วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 29 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2567
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 29 (No.1) January – April 2024 บทความวิจัย

ผลของความแตกต่างของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ต่อการเพาะเลี้ยงเปราะหูกระต่ายในหลอดทดลอง

Effect of Different Concentration of Plant Growth Regulators on *In Vitro* Culture of *Kaempferia sisaketensis* Picheans.& Koonterm

รัตติยา ทุงจันทร์[1,3,4] สุรพล แสนสุข[2,3,4] และ ปิยะพร แสนสุข[1,3,4*]

Rattiya Thungjan[1,3,4], Surapon Saensouk[2,3,4] and Piyaporn Saensouk[1,3,4*]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย*

[2]*สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย*

[3]*หน่วยวิจัยอนุกรมวิธานพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและการประยุกต์ใช้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย*

[4]*ศูนย์วิจัยเฉพาะทางความหลากหลายพืชวงศ์ขิงและพืชที่มีท่อลำเลียงเพื่อการประยุกต์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย*

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand*

[2]*Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Thailand*

[3]*Plant and Invertebrate Taxonomy and its Application Research Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand*

[4]*Diversity of Family Zingiberaceae and Vascular Plant for Its Applications Research Unit, Mahasarakham University, Thailand*

Received : 20 June 2023, Received in revised form : 30 November 2023, Accepted : 16 December 2023

Available online : 9 January 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์เปราะหูกระต่าย (*Kaempferia sisaketensis* Picheans. & Koonterm) ซึ่งมีสถานภาพเป็นพืชหายาก พืชถิ่นเดียวที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการดำเนินการวิจัย : นำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาด 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติมไซโทไคนิน (BA, kinetin และ TDZ) และออกซิน (NAA) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ย้ายต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ โดยใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างกัน ได้แก่ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลการวิจัย : ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.30 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 14.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่สมบูรณ์เมื่อย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อย้ายปลูกในดินทรายมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100%

สรุปผลการวิจัย : การวิจัยนี้เป็นรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะหูกระต่ายเป็นครั้งแรก จากการศึกษานี้สามารถใช้ในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์เปราะหูกระต่ายไม่ให้สูญพันธุ์

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ; การย้ายปลูก ; เปราะหูกระต่าย ; พืชถิ่นเดียว ; พืชหายาก

Abstract

Background and Objectives : This research studied a propagation protocol of *Kaempferia sisaketensis* Picheans. & Koonterm which is a rare and endemic plant of The Northeast of Thailand using plant tissue culture techniques.

Methodology : Microshoot (1 cm long) of *K. sisaketensis* were cultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with various concentrations of cytokinins (BA, kinetin, and TDZ) and auxin (NAA) for eight weeks. Transferring complete plantlets of *K. sisaketensis* to pots containing soil, sand and soil:sand (1:1) under greenhouse conditions for eight weeks.

Main Results : The results show that culturing the microshoot of *K. sisaketensis* on MS medium supplemented with 1 mg/l kinetin produced the highest number of shoots, which is 5.30 shoots/explant. For root induction, the results show that the highest number of roots were 14.50 roots/explant when microshoots of *K. sisaketensis* was cultured on MS medium augmented with 2 mg/l kinetin and 1 mg/l NAA. After transferring complete plantlets of *K. sisaketensis* to pots containing different types of planting materials under greenhouse conditions for eight weeks, the best survival rate was 100% when transplanting to sand.

Conclusions : This research is the first report on tissue culture of *K. sisaketensis*. This study can be used to propagate and preserve *K. sisaketensis* from extinction.

Keywords : plant tissue culture ; transplantation ; *Kaempferia sisaketensis* Picheans. & Koonterm ; endemic plant ; rare plant

***Corresponding author. E-mail** : pcornukaempferia@yahoo.com

บทนำ

พืชสกุลเปราะ (*Kaempferia* L.) เป็นพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) พบได้ทั่วโลกประมาณ 60 ชนิด กระจายพันธุ์ในเขตร้อนในเขตศูนย์สูตรของทวีปแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และอินเดีย ในประเทศไทยมีรายงานพบพืชสกุลเปราะ 40 ชนิด (Boonma *et al*., 2020; Jenjittikul & Ruchisansakun, 2020) พืชสกุลเปราะเป็นพืชล้มลุกหลายปีที่มีลำต้นใต้ดินหรือเหง้าทอดขนานไปกับพื้นดิน ลำต้นเหนือดินเป็นกาบใบที่หุ้มไปกับลำต้นเทียม (pseudostem) กาบใบสั้น และมี 1-2 ใบ แผ่นใบแบนราบติดพื้นดิน (Saensouk, 2011; Promthep *et al*., 2012) ช่อดอกเกิดโดยตรงจากเหง้า ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวใบด้านล่างมีขนละเอียด แผ่นใบมีสีเขียวตลอดทั้งแผ่น กลีบปากสีม่วง กลางกลีบสีม่วงเข้ม บางชนิดกลีบปากสีขาว กลางกลีบมีแถบสีเหลือง บางชนิดรังไข่เกลี้ยง บางชนิดรังไข่ไม่มีขน (Suvandech & Sookchaloem, 2007) มีรายงานการนำพืชวงศ์ขิงและพืชสกุลเปราะมาใช้ประโยชน์ เช่น ปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เป็นพืชอาหาร และพืชสมุนไพรเนื่องจากมีสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด เปราะหูกระต่าย (*Kaempferia sisaketensis* Picheans. & Koonterm) (Figure 1) เป็นพืชสกุลเปราะวงศ์ขิง เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าสั้น มีใบตั้งตรง 2-4 ใบ สีเขียว ช่อดอกเกิดกลางกลุ่มใบ กลีบปากสีชมพูถึงสีม่วง โคนกลีบสีม่วงเข้ม

เกสรเพศผู้ที่เป็นหมันทั้งสองข้างสีชมพูถึงม่วง เปราะหูกระต่ายมีสถานภาพเป็นพืชหายาก (rare plant) และเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic plant) พบเฉพาะในพื้นที่โล่งจังหวัดศรีสะเกษ ชายแดนไทย-กัมพูชา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเท่านั้น การใช้ประโยชน์นำรากและเหง้าใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน ใบอ่อนรับประทานเป็นผัก (Saensouk, 2011; Picheansoonthon & Koonterm, 2009)

Figure 1 *Kaempferia sisaketensis* Picheans. & Koonterm. (scale bar = 1 cm)

โดยทั่วไปเปราะหูกระต่ายขยายพันธุ์โดยการใช้เหง้า แต่เหง้ามีขนาดเล็ก และสั้นทำให้เพิ่มจำนวนต้นได้น้อย นอกจากนี้เปราะหูกระต่ายยังเจริญเติบโตบนพื้นที่ดินปนลานหินซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการเพิ่มจำนวนต้นพืชในสภาพธรรมชาติ และเปราะหูกระต่ายในหนึ่งปีเจริญเติบโตได้เพียง 5-6 เดือน หลังจากนั้นจะพักการเจริญเติบโต นอกจากนี้ในปัจจุบันสภาพอากาศมีการเปลี่ยนแปลงไปค่อนข้างมาก จึงทำให้ปริมาณประชากรของเปราะหูกระต่ายในธรรมชาติมีปริมาณลดลง โดยเฉพาะในปีที่ฝนตกน้อย จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้ต้นเปราะหูกระต่ายปริมาณมากโดยปราศจากโรค โดยไม่ต้องไปรบกวนต้นพืชในสภาพธรรมชาติ สามารถขยายพันธุ์ได้ตลอดทั้งปีโดยไม่คำนึงถึงฤดูกาล สามารถเพิ่มจำนวนได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว สำหรับพืชสกุลเปราะได้มีการศึกษาการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองหลายชนิด เช่น *K. angustifolia* (Haque & Ghosh, 2018) *K. galanga* (Parida *et al.*, 2010; Mohanty *et al.*, 2011; Ibemhal *et al.*, 2012; Kochuthressia *et al.*, 2012; Bhattacharya & Sen, 2013; Preetha *et al.*, 2013; Sahoo *et al.*, 2014) *K. koratensis* (Saliwan *et al.*, 2022) *K. larsenii* (Pudphong *et al.*, 2015) *K. parviflora* (Kamoltham *et al.*, 2016; Laipaitong *et al.*, 2018; Labrooy *et al.*, 2020) *K. marginata* (Saensouk *et al.*, 2016) และ *K. siamensis* (Nonthalee *et al.*, 2022) แต่ยังไม่มีรายงานการขยายพันธุ์เปราะหูกระต่ายด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานแรกที่ศึกษาการขยายพันธุ์เปราะหูกระต่ายด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยงานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดยอดและรากของเปราะหูกระต่ายและศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมเมื่อย้ายต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การฟอกฆ่าเชื้อเปราะหูกระต่าย

นำหน่ออ่อนเปราะหูกระต่าย ที่เก็บจากพื้นที่ป่า จังหวัดศรีสะเกษ นำมาล้างน้ำประปาให้สะอาดเป็นเวลา 30 นาที ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 0.15% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที หยด Tween 20 ประมาณ 1-2 หยด เพื่อลดแรงตึงผิว และนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยโซเดียมต่อไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0.10% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เพื่อล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออกให้หมด

การชักนำให้เกิดยอด

นำหน่ออ่อนของเปราะหูกระต่ายที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว นำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นสำหรับการชักนำให้เกิดยอด ใช้มีดผ่าตัดตัดตาเหง้าให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร นำตาเหง้าของเปราะหูกระต่ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม N^6-Benzyladenine (BA) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 1-Napthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร วุ้น 8 กรัม/ลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7-5.8 นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำพืชไปเพาะเลี้ยงที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ แสงสีขาว ความเข้มแสง 27 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที

การเพิ่มปริมาณพืช

เปราะหูกระต่ายที่ได้จากขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอด มีปริมาณน้อยจึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณพืชให้ได้ปริมาณมาก เพื่อที่จะนำไปใช้ให้เพียงพอต่อการทดลอง นำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดแยกชิ้นส่วนเป็นต้นเดี่ยว ๆ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอด ทำการเพิ่มจำนวนโดยนำต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์/รอบ เพิ่มปริมาณพืช 3 รอบ เมื่อเพิ่มปริมาณพืชได้ปริมาณมากนำพืชย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชเพื่อปรับสภาพ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาความแตกต่างระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเปราะหูกระต่าย

นำต้นอ่อนปราะหูกระต่าย ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 16 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ขวด ซ้ำละ 1 ขวด โดยวางต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายเพาะเลี้ยงขวดละ 1 ต้น ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

การศึกษาความแตกต่างระดับความเข้มข้นของ kinetin ร่วมกับ NAA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเปราะหูกระต่าย

นำต้นอ่อนปราะหูกระต่าย ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 6-Furfurylaminopurine (kinetin) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 16 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ขวด ซ้ำละ 1 ขวด โดยวางต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายเพาะเลี้ยงขวดละ 1 ต้น ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

การศึกษาความแตกต่างระดับความเข้มข้นของ BA และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเปราะหูกระต่าย

นำต้นอ่อนปราะหูกระต่าย ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ขวด ซ้ำละ 1 ขวด โดยวางต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายเพาะเลี้ยงขวดละ1 ต้น ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

การศึกษาความแตกต่างระดับความเข้มข้นของ kinetin และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเปราะหูกระต่าย

นำต้นอ่อนปราะหูกระต่าย ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ขวด ซ้ำละ 1 ขวด โดยวางต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายเพาะเลี้ยงขวดละ 1 ต้น ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย

การเปรียบเทียบวัสดุปลูกที่เหมาะสมเมื่อย้ายต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเรือนเพาะชำ

นำเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร อายุ 8 สัปดาห์ ขนาดประมาณ 7 เซนติเมตร ที่มียอดและรากที่แข็งแรง จากนั้นนำต้นพืชที่เพาะเลี้ยงมาปรับสภาพภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีการควบคุมแสงและอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายปรับตัวก่อนนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ จากนั้นจึงนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปล้างวุ้นออกให้สะอาดด้วยน้ำประปา 2-3 ครั้ง แยกต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายเป็นต้นเดี่ยว ๆ ไปปลูกในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2565 วัสดุที่ใช้ในการปลูกเปราะหูกระต่ายได้แก่ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (อัตราส่วน 1:1) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ ปลูกต้นอ่อนเปราะหูกระต่าย 1 ต้น ต่อ 1 กระถาง รดน้ำให้ชุ่มด้วยน้ำประปา แล้วใช้ถุงพลาสติกใสคลุมรอบ ๆ กระถางเพื่อควบคุมความชื้นให้แก่ต้นพืช เป็นเวลา

4 สัปดาห์ รดน้ำวันละ 1 ครั้งในเวลาเช้า (08.00-10.00 น.) ปลูกพืชเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบเฉลี่ยโดยใช้เครื่องวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืช (chlorophyll meter SPAD-502 plus) ยี่ห้อ Konica Minolta ประเทศญี่ปุ่น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 16

ผลการวิจัย

ผลของ BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะหูกระต่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นเล็ก เรียว สูง เพิ่มยอดจำนวนมาก ใบเรียวยาว สีเขียวอ่อน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร, BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.50, 3.89, 3.60 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 11.90 ราก/ชิ้นส่วนพืช รากของต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะโคนรากขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม ปลายรากมีสีขาว ยาว มีรากแขนงสีขาวจำนวนมาก แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร, BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 10.80, 10.20, 9.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.22 เซนติเมตร จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 1 & Figure 2)

Table 1 Effects of BA and NAA on shoot and root formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm.

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Average no. of shoots/explant	Average shoot length (cm)	Average no. of roots/explant	Average root length (cm)
0	0	1.38±0.18^{c}	6.88±0.58^{a}	5.63±0.50^{ef}	2.69±0.35^{de}
1	0	3.11±0.70^{abc}	5.97±0.51^{ab}	8.33±0.82^{bcdef}	3.60±0.13^{abc}
2	0	3.50±0.91^{abc}	5.83±0.64^{ab}	8.50±0.92^{bcdef}	3.00±0.18^{bcde}
4	0	2.20±0.39^{bc}	5.80±0.40^{ab}	5.20±0.84^{f}	3.86±0.26^{ab}
1	0.1	3.60±0.79^{abc}	6.14±0.48^{a}	9.40±1.30^{abcd}	3.27±0.17^{bcd}
1	0.2	3.14±0.51^{abc}	4.31±0.30^{c}	7.71±0.84^{bcdef}	2.39±0.23^{e}
1	0.5	2.38±0.42^{bc}	6.29±0.43^{a}	7.63±0.65^{bcdef}	2.92±0.21^{cde}
1	1	2.60±0.54^{bc}	6.57±0.59^{a}	11.90±0.81^{a}	2.70±0.20^{de}
2	0.1	5.40±0.96^{a}	5.81±0.45^{ab}	10.80±1.24^{ab}	3.85±0.26^{ab}
2	0.2	4.50±1.02^{ab}	6.12±0.50^{a}	10.20±1.08^{abc}	4.22±0.25^{a}
2	0.5	3.20±0.66^{abc}	5.19±0.73^{ab}	8.60±0.91^{bcde}	3.67±0.29^{abc}
2	1	3.33±0.76^{abc}	5.62±0.58^{ab}	8.00±1.11^{bcdef}	3.08±0.28^{bcde}
4	0.1	3.50±0.83^{abc}	6.33±0.51^{a}	6.90±0.97^{cdef}	3.83±0.43^{ab}
4	0.2	2.78±0.49^{bc}	5.92±0.48^{ab}	7.44±1.13^{cdef}	3.14±0.25^{bcde}
4	0.5	2.50±0.567^{bc}	5.83±0.49^{ab}	6.13±1.08^{def}	3.22±0.29^{bcde}
4	1	3.89±0.75^{ab}	5.57±0.58^{ab}	9.33±1.03^{abcd}	3.15±0.29^{bcde}

Data show mean±SE. Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p \leq 0.05$, according to DMRT.

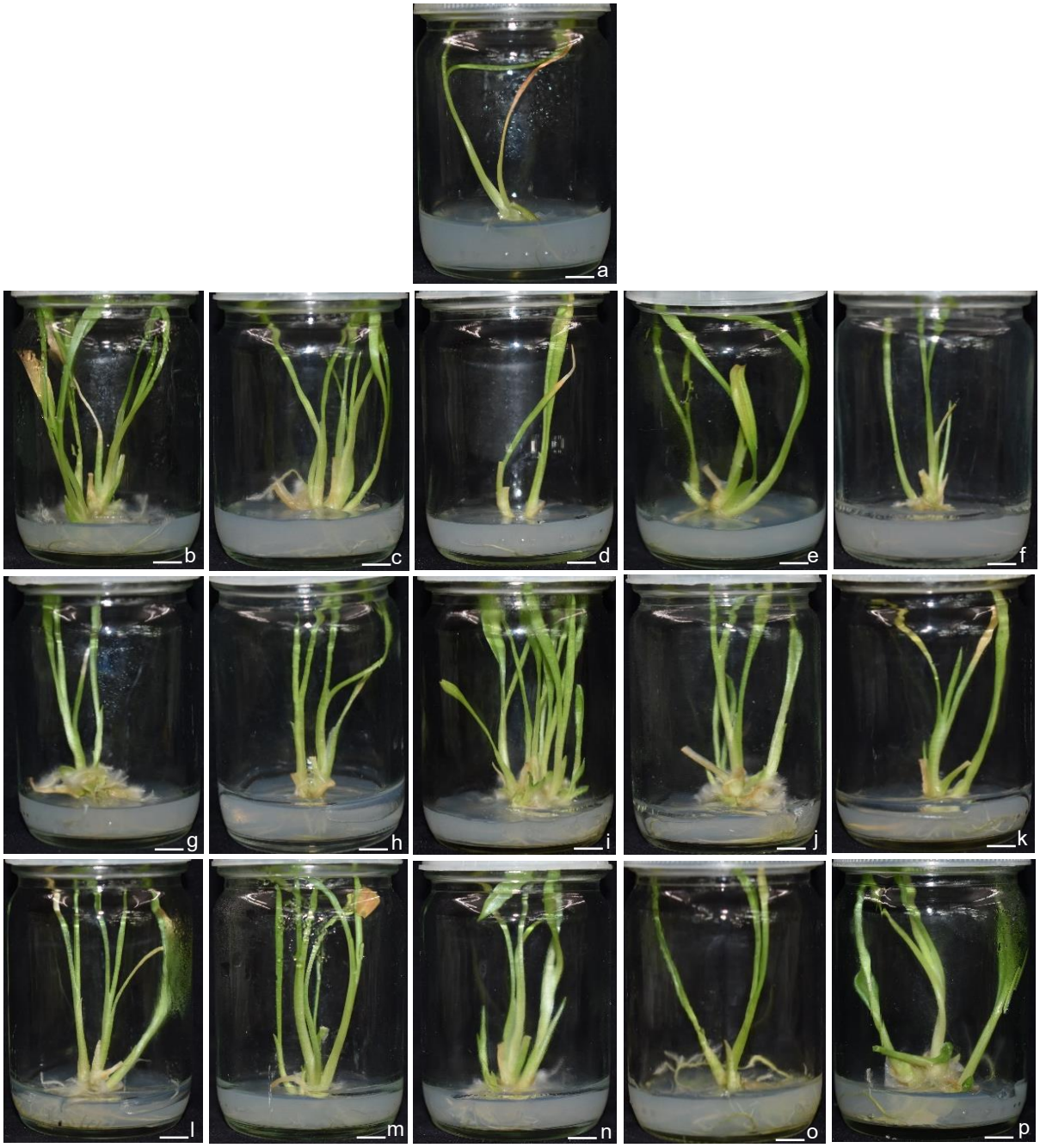

Figure 2 Multiple shoot formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm after eight weeks of culture on MS medium with various concentrations of BA and NAA added. (scale bar 1 cm) **a**. MS (control) **b**. BA 1 **c**. BA 2 **d**. BA 4 **e**. BA 1 + NAA 0.1 **f**. BA 1 + NAA 0.2 **g**. BA 1 + NAA 0.5 **h**. BA 1 + NAA 1 **i**. BA 2 +NAA 0.1 **j**. BA 2 + NAA 0.2 **k**. BA 2 + NAA 0.5 **l**. BA 2 + NAA 1 **m**. BA 4 + NAA 0.1 **n**. BA 4 + NAA 0.2 **o**. BA 4 + NAA 0.5 **p**. BA 4 + NAA 1

ผลของ kinetin ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะหูกระต่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาด 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าใน อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.30 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นอวบ เรียว ยาว สูง เพิ่มยอดจำนวนมาก ใบเรียวยาว มีสีเขียวอ่อน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.00, 4.80, 4.80 ราก/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 14.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช รากของต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีโคนรากใหญ่ สีเขียวเข้ม รากอวบ ปลายรากมีสีขาว มีรากแขนงสีขาวจำนวนมาก แต่ไม่มีแตกต่างทางสถิติจากอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 13.40, 12.60, 11.90 ราก/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.72 เซนติเมตร จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 2 & Figure 3)

ผลของ BA และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะหูกระต่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาด 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.80 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นสั้น อวบ ยอดมีขนาดเล็ก ใบมีขนาดเล็กมาก สีเขียวอ่อน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช, BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัม/ลิตร, NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.00, 4.30, 4.00 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.36 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 7.90 ราก/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับหน่วยทดลองอื่น ๆ ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นเล็ก เรียว ยาว ใบมีสีเขียวอ่อน โคนรากมีขนาดใหญ่ อวบ สีเขียว ปลายรากสีขาว มีรากแขนงสีขาว อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.42 เซนติเมตร จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BA และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จำนวนยอดเฉลี่ย

ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 3 & Figure 4)

Table 2 Effects of kinetin and NAA on shoot and root formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm.

kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Average no. of shoots/explant	Average shoot length (cm)	Average no. of roots/explant	Average root length (cm)
0	0	3.60±0.22^{ab}	6.66±0.10^{a}	10.10±0.71^{cd}	3.27±0.08^{de}
1	0	5.30±0.65^{a}	5.67±0.23^{c}	10.50±1.15^{cd}	2.63±0.16^{e}
2	0	4.80±0.77^{ab}	5.99±0.25^{bc}	11.40±1.12^{bcd}	3.32±0.31^{de}
4	0	4.10±0.55^{ab}	5.93±0.34^{bc}	10.30±0.80^{cd}	3.40±0.13^{de}
1	0.1	5.00±0.73^{ab}	5.65±0.28^{c}	10.50±0.73^{cd}	3.48±0.22^{cde}
1	0.2	3.30±0.30^{b}	6.23±0.25^{abc}	11.40±0.58^{bcd}	3.21±0.08^{d}
1	0.5	4.30±0.40^{ab}	6.34±0.25^{abc}	12.60±0.76^{abc}	4.16±0.29^{b}
1	1	4.00±0.63^{ab}	6.71±0.16^{a}	11.20±0.89^{bcd}	4.72±0.28^{a}
2	0.1	4.80±0.81^{ab}	5.93±0.30^{bc}	10.90±0.48^{bcd}	3.88±0.17^{bcd}
2	0.2	4.50±0.62^{ab}	5.79±0.20^{bc}	13.40±0.71^{ab}	3.33±0.23^{de}
2	0.5	4.50±0.56^{ab}	6.45±0.22^{a}	11.90±0.80^{bcd}	4.06±0.14^{bc}
2	1	3.30±0.42^{b}	6.69±0.16^{a}	14.50±1.06^{a}	3.63±0.19^{bcde}
4	0.1	4.00±0.47^{ab}	6.85±0.11^{a}	10.70±0.73^{bcd}	3.63±0.17^{bcde}
4	0.2	3.70±0.30^{ab}	6.88±0.13^{a}	9.40±0.52^{d}	3.69±0.14^{bcdee}
4	0.5	3.50±0.31^{ab}	6.92±0.75^{a}	10.30±0.45^{cd}	3.46±0.15^{cde}
4	1	3.20±0.33^{b}	6.70±0.21^{a}	11.60±1.25^{bcd}	3.30±0.23^{de}

Data show mean±SE. Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p \leq 0.05$, according to DMRT.

Figure 3 Multiple shoot formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm after eight weeks of culture on MS medium with various concentrations of kinetin and NAA added. (scale bar 1 cm) **a.** MS (control) **b.** kinetin 1 **c.** kinetin 2 **d.** kinetin 4 **e.** kinetin 1 + NAA 0.1 **f.** kinetin 1 + NAA 0.2 **g.** kinetin 1 + NAA 0.5 **h.** kinetin 1 + NAA 1 **i.** kinetin 2 +NAA 0.1 **j.** kinetin 2 + NAA 0.2 **k.** kinetin 2 + NAA 0.5 **l.** kinetin 2 + NAA 1 **m.** kinetin 4 + NAA 0.1 **n.** kinetin 4 + NAA 0.2 **o.** kinetin 4 + NAA 0.5 **p.** kinetin 4 + NAA 1

Table 3 Effects of BA, TDZ and NAA on shoot and root formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm.

BA (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	Average no. of shoots/explant	Average shoot length (cm)	Average no. of roots/explant	Average root length (cm)
0	0	0	5.00±0.54^{ab}	6.36±0.34^{a}	7.90±0.87^{a}	3.18±0.31^{ab}
1	1	0.2	4.30±0.37^{bc}	2.66±0.18^{cd}	2.20±0.47^{bcd}	3.25±0.44^{ab}
2	1	0.2	3.40±0.31^{cde}	2.89±0.18^{cd}	2.70±0.47^{bc}	3.42±0.72^{a}
3	1	0.2	5.80±0.53^{a}	2.29±0.20^{d}	1.20±0.44^{cd}	1.06±0.37^{d}
1	2	0.2	4.00±0.45^{bcd}	3.35±0.30^{cd}	3.20±0.51^{b}	3.08±0.37^{ab}
2	2	0.2	3.60±0.45^{cde}	3.41±0.29^{c}	3.30±0.45^{b}	3.31±0.17^{ab}
3	2	0.2	2.40±0.16^{e}	3.67±0.31^{c}	1.30±0.42^{cd}	1.10±0.32^{d}
1	3	0.2	3.00±0.39^{de}	4.92±0.49^{b}	0.90±0.23^{d}	2.00±0.48^{bcd}
2	3	0.2	2.60±0.22^{e}	3.50±0.40^{c}	1.40±0.31^{cd}	1.93±0.58^{cd}
3	3	0.2	2.80±0.13^{e}	4.80±0.60^{b}	2.40±0.37^{bcd}	2.13±0.26^{ab}

Data show mean±SE. Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p \leq 0.05$, according to DMRT.

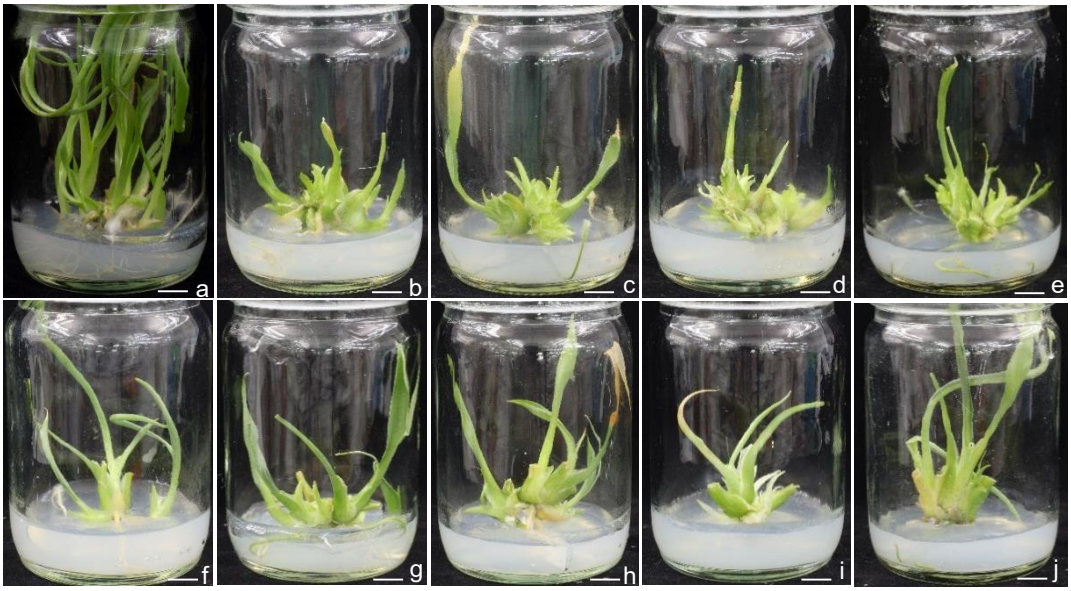

Figure 4 Multiple shoot formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm after eight weeks of culture on MS medium with various concentrations of BA, TDZ and NAA added. (scale bar 1 cm) **a.** MS (control) **b.** BA 1 + TDZ 1 + NAA 0.2 **c.** BA 2+ TDZ 1 + NAA 0.2 **d.** BA 3 + TDZ 1 + NAA 0.2 **e.** BA 1 + TDZ 2 + NAA 0.2 **f.** BA 2 + TDZ 2 + NAA 0.2 **g.** BA 3 + TDZ 2 + NAA 0.2 **h.** BA 1 + TDZ 3 + NAA 0.2 **i.** BA 2 + TDZ 3 + NAA 0.2 **j.** BA 3 + TDZ 3 + NAA 0.2

ผลของ kinetin และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของเปราะหูกระต่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาด 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.50 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นอวบ มียอดขนาดเล็ก ใบขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.40, 4.40, 4.00 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.66 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 6.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นเล็ก ยาว มีใบที่เล็ก สีเขียวอ่อน โคนรากมีขนาดใหญ่ อวบ สีเขียว ปลายรากมีสีขาว มีรากแขนงสีขาวจำนวนมาก รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 3.40, 3.10, 2.70 ราก/ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.45 เซนติเมตร จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 4 & Figure 5)

ผลของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร อายุ 8 สัปดาห์ สูงประมาณ 8 เซนติเมตร ที่ปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในวัสดุปลูก 3 ชนิด คือ ดินร่วน ดินทราย และดินร่วนผสมดินทราย (1:1) เมื่อทำการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายจะเริ่มปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี มีลำต้นตั้งตรง ใบเริ่มแผ่แบนและกางออกรับแสง เริ่มมีการแตกยอดใหม่เกิดขึ้น เริ่มมีหน่ออ่อน เมื่อย้ายออกปลูกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ปลูกในดินทรายมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100% จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2.85 ยอด/ต้น ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 18.27 เซนติเมตร จำนวรากเฉลี่ยมากที่สุด 6.75 ราก/ต้น ความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.66 เซนติเมตร จำนวนรากสะสมอาหารเฉลี่ยมากที่สุด 4.05 ราก/ต้น ความยาวรากสะสมอาหารเฉลี่ยมากที่สุด 4.87 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางรากสะสมอาหารเฉลี่ยมากที่สุด 0.32 เซนติเมตร จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด 11.45 ใบ/ต้น และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบเฉลี่ยมากที่สุด 32.70 SPAD unit รองลงมาคือต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ย้ายปลูกในดินร่วนผสมดินทราย

มีอัตราการรอดชีวิต 65% ส่วนต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ย้ายปลูกในดินร่วนมีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด 45% เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่า จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย จำนวนรากสะสมอาหารเฉลี่ย ความยาวรากสะสมอาหารเฉลี่ย เส้นผ่าศูนย์กลางรากสะสมอาหารเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 5 & Figure 6)

Table 4 Effects of kinetin, TDZ and NAA on shoot and root formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm.

kinetin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	Average no. of shoots/explant	Average shoot length (cm)	Average no. of roots/explant	Average root length (cm)
0	0	0	3.00±0.39^{b}	6.66±0.11^{a}	6.50±0.37^{a}	4.45±0.16^{a}
1	1	0.2	4.00±0.39^{ab}	2.83±0.44^{d}	1.70±0.26^{d}	3.37±0.53^{ab}
2	1	0.2	3.60±0.16^{ab}	3.00±0.25^{d}	2.00±0.36^{cd}	3.98±0.31^{ab}
3	1	0.2	3.50±0.48^{ab}	3.49±0.34^{cd}	2.40±0.34^{bcd}	3.86±0.42^{ab}
1	2	0.2	4.40±0.27^{a}	2.54±0.18^{d}	2.40±0.34^{bcd}	3.65±0.33^{ab}
2	2	0.2	3.70±0.42^{ab}	3.02±0.34^{d}	2.70±0.30^{bcd}	3.10±0.41^{b}
3	2	0.2	4.40±0.40^{a}	3.24±0.30^{d}	2.00±0.47^{cd}	2.75±0.56^{b}
1	3	0.2	3.60±0.45^{ab}	4.28±0.43^{bc}	2.20±0.33^{cd}	3.30±0.32^{ab}
2	3	0.2	4.50±0.43^{a}	4.56±0.37^{b}	3.10±0.48^{bc}	3.04±0.26^{b}
3	3	0.2	3.10±0.31^{b}	4.87±0.29^{b}	3.40±0.43^{b}	3.63±0.45^{ab}

Data show mean±SE. Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p \leq 0.05$, according to DMRT.

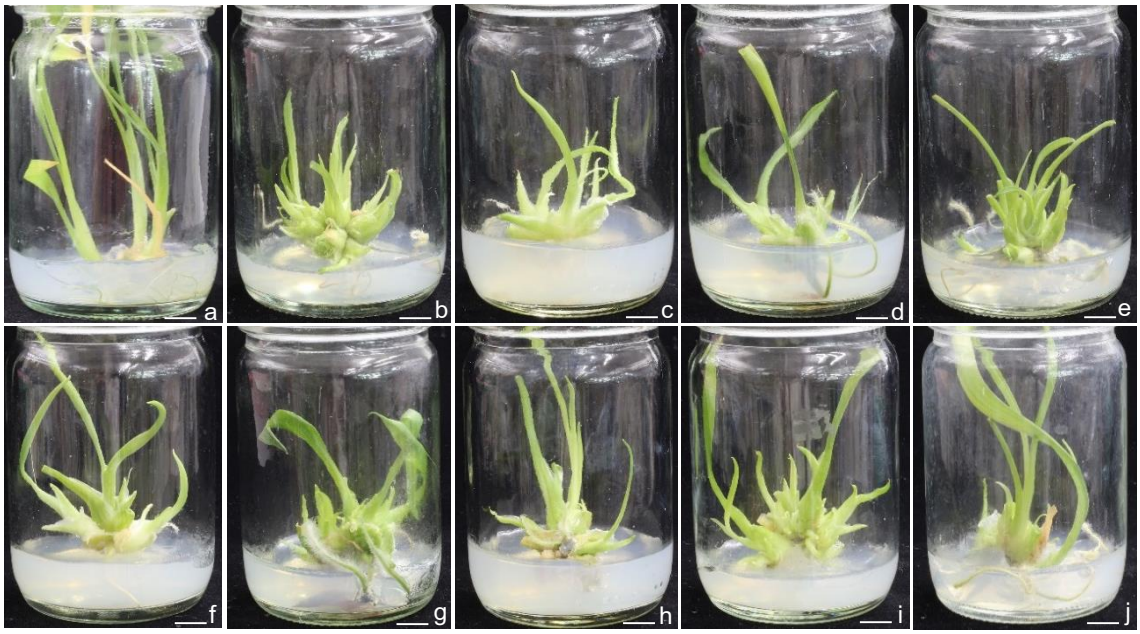

Figure 5 Multiple shoot formation of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm after eight weeks of culture on MS medium with various concentrations of kinetin, TDZ and NAA added. (scale bar 1 cm) **a.** MS (control) **b.** kinetin 1 + TDZ 1 + NAA 0.2 **c.** kinetin 2+ TDZ 1 + NAA 0.2 **d.** kinetin 3 + TDZ 1 + NAA 0.2 **e.** kinetin 1 + TDZ 2 + NAA 0.2 **f.** kinetin 2 + TDZ 2 + NAA 0.2 **g.** kinetin 3 + TDZ 2 + NAA 0.2 **h.** kinetin 1 + TDZ 3 + NAA 0.2 **i.** kinetin 2 + TDZ 3 + NAA 0.2 **j.** kinetin 3 + TDZ 3 + NAA 0.2

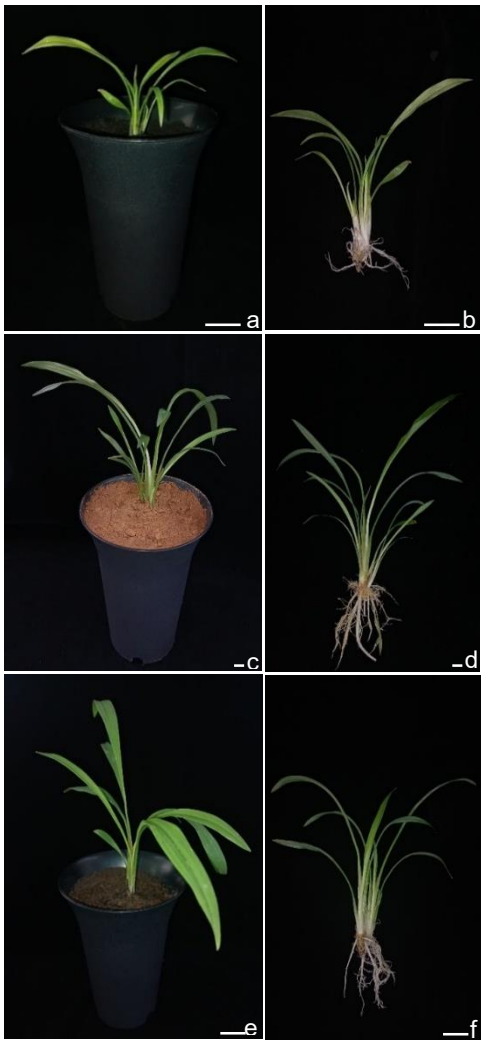

Figure 6 Effects of different potting mixtures (**a-b**) soil (**c-d**) sand (**e-f**) soil : sand eight weeks after transplantation. (scale bar = 1 cm)

Table 5 Effect of potting media on plantlet performance of *K. sisaketensis* Picheans. & Koonterm after eight weeks of acclimatization.

Potting media	Percentage of surviving plantlets	Average no. of shoots/explant	Average shoot length (cm)	Average no. of roots/explant	Average root length (cm)	Average no. of storage root	Average length of storage root (cm)	Average diameter of storage root (cm)	Average no. of leaves	Average total chlorophyll content (SPAD unit)
soil	45	1.70±0.45^{b}	5.25±1.36^{c}	4.80±1.22^{a}	1.53±0.31^{b}	1.75±0.46^{b}	0.90±0.24^{b}	0.10±0.02^{b}	7.15±1.84^{b}	10.26±2.61^{c}
sand	100	2.85±0.15^{a}	18.27±0.60^{a}	6.75±0.42^{a}	4.66±0.29^{a}	4.05±0.17^{a}	4.87±0.51^{a}	0.32±0.02^{a}	11.45±0.72^{a}	32.70±1.13^{a}
soil : sand	65	2.18±0.20^{ab}	9.90±1.64^{b}	5.05±0.80^{a}	2.00±0.52^{b}	2.55±0.45^{b}	1.76±0.46^{b}	0.15±0.03^{b}	8.25±1.32^{ab}	20.18±3.27^{b}

Data show mean±SE. Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p \leq 0.05$, according to DMRT.

วิจารณ์ผลการวิจัย

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.40 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลักษณะลำต้นเล็ก ใบมีสีเขียว ใบเล็ก ซึ่ง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโทไคนินมีผลต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์ RNA สังเคราะห์คลอโรฟิลล์ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และควบคุมการเกิดและพัฒนาอวัยวะใหม่ จึงทำให้เกิดยอดใหม่ขึ้น (George *et al*., 2008) และ BA มีคุณสมบัติเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (Fuadi *et al*., 2014) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Saliwan *et al*. (2022) เพาะเลี้ยง *Kaempferia koratensis* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.0 ยอด/ชิ้นส่วนพืช สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nonthalee *et al*. (2022) เพาะเลี้ยง *Kaempferia siamensis* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 7.1 ยอด/ชิ้นส่วนพืช อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 11.90 ราก/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Nonthalee *et al*. (2022) เพาะเลี้ยง *K. siamensis* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ย 28.3 ราก/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจากงานวิจัยของ Pudphong *et al*. (2015) เพาะเลี้ยง *Kaempferia larsenii* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ย 8.80 ราก/ชิ้นส่วนพืช Bhatt *et al*. (2012) เพาะเลี้ยง *Kaempferia galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 31.30 ราก/ชิ้นส่วนพืช Shirin *et al*. (2000) เพาะเลี้ยง *K. galanga* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 12 ไมโครโมล ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 22.9 ราก/ชิ้นส่วนพืช จากการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ต้นอ่อนมีลำต้นที่เรียวยาว ใบมีสีเขียวสด จำนวนรากและความยาวรากมาก มีรากที่แข็งแรง เนื่องจาก NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มออกซินสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การยืดขยายตัวของเซลล์และกระตุ้นการเกิดราก (Mohammad *et al*., 2017)

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.30 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ลักษณะลำต้นอวบ ยาว แข็งแรง ใบใหญ่ สีเขียว เนื่องจาก kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโทไคนินที่มีผลในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ ช่วยในการเจริญของต้น การเกิดหน่อเล็ก ๆ และการเกิดยอด (Kanchanapoom, 1999) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Pudphong *et al*. (2015) เพาะเลี้ยง *K. larsenii* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอด 3.20 ยอด/ชิ้นส่วนพืช Kochuthressia *et al*. (2012) เพาะเลี้ยง *K. galanga* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอด 6.42 ยอด/ชิ้นส่วนพืช Bhattacharya & Sen (2013) เพาะเลี้ยง *K. galanga* เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอด 3.44 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจากงานวิจัยของ Preetha *et al*. (2013) เพาะเลี้ยง *K. galanga* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 4 มิลลิกรัม/

ลิตร ชักนำให้เกิดยอด 2.71 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และพบว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 14.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช จะเห็นได้ว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ร่วมกับ NAA มีรากที่แข็งแรง โคนรากใหญ่ อวบ เมื่อเติม NAA ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดรากเพิ่มขึ้น เพราะ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มออกซินสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดราก (George *et al*., 2008) จากการศึกษาการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA และ kinetin ร่วมกับ NAA ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของต้นอ่อนเปราะหูกระต่าย พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียวจะกระตุ้นการเกิดยอดและรากได้น้อยกว่าการเติมร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ เนื่องจาก NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่สังเคราะห์ขึ้นมาจึงไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ ปริมาณที่ใช้จึงน้อย (Kanchanapoom, 1999) ในขณะเดียวกันเมื่อเติม kinetin เพียงอย่างเดียวในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัม/ลิตร จะทำให้เกิดยอดได้ดีเมื่อเติมร่วมกับ NAA จะทำให้เกิดรากได้ดีกว่าการเติม kinetin เพียงอย่างเดียว ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ร่วมกับ NAA ทำให้ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแข็งแรง ลำต้นอวบ ยาว ใบใหญ่และยาวกว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นจะต้องมีการควบคุมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในปริมาณที่เหมาะสมหากใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่สูงเกินไป จะทำให้ยับยั้งการเกิดยอดใหม่ และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิด ทำให้เซลล์พืชเป็นอันตรายได้ (Mok & Mok, 1994)

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ TDZ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.80 ยอด/ชิ้นส่วนพืช พบว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลำต้นสั้น อวบ ยอดและใบขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน และพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ TDZ สูงขึ้นต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีความยาวยอดและจำนวนรากลดลง เนื่องจาก TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโทไคนิน มีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดต้นพิเศษ (adventitious shoot) (Lu, 1993) และ TDZ มีความเสถียรและออกฤทธิ์คล้าย adenine-type cytokinins ส่วนมากในความเข้มข้นที่ต่ำ TDZ จึงมีประสิทธิภาพสูง (Mok *et al*., 1987) แต่อย่างไรก็ตาม TDZ มีผลยับยั้งการเกิดรากและความยาวยอด (Huetteman & Preece, 1993) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัย Saensouk *et al*. (2016) เพาะเลี้ยง *Kaempferia marginata* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอด 4.90 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจากงานวิจัยของ Phukabhin *et al*. (2016) เพาะเลี้ยง *Curcuma pierreana* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.20 ยอด/ชิ้นส่วนพืช Nonthalee *et al*. (2017) เพาะเลี้ยง *Globba annamensis* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.43 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.36 เซนติเมตร และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 7.90 ราก/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งพบว่ามีจำนวนรากเฉลี่ยมากกว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ TDZ ร่วมกับ NAA ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Saliwan *et al*. (2022) เพาะเลี้ยง *K. koratensis* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร

MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 7.40 ราก/ชิ้นส่วนพืช จากการทดลองครั้งนี้ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ TDZ ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดได้ดี แต่ยอดมีขนาดเล็ก และเกิดรากจำนวนน้อย ทั้งนี้มีรายงานเพาะเลี้ยงพืชวงศ์ขิงในอาหารที่เติม TDZ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงมีขนาดเล็ก และเกิดรากจำนวนน้อย ได้แก่ *Alpinia galanga* (Baradwaj *et al*., 2017) *Curcuma soloensis* (Zhang *et al*., 2011) และ *Kaempferia parviflora* (Park *et al*., 2021)

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin และ TDZ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.50 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีลำต้นและยอดสั้น ใบเล็ก ซึ่งพบว่ามีจำนวนยอดมากกว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ที่เกิดยอด 3 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เนื่องจาก kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโทไคนิน มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอด การขยายของเซลล์และกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (Kanchanapoom, 1999) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Reena *et al*. (2015) นำตายอดของ *Globba marantina* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 9.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช แตกต่างจากงานวิจัยของ Yaowachai *et al*. (2020) นำยอดอ่อนของ *Globba globulifera* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 6.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช Parida *et al*. (2018) นำตาข้างของ *G. marantina* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 9.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.66 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 6.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช และความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.45 เซนติเมตร รากมีขนาดใหญ่ อวบ สีเขียว ปลายรากมีสีขาว ในการทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin และ TDZ ร่วมกับ NAA จะส่งเสริมการชักนำให้เกิดยอดได้ดี แต่ยอดที่ได้มีขนาดเล็กและพบการเกิดรากค่อนข้างน้อย ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะทำให้พืชเจริญเติมโตได้ดีนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ชิ้นส่วนพืช ชนิดพืช สายพันธุ์พืช และระยะการพัฒนาของพืช

เมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร อายุ 8 สัปดาห์ ทำการปรับสภาพก่อนย้ายออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการย้ายออกปลูกในวัสดุปลูก 3 ชนิด **ได้แก่ ดินร่วน ดินทราย** และดินร่วนผสมดินทราย (1:1) พบว่าต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ปลูกในดินทรายมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100% รองลงมาคือต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ย้ายลงปลูกในดินร่วนผสมดินทราย (1:1) มีอัตราการรอดชีวิต 65% ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ย้ายลงปลูกในดินร่วน มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด 45% ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Saensouk *et al*. (2016) ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *K. marginata* ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในแกลบเผาผสมดินทราย (1:1) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อน *K. marginata* มีอัตราการรอดชีวิต 100% มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 8.25 ยอด/ต้น ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 9.49 เซนติเมตร แตกต่างจากงานวิจัยของ Kochuthressia *et al*. (2012) ศึกษาการ

ย้ายต้นอ่อน *K. galanga* ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกในดิน ดินทราย และปุ๋ยคอก (1:1:2) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อน *K. galanga* มีอัตราการรอดชีวิต 100% แตกต่างจากงานวิจัยของ Bhattacharya & Sen (2013) ศึกษาการย้ายต้นอ่อน *K. galanga* ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำในดินผสมทราย (1:1) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อน *K. galanga* มีอัตราการรอดดชีวิต 94% จากการทดลองในครั้งนี้ต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ สามารถสรุปได้ว่าวัสดุปลูกที่เหมาะสมที่สุด คือ ดินทราย เนื่องจากต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100% เนื่องจากดินทรายที่ใช้เป็นดินจากพื้นที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ดินมีสีเหลือง เนื้อดินมีการเกาะตัวกันหลวม ๆ เนื้อดินเป็นเม็ดเดี่ยว ๆ ระบายน้ำได้ดี และต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ปลูกในดินร่วนผสมดินทราย (1:1) มีอัตราการรอดชีวิตรองลงมาคือ 65% ดินร่วนที่ใช้เป็นดินสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยขี้วัวนม แกลบดำ และดิน ซึ่งดินร่วนมีสีดำร่วนซุย เนื้อดินค่อนข้างละเอียดนุ่มมือและอุ้มน้ำได้ดี ส่วนต้นอ่อนที่ย้ายปลูกในดินร่วนมีอัตราการรอดชีวิต 45% และมีการเจริญเติบโตไม่ค่อยดี ได้แก่ จำนวนยอด ความยาวยอด ความยาวราก จำนวนรากสะสมอาหาร ความยาวรากสะสมอาหาร เส้นผ่าศูนย์กลางรากสะสมอาหาร จำนวนใบ และปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบเมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ย้ายปลูกในดินทรายและดินร่วนผสมดินทราย ทั้งนี้ดินทรายนั้นอาจไม่เหมาะสำหรับการปลูกพืชทุกชนิด เนื่องจากพืชบางชนิดมีลักษณะทางกายภาพ ลักษณะของนิเวศวิทยา และลักษณะวิสัยที่แตกต่างกัน การเลือกใช้วัสดุปลูกที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญเป็นอย่างมากในการย้ายพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเรือนเพาะชำ

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปราะหูกระต่ายเป็นครั้งแรก โดยนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายขนาด 1 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโทไคนิน (BA, kinetin และ TDZ) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชออกซิน (NAA) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดของเปราะหูกระต่าย ต้นอ่อนมีลำต้นขนาดใหญ่ ยาว ใบใหญ่ สมบูรณ์แข็งแรง ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.30 ยอด/ชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด 14.50 ราก/ชิ้นส่วนพืช และเมื่อนำต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในดินทราย พบอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100% จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเปราะหูกระต่ายในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการขยายพันธุ์ นำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ศึกษาสรรพคุณทางยา ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าจากต้นเปราะหูกระต่าย นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมเปราะหูกระต่าย ซึ่งเป็นพืชที่มีสถานภาพเป็นพืชหายากและพืชถิ่นเดียวของประเทศไทยให้คงอยู่อย่างยั่งยืนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะ

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ ดร. กสานติ์ หาญชนะ ดร. สุกัญญา นนทะลี และคุณฐนันดร์ศักดิ์ เพชรภักดี ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Baradwaj, R. G., Rao, M. V. & Senthil, K. T. (2017). Curbing actinomycetes and thidiazuron enhanced micropropagation in the rare *Alpinia galanga*–a medicinal Zingiber. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *10*(7), 1-6.

Bhatt, A., Kean, O. B. & Keng, C. L. (2012). Sucrose, benzylaminopurine and photoperiod effects on *in vitro* culture of *Kaempferia galanga* Linn. *Plant Biosystems, 146*(4), 900-905.

Bhattacharya, M. & Sen, A. (2013). *In vitro* regeneration of pathogen free *Kaempferia galanga* L. - a rare medicinal plant. *Research in Plant Biology*, *3*(3), 24-30.

Boonma, T., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2020). Two new species of *Kaempferia* L. (Zingiberaceae) from Thailand. *Taiwania*, *65*(3), 371-381.

Fuadi, M., Mohamed, M. T. M., Salleh, N. S., Anwar, M. P., Awang, Y. & Fauzi, R. M. (2014). Effect of different concentrations of benzyladenine and frequency of watering on growth and quality of *Dracaena sanderiana* and *Codiaeum variegatum*. *Journal of Environmental Biology*, *35*(6), 1047-1052.

George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Netherland: The Background Springer.

Haque, S. M. & Ghosh, B. (2018). Micropropagation of *Kaempferia angustifolia* Roscoe - an aromatic, essential oil yielding, underutilized medicinal plant of Zingiberaceae family. *Journal of Crop Science & Biotechnology, 21*(2), 147-153.

Huetteman, C. A. & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *33*, 105-119.

Ibemhal, A., Laishram, J., Dhananjoy, C., Naorem, B. & Toijam, R. (2012). *In vitro* induction of multiple shoot & root from the rhizome of *Kaempferia galanga* L. *NeBIO-An International Journal of Environment & Biodiversity, 3*(3), 46-50.

Jenjittikul, T. & Ruchisansakun, S. (2020). *Kaempferia albiflora* (Zingiberaceae), a new species from Thailand. *Kew Bulletin*, *75*(1), 1-5.

Kamoltham, M., Phumkonsan, S. & Chanapan, S. (2016). Tissue culture of herbal plant, *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, *3*, *74-78*. (in Thai)

Kanchanapoom, K. (1999). *Plant Tissue Culture*. Bangkok: Chulalongkorn University Press. (in Thai)

Kochuthressia, K. P., Britto, S. J., Jaseentha, M. O. & Raphael, R. (2012). *In vitro* antimicrobial evaluation of *Kaempferia galanga* L. rhizome extract. *American Journal Biotechnology Molecular Sciences*, *2*(1), 1-5.

Labrooy, C., Abdullah, T. L. & Stanslas, J. (2020). Influence of N6-benzyladenine and sucrose on *in vitro* direct regeneration and microrhizome induction of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker, an important ethnomedicinal herb of Asia. *Tropical Life Sciences Research*, *31*(1), 123-139.

Laipaitong, K., Te-chato, S. & Khawniam, T. (2018). Plant regeneration of black galingale derived from shoot culture. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, *5*(1), 13-18. (in Thai)

Lu, C. Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *29*(1), 92-96.

Mohammad, M. K., Mohd, Z., Nik, N. N., & Nashriyah, M. A. T. (2017). Effects of Naphthalene acetic acid (NAA) on the plant growth and sugars effects on the cut flowers Mokara Chark Kuan orchid. *BioScience Journal*, *33*(1), 19-30.

Mohanty, S., Parida, R., Singh, S., Joshi, R., Subudhi, E. & Nayak, S. (2011). Biochemical & molecular profiling of micropropagated & conventionally grown *Kaempferia galanga*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, *106*(1), 39-46.

Mok, D. W. & Mok, M. C. (1994). Cytokinin Schemistry, Activity, and Function. Florida: CRC Press.

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.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497.

Nonthalee, S., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2017). *In vitro* propagation of *Globba annamensis* Gagnep. for conservation of rare plant species in Thailand. *KKU Science Journal*, *45*(4), 858-872. (in Thai)

Nonthalee, S., Maneechai, S., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2022). *In vitro* propagation, microrhizome induction, and evaluation of genetic variation by RAPD markers of *Kaempferia siamensis* Sirirugsa. *Propagation of Ornamental Plants*, *22*(1), 11-13.

Parida, R., Mohanty, S., Kuanar, A. & Nayak, S. (2010). Rapid multiplication & *in vitro* production of leaf biomass in *Kaempferia galanga* through tissue culture. *Electronic Journal of Biotechnology, 13*(4), 1-8.

Parida, R., Mohanty, S. & Nayak, S. (2018). *In vitro* plant regeneration potential of genetically stable *Globba marantina* L., Zingiberaceous species and its conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *88*(1), 321-327.

Park, H. Y., Kim, K. S., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jekő, J., Adaikalam, K., Song, K., Kim, D.M. & Sivanesan, I. (2021). Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker: Phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities. *Plants*, *10*(4), 1-24.

Phukabhin, B., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2016). Tissue culture of *Curcuma pierreana* Gagnep. for conservation of rare plant in Thailand. *KKU Science Journal*, *44*(2), 294-306. (in Thai)

Picheansoonthon, C. & Koonterm, S. (2009). A new species of *Kaempferia* L. (Zingiberaceae) from Northeastern Thailand. *Taiwania*, *54*(1), 52-56.

Preetha, T., Hemanthakumar, A. & Krishnan, P. (2013). Shoot tip cryopreservation by vitrification in *Kaempferia galanga* L. an endangered, overexploited medicinal plant in tropical asia. *IOSR Journal of Pharmacy & Biological Science*, *8*(3), 19-23.

Promthep, K., Sanpote, P. & Kamol, P. (2012). A taxonomic survey of Zingiberaceae species in Huai Kha Khaeng wildlife sanctuary, Uthai Thani Province. *Naresuan Phayao Journal*, *5*(1), 1-7. (in Thai)

Pudphong, J., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2015). *In vitro* propagation of *Kaempferia larsenii* Sirirugsa for conservation of rare plant species in Thailand. *KKU Science Journal*, *43*(4), 673-687. (in Thai)

Reena, P., Sujata, M. & Sanghamitra, N. (2015). Rapid and stable propagation of *Globba marantina* L., an important medicinal plant of family Zingiberaceae. In *Annual International Conference on Advances in Biotechnology*. (pp 2251-2489). India: Singapore.

Saensouk, P., Muangsan, N., Saensouk, S. & Sirinajun, P. (2016). *In vitro* propagation of *Kaempferia marginata* Carey ex Roscoe, a native plant species to Thailand. *Journal of Animal & Plant Sciences, 26*(5), 1405-1410.

Saensouk, S. (2011). Endemic and rare plant of ginger family in Thailand. *KKU Research Journal*, *16*(1), 306-330. (in Thai)

Sahoo, S., Parida, R., Singh, S., Padhy, R. N. & Nayak, S. (2014). Evaluation of yield, quality & antioxidant activity of essential oil of *in vitro* propagated *Kaempferia galanga* Linn. *Journal of Acute Disease, 3*(2), 124-130.

Saliwan, S., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2022). *In vitro* propagation of *Kaempferia koratensis* Picheans., an endemic plant of Thailand. Koch Cha Sarn Journal of Science, *44*(1), 1-13. (in Thai)

Shirin, F., Kumar, S. & Mishra, Y. (2000). *In vitro* plantlet production system for *Kaempferia galanga*, a rare Indian medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *63*, 193-197.

Suvandech, K. & Sookchaloem, D. (2007) Systematic studies of Zingiberaceae in Thong Pha Phum forest, Kanchanaburi Province. In *BRT Research Reports 2007.* (pp197-208). Thailand: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. (in Thai)

Yaowachai, W., Saensouk, S. & Saensouk, P. (2020). *In vitro* propagation and determination of total phenolic compounds, flavonoid contents and antioxidative activity of *Globba globulifera* Gagnep. *Pharmacognosy Journal*, *12*(6), 1740-1747.

Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G. & Wu, G. (2011). Direct and callus-mediated regeneration of *Curcuma soloensis* Valeton (Zingiberaceae) and *ex vitro* performance of regenerated plants. *Scientia Horticulturae*, *130*(4), 899-905.