การประชุมวิชาการระดับชาติ เกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ครั้งที่ 8
The 8th King Mongkut's Agriculture Conference: KMAC 2025

การอนุรักษ์ขิงพระพุทธบาท (*Zingiber brachystachys*) พืชถิ่นเดียวของไทยในสภาพปลอดเชื้อ

พัฒน์นรี รักษ์คิด* พัชร ปิริยะวนิตร และปราไมทย์ ไตรบุญ

บทคัดย่อ

การอนุรักษ์ขิงพระพุทธบาท (*Zingiber brachystachys*) พืชวงศ์ขิงซึ่งจัดเป็นพืชถิ่นเดียวของไทยที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะในธรรมชาติบริเวณพื้นที่จำกัด และพืชชนิดนี้มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ การอนุรักษ์ทรัพยากรพืชถิ่นเดียวที่อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเชิงเศรษฐกิจในอนาคตโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งจะมีส่วนช่วยในการเก็บรักษาพรรณพืชเฉพาะถิ่นไม่ให้สูญหาย จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและอนุรักษ์ต้นขิงพระพุทธบาทในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจำนวน 12 สูตร พบว่าอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่แข็งแรงสมบูรณ์ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เฉลี่ย 20.9 ยอด/ชิ้นส่วน และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตจำนวน 12 สูตร พบว่าสามารถชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อได้นานมากกว่า 8 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสองสูตร คือ ½MS หรือ ¼MS ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล.

Abstract

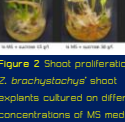
Zingiber brachystachys, an endemic species found in a specific area of Thailand with a limited distribution in natural conditions, is classified in Zingiberacaeae Family. This species is asexually propagated. The conservation of endemic plant is crucial to the preservation of rare species having economic potential. This study was conducted to apply tissue culture techniques to the multiplication and the conservation of this species. Micropropogation and *in vitro* conservation of *Z. brachystachys* were done by using various concentrations of plant growth regulators, media and sucrose. The result indicated that the highest shoot number of *Z. brachystachys* from MS medium supplemented with 3 mg/l BA was 20.9 shoots per explant. After being cultured with 12 media formulations, it was found that the most suitable media for slow growth storage of *Z. brachystachys* was ½MS or ¼MS supplemented with 15 g/l sucrose. This species can survive for more than 8 months without any subculture in these 2 media formulations.

คำนำ

ขิงพระพุทธบาท (*Zingiber brachystachys* Triboun & K. Larsen) พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) พบถิ่นเดียวของไทยบริเวณป่าไผ่บนเขาหินปูน อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี (Triboun et al., 2014) พบในพื้นที่จำกัดซึ่งมีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นหนึ่งในวิธีการที่สำคัญที่จะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่พบยากในสภาพธรรมชาติ ส่วนการชะลอการเจริญเติบโต (*in vitro* slow growth) เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ที่ระยะเวลาสั้นหรือปานกลางด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำเพื่อลดการย้ายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนถ่ายอาหารบ่อยๆ การปรับลดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต หรือการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อระดับ osmotic pressure ในเซลล์พืช ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีเพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำไปใช้สำหรับการวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชพระพุทธบาทในสภาพธรรมชาติสำหรับการใช้ประโยชน์ และเป็นส่วนหนึ่งในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืชของไทย

วิธีการศึกษา

รวบรวมตัวอย่างต้นขิงพระพุทธบาท จากบริเวณอำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี



การฟอกฆ่าเชื้อ (Sterilization)

ฟอกด้วยคลอรอกซ์เข้มข้น 15 และ 20% นาน 10, 15 และ 20 นาที ตัดหน่ออ่อนขนาด 1 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS บันทึกจำนวนต้นที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ คำนวณอัตราการรอดชีวิต

การชักนำให้เกิดยอด (Shoot multiplication)

เพาะเลี้ยงปลายยอดหน่ออ่อนขนาด 1 ซม. บนอาหาร MS ที่เติม NAA และ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 12 สูตร นาน 3 เดือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ

การชะลอการเจริญเติบโต (*in vitro* slow growth)

เพาะเลี้ยงปลายยอดหน่ออ่อนขนาด 1 ซม. บนอาหารเพาะเลี้ยงที่มี MS ความเข้มข้น 3 ระดับ ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 4 ระดับ วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของอาหาร MS และ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส รวม 12 สูตร จำนวน 4 ซ้ำ

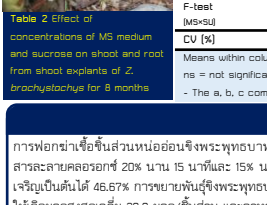


Figure 2 Shoot proliferation of *Z. brachystachys*' shoot explants cultured on difference concentrations of MS medium and sucrose for 8 months

การชะลอการเจริญเติบโตของต้นขิงพระพุทธบาท พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 45 ก/ล นาน 8 เดือนจะทำให้แตกยอดใหม่เฉลี่ย 7.8 ยอด/ชิ้นส่วน ยอดมีสีเหลืองลักษณะต้นยืด ส่วนหน่ออ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 และ 60 ก/ล พบว่ามีจำนวนยอดน้อยกว่าอาหารสูตรมาตรฐานที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก/ล โดยเมื่อเติมน้ำตาล 60 ก/ล ต้นที่ได้มีสีน้ำตาลเหลืองลักษณะสั้นเตี้ย ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชะลอการเจริญเติบโตเพื่อการอนุรักษ์ต้นขิงพระพุทธบาทในสภาพปลอดเชื้อ คือสูตรอาหารที่ปรับระดับความเข้มข้น MS ลงเป็น ½MS และ ¼MS และลดน้ำตาลซูโครสเหลือเพียง 15 ก./ล. จะทำให้ได้ต้นขิงพระพุทธบาทที่มีลักษณะแข็งแรงสีเขียวเข้ม เนื่องจากความเข้มข้นอาหาร MS ที่ลดลงเป็น ½MS หรือ ¼MS เป็นการลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงจากอาหาร MS สูตรมาตรฐานจะทำให้พืชดึงสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร MS full-strength (Nirmal et al., 2000)

Table 2 Effect of concentrations of MS medium and sucrose on shoot and root from shoot explants of *Z. brachystachys* for 8 months

MS	Number of shoots					Shoot length (cm)					root			
	Sucrose (g/l)				mean	Sucrose (g/l)				mean	Sucrose (g/l)			
	15	30	45	60		15	30	45	60		15	30	45	60
MS	2.22	5.34	13.82	2.15	5.89	6.88 a x	7.94 a x	7.01 a x	1.05 a y	5.72	++	++	+++	+
1/2MS	3.26	4.48	5.62	3.86	4.31	6.93 a x	6.58 a x	3.73 b y	1.30 a z	4.63	++	+++	++	+
1/4MS	3.12	2.64	3.95	1.59	2.82	6.21 a x	2.36 b y	3.53 b y	1.91 a y	3.50	++	++	+	++
mean	2.87 b	4.15 ab	7.8 a	2.45 b	4.34	6.67	5.62	4.76	1.42	4.62				
F-test (MS)	ns					**								
F-test (SU)	*					**								
F-test (MS×SU)	ns					**								
CV (%)	32.78					31.00								

Means within columns and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT. Transformation efficiency: Number of shoots are log (X+1) transformed value
ns = not significant * = significant at 5% level ** = significant at 1% level
- The a, b, c combinations compare the difference in concentration of MS medium (MS) - The x, y, z combinations compare differences in concentrations of sucrose (SU)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนขิงพระพุทธบาท โดยล้างทำความสะอาดด้วยสบู่ ล้างให้น้ำไหลผ่านนาน 45 นาที และฟอกด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20% 15 นาที และ 15% 10 นาที ตามลำดับ พบว่าชิ้นส่วนพืชรอดชีวิตและเจริญเป็นต้นได้ถึง 46.67% หน่ออ่อนขิงพระพุทธบาทเป็นชิ้นส่วนที่อยู่ใต้ดินจึงมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงจำเป็นต้องใช้วิธีฟอกหลายขั้นตอน เช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อดายอดของ *Boesenbergia rotundo* ที่เป็นพืชสมุนไพรโดยการจุ่มในเอทานอล 70% นาน 2 นาทีตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20% นาน 15 นาที พบว่าสามารถรอดชีวิตและเจริญเป็นต้นได้ 48% (Yusuf et al., 2011)

การชักนำยอดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนบนอาหารสูตร MS มีการเจริญเติบโตและเกิดยอดเฉลี่ย 0.8 ยอด/ชิ้นส่วน และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 20.9 ยอด/ชิ้นส่วน ยอดที่ได้มีสีเขียวเข้มแข็ง ความสูงเฉลี่ย 3.38 ซม. แต่เมื่อเติม BA เข้มข้นสูงขึ้นเป็น 5 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้เพียง 14.0 ยอด/ชิ้นส่วน และเมื่อเติม NAA ร่วมด้วยก็ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดเพิ่มมากขึ้น อาหารทุกสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงส่งผลให้ต้นที่ได้มีรากสีขาวขนาดยาวและมีรากขนจำนวนมาก ซึ่งอาหารสูตร MS เติม BA 3 มก./ล. นอกจากจะชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุดแล้วยังไม่ส่งผลต่อความแข็งแรงของยอดใหม่และการเจริญของรากได้ปกติ เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินมีส่วนช่วยให้เกิดกิจกรรมการแบ่งเซลล์ของพืช ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการชักนำและขยายพันธุ์ในพืช (Hartmann et al., 2002) แต่การเพิ่มความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่สูงเกินกว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด อาจทำให้เกิดการยับยั้งหรือชะลอการเกิดยอดใหม่ได้ (George et al., 2008) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณต้นขิงพระพุทธบาทในสภาพปลอดเชื้อโดยเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนบนอาหาร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดยอดและต้นที่ได้มีลักษณะแข็งแรง

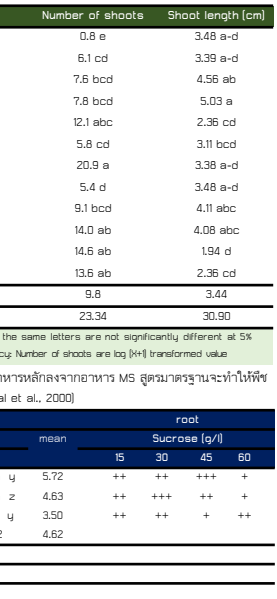


Figure 1 Shoot proliferation of *Z. brachystachys*' shoot explants cultured on MS medium added with various concentration of NAA and BA for 3 months

Table 1 Influence of NAA and BA combination on shoot multiplication of *Z. brachystachys*' shoot explants after being cultured on MS medium for 3 months

Medium	Number of shoots	Shoot length (cm)
MS	0.8 e	3.48 a-d
MS + 0.5 mg/l NAA	6.1 cd	3.39 a-d
MS + 1.0 mg/l NAA	7.6 bcd	4.56 ab
MS + 1.0 mg/l BA	7.8 bcd	5.03 a
MS + 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	12.1 abc	2.36 cd
MS + 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	5.8 cd	3.11 bcd
MS + 3.0 mg/l BA	20.9 a	3.38 a-d
MS + 3.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	5.4 d	3.48 a-d
MS + 3.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	9.1 bcd	4.11 abc
MS + 5.0 mg/l BA	14.0 ab	4.08 abc
MS + 5.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	14.6 ab	1.94 d
MS + 5.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	13.6 ab	2.36 cd
mean	9.8	3.44
CV (%)	23.34	30.90

Means within and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT. Transformation efficiency: Number of shoots are log (X+1) transformed value

สรุปผลการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อขั้นส่วนหน่ออ่อนขิงพระพุทธบาทได้เทคนิคที่เหมาะสมคือ การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนของต้นขิงพระพุทธบาทด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20% นาน 15 นาทีและ 15% นาน 10 นาทีตามลำดับ พบเนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตและเจริญเป็นต้นได้ 46.67% การขยายพันธุ์ขิงพระพุทธบาทโดยเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 20.9 ยอด/ชิ้นส่วน และอาหารทุกสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงจะทำให้ต้นใหม่เกิดรากยาวสีขาวและมีขนของรากจำนวนมาก ส่วนการชะลอการเจริญเติบโตโดยเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนขิงพระพุทธบาทบนอาหาร ½ MS และ ¼ MS เติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล. ได้นาน 8 เดือนโดยไม่ต้องย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่ ต้นขิงพระพุทธบาทที่ได้มีสีเขียวเข้ม ลักษณะแข็งแรงและมีความสูงของต้นไม่ผิดปกติ

เอกสารอ้างอิง

George, E. F., Hall, M. A., & De-Klerk, G. J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. Springer Dordrecht.

Hartmann, H. T., Hester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2002). Hartmann and Hester's Plant Propagation: Principles and Practices. 7th edition. Prentice-Hall.

Nirmal, B. K., Ravindran, P. N., & Peter, K. V. (2000). Biotechnology of spices. In Chadha, K. L., Ravindran, P. N., & Sahigram, L. (Ed.), Biotechnology of Horticulture and Plantation Crops. pp. 487-527. Malhotra Publishing House.

Triboun, P., Larsen, K., & Chantaranothai, P. (2014). A key to the genus Zingiber (Zingiberaceae) in Thailand with descriptions of 10 new taxa. The Journal of Botany, 8(8), 53-77.

Yusuf, N. A., Annuar, M. S. M., & Khalid, N. (2011). Rapid micropropagation of Boesenbergia rotunda [L.] Mansf. (kulturpf). [a valuable medicinal plant] from shoot bud explants. African Journal of Biotechnology, 10(7), 1194-1199.

จัดทำโดย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี