 22 x 15 x 10.5 ซม ที่ทำด้วย neoflon film ความหนา 25 μM สำหรับอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงจะใช้อาหารดัดแปลงสูตร Kyoto (Tsukamoto et al.,1963) ที่ไม่มีน้ำตาลโดยใช้ 100 มล ใน 'Culture Pack' ขนาดมาตรฐาน และ 600 มล. สำหรับขนาดใหญ่โดยต้นจะเจริญบน Grodan® Rockwool ที่อยู่ใน 'Culture Pack' เปรียบเทียบกับต้นที่เจริญอยู่ภายในขวดขนาด 500 มล. ในสภาพที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้สภาพ CO_2 ที่ 300 สตล (ppm) พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะเพาะเลี้ยงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและต้นพืชที่เพาะเลี้ยงใน 'Culture Pack' ทั้ง 2 ขนาด มีต้นที่พัฒนาเป็นปกติ มีความแข็งแรงและขนาดใหญ่กว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่เจริญเติบโตในขวด โดยต้นที่เจริญเติบโตภายใต้สภาพที่เพิ่ม CO_2 ภายใน 'Culture Pack' จะมีผลในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการพัฒนาของ Gerbera ทั้ง 2 พันธุ์ นอกจากนี้เมื่อศึกษาด้านกายวิภาคของใบ ยังพบว่ามีจำนวนของปากใบหนาแน่นมากขึ้นในสภาพที่เพิ่ม CO_2 ด้วย