การขยายพันธุ์ว่านค้างคาวเขียวโดยกระบวนการออการ์โนเจเนซิส

Micropropagation of Green Bat Flower by Organogenesis

สุภาวดี รามสูตร[1], กันตนา คงชำนาญ[1], เบ็ญจวรรณ สมบูรณ์[1]
Supawadee Ramasoot[1], Kantana Kongchamnan[1], Benjawan Somboon[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการขยายพันธุ์ว่านค้างคาวเขียวโดยกระบวนการออการ์โนเจเนซิสโดยนำแคลลัสว่านค้างคาวเขียวอายุ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS BA เข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตรวางเลี้ยงในสภาพให้แสงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดว่านค้างคาวเขียวคือ อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 16.00±4.96 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.46±0.15 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า ให้จำนวนใบและความกว้างใบเฉลี่ยสูงสุดคือ 9.11±5.32 ใบต่อชิ้นส่วนและ 1.45±1.61 เซนติเมตรตามลำดับสำหรับการชักนำราก โดยนำชิ้นส่วนรากมาเพาะเลี้ยงตอบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างรากสูงสุดคือ 23.98±9.36 % แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 3.28±1.59 รากต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 0.87±0.35 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อทำการอนุบาลต้นกล้าว่านค้างคาวเขียวออกปลูกในสภาพธรรมชาติ การรอดชีวิตสูงสุด 50% หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 1 เดือน

คำสำคัญ: ว่านค้างคาวเขียว การขยายพันธุ์ ออการ์โนเจเนซิส

Abstract

This study aimed to investigate micropropagation of green bat flower operated through organogenesis process . One-month-old callus of green bat flower was cultured on MS medium supplemented with different concentrations of BA (N6-Benzyladenine) at 0, 1, 2 and 3 mg/l. All culture media were added with 30 g/l sucrose and solidified with 8 g/l agar. The cultures were kept under the light condition of 3,000 lux, 16 h photoperiod and temperature at 25 ± 2 °C. After culturing for three months, the optimum medium for shoot multiplication was MS medium supplemented with 2 mg/l BA. This culture medium gave the highest average number of shoots at 16.00±4.96 shoots/explant, which was statistically and significantly different ($P \leq 0.05$). PGR-free MS medium gave the highest number of leaves and width of leaf at 9.11±5.32 leafs/explant and 1.45±1.61 cm, respectively. Regarding root induction, the shoots were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of IAA (Indole-3-acetic acid) at 0, 1, 2 and 3 mg/l for 3 months. The result found that optimum medium of the root induction was MS supplemented with 1 mg/l IAA. The highest percentage of root the induction was at 23.98±9.36 %, which was statistically and significantly

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
[1] Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University

different (P≤ 0.05) and the number of roots at 3.28±1.59roots/explant. MS medium supplemented with 3 mg/l IAA gave the highest root length at 0.87±0.35 cm. Complete plantlets were successfully acclimatized to the greenhouse environmental survival rate of 50% after 1 month of transfer.

Keywords: Green bat flower, Micropropagation, Organogenesis

บทนำ

ต้นว่านค้างคาวเขียวเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Taccaceae เป็นไม้ล้มลุก เจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศเย็นชื้น แสงแดดรำไร โดยถ้าอยู่ในที่ร่มจะให้ดอกสีเข้มกว่าอยู่ในที่แสงแดดจัด (วงศ์สถิตน์ ฉั่วกุล, พร้อมจิต ศรลัมพ์, วิชิต เปานิล และรุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, 2539)มีเหง้าใต้ดิน ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับออกเป็นรัศมี รูปขอบขนานถึงรูปใบหอก กว้าง 7-17 เซนติเมตร ยาว 20-60 เซนติเมตร ก้านใบแผ่เป็นครีบ ดอกคล้ายค้างคาวบิน ดอกบานนาน 2-3 สัปดาห์ ช่อดอกคล้ายซี่ร่ม มีดอกย่อย 4-6 ดอก กลีบดอกมีสีม่วงแกมเขียว ออกดอกที่ปลายยอดใบประดับ 2 คู่ สีเขียว เรียงตั้งฉากกัน ผลสดรูปหกเหลี่ยม มีสันเป็นคลื่นตามยาวเมล็ดคล้ายรูปไต ว่านค้างคาวมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ อินเดีย บังคลาเทศ พม่า จีนตอนใต้ ลาว เวียดนามจนถึงมาเลเซีย ในประเทศไทยพบทั่วไปในป่าดิบชื้น พบมากทางภาคใต้ ที่มีความสูง 500-1,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล(เครือข่ายวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย, 2555) ว่านค้างคาวมีประโยชน์เป็นไม้ประดับ และมีสรรพคุณทางยา เสริมสร้างสมรรถภาพทางเพศ เป็นยาบำรุงกำลังสตรีมีครรภ์ รักษาโรคความดันเลือดต่ำ โรคกระเพาะอาหาร โรคท้องร่วง โรคบิด และอาการผื่นคัน (Kay, 1987) ในส่วนของเหง้า ซึ่งมีสารซาโปนินมีฤทธิ์บรรเทาอาการกล้ามเนื้ออักเสบและรักษา (ไชยยง รุจจนเวท และณวัชพงศ์ ไชยรัตน์, 2556) รวมทั้งยังใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชคือ นำเหง้ามาสกัดเป็นสารกำจัดหนอนใยผักได้ (มยุรฉัตร เกื้อชู, ศิริพรรณ ตันตาคม และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2553) และยับยั้งการทำลายของหนอนกระทู้ (ไตรรัตน์ หนูเอียด, วิบูลย์ จงรัตนเมธีกุล และสุวมิล วงศ์พลัง, 2552) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่ามีการตัดไม้ของคนในพื้นที่ร่วมกับการลักลอบนำว่านค้างคาวออกมาจากป่ามาจำหน่ายและมาทำเป็นยาโดยขาดการอนุรักษ์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ว่านค้างคาวมีจำนวนลดน้อยลงเป็นอย่างมากในธรรมชาติ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องให้ความสำคัญการขยายพันธุ์ว่านค้างคาวให้มากยิ่งขึ้น (วรินทน์พร จิ๋วรัตนสกุล และปิยะวดี เจริญวัฒนะ, 2557) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านค้างคาวเขียว ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA (Benzyladenine) และ IAA (Indole-3-acetic acid) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นว่านค้างคาวเขียวจากชิ้นส่วนแคลลัสและศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพื่อขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมว่านค้างคาวเขียว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดของแคลลัสว่านค้างคาวเขียว
2. เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ IAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของว่านค้างคาวเขียว
3. ศึกษาผลของวัสดุปลูกพืชที่มีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของว่านค้างคาวเขียวในสภาพธรรมชาติ

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้ แคลลัสของว่านค้างคาวเขียว อายุ 1 เดือน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

ศึกษาผลของความเข้มข้น ของ BA ต่อการชักนำยอดจากแคลลัสว่านค้างคาวเขียว

นำแคลลัสว่านค้างคาวเขียว อายุ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตรปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพให้แสงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกอัตรารอดชีวิต จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ ความกว้างใบทุกเดือนเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 10 ขวด

ศึกษาผลของความเข้มข้นของ IAA ต่อการชักนำรากจากยอดว่านค้างคาวเขียว

นำยอดที่ได้จากการศึกษาที่ 1 มาเพาะเลี้ยงต่อบนสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย IAA เข้มข้น 0, 1, 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตรปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพให้แสงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน บันทึกจำนวนราก ความยาวราก และเปอร์เซ็นต์การสร้างรากทุกเดือนเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด

ศึกษาผลของวัสดุปลูกพืชต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของว่านค้างคาวเขียวในสภาพธรรมชาติ

นำต้นพืชที่มีรากเรียบร้อยแล้วออกจากอาหารวุ้น และล้างด้วยน้ำประปาให้ไหลผ่าน นำรากจุ่มแช่ในเบต้าดีนเพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำไปปลูกในกระถางที่มีส่วนผสมของดิน, ดินและปุ๋ยคอก (1:1), ดินปุ๋ยคอกและทราย (1:1:1), เพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ (1:1) แต่ละชนิดของวัสดุปลูกทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 15 ต้น หลังจากนั้นคลุมต้นพืชที่อยู่ในกระถางด้วยถุงเพื่อให้มีความชื้นสูงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วรดน้ำ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน สังเกตและบันทึกอัตรารอดชีวิต

ผลการวิจัย

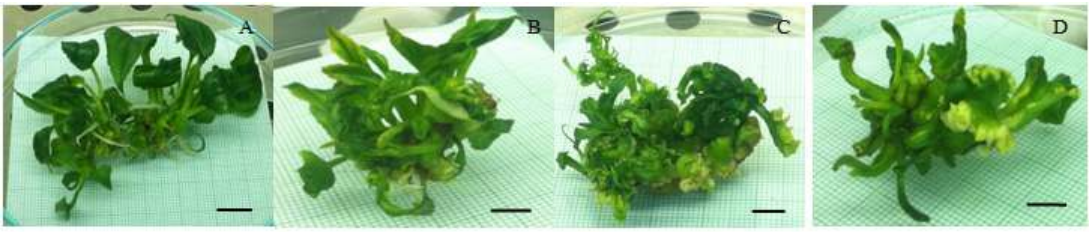
ผลของความเข้มข้น ของ BA ต่อการชักนำยอดจากแคลลัสว่านค้างคาวเขียว

เมื่อนำแคลลัสของว่านค้างคาวเขียวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุดเท่ากัน 91.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต กับอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตรารอดชีวิตเท่ากัน 75 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 16.00±4.96 ยอดต่อแคลลัสแตกอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 1) โดยยอดมีลักษณะแหลม ขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน และเกิดขึ้นบริเวณใบและลำต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นยอดดังกล่าวมีการเจริญพัฒนาเป็นใบ สีเขียวเข้ม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 1) นอกจากนี้พบว่า เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของแคลลัสว่านค้างคาวเขียว พบว่าแคลลัสว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 9.11±5.32 ใบต่อแคลลัส และความกว้างใบเฉลี่ยสูงสุด 1.45±1.61 เซนติเมตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสาร BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดของแคลลัสว่านค้างคาวเขียวหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

ความเข้มข้นของสาร BA (มก. /ล.)	จำนวนยอด / ชิ้นส่วน	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนใบ / ชิ้นส่วน	ความยาวใบ (ซม.)
0	9.00±1.73b	0.41±0.10	9.11±5.32	1.45±1.61
1	10.64±3.36b	0.38±0.13	7.05±3.55	0.72±1.02
2	16.00±4.96a	0.46±0.15	6.22±3.23	0.75±0.82
3	9.52±4.65b	0.34±0.14	5.61±2.97	0.66±0.71
F-test	*	ns	ns	ns
C.V. (%)	22.78	82.75	44.79	90.72

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P \leq 0.05$)
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิ



A. MS –Free B. MS+1mg/lBA C. MS+2mg/l BA D. MS+3mg/lBA

ภาพที่ 1 ลักษณะยอดว่านค้างคาวเขียวที่เกิดขึ้นหลังวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมสาร BA ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยง 3 เดือน (บาร์ = 1 ซม.)

ศึกษาผลของความเข้มข้นของ IAA ต่อการชักนำรากจากยอดว่านค้างคาวเขียว

นำชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการศึกษาที่ 1 มาเพาะเลี้ยงต่อบนสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย IAA เข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนยอดของว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย IAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด 91.67 เปอร์เซ็นต์รองลงมาอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย IAA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากันคือ 88.33 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติม IAA มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำสุด คือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่า ในขณะที่ความเข้มข้นของ IAA ที่เพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของว่านค้างคาวเขียวเพิ่มขึ้นด้วย จากการศึกษาความเข้มข้นของ IAA ที่เหมาะสมในการชักนำรากของว่านค้างคาวเขียว พบว่าอาหารที่ไม่เติม IAA จะชักนำให้เกิดรากจำนวนน้อยกว่าและรากจะสั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติม IAA โดยสังเกตได้จากการเกิดจำนวนรากสูงสุดบนอาหารเติม IAA เข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกันคือ 3.28±1.59, 2.05±1.40, 3.27±1.49รากต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ สำหรับอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย IAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 0.87±0.35 เซนติเมตร

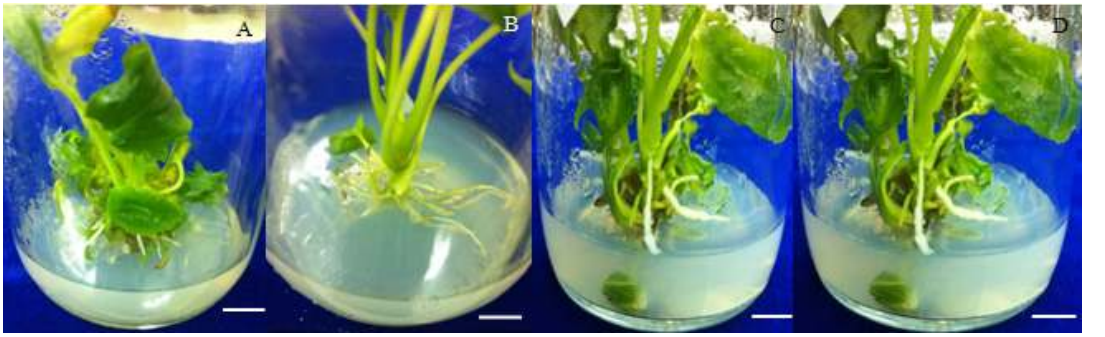
แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าต้นว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมIAA เข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากสูงสุด 23.98±9.36, 20.26±8.02,และ 22.47±7.70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) โดยรากที่เกิดมีลักษณะอวบใหญ่ แตกแขนงและมีขนรากหอหุ้มเกือบตลอดทั้งราก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับธาตุอาหารและเกาะยึด รากมีสีเขียวเข้มบริเวณโคนรากและมีสีเขียวอ่อนบริเวณปลายราก (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ IAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของว่านค้างคาวเขียว

สูตรอาหาร	การชักนำราก (%)	จำนวนราก /ต้น	ความยาวราก (ซม.)
MS+2 mg/l BA	9.65±1.55c	0.65±0.28	0.05±0.07b
MS+2 mg/l BA+1 mg/l IAA	23.98±9.36a	3.28±1.59	0.21±0.09b
MS+2 mg/l BA+2 mg/l IAA	20.26±8.02b	2.05±1.40	0.28±0.12b
MS+2 mg/l BA+3 mg/l IAA	22.47±7.70ab	3.27±1.49	0.87±0.35a
F-test	*	ns	*
C.V. (%)	9.54	54.05	66.51

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P \leq 0.05$)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



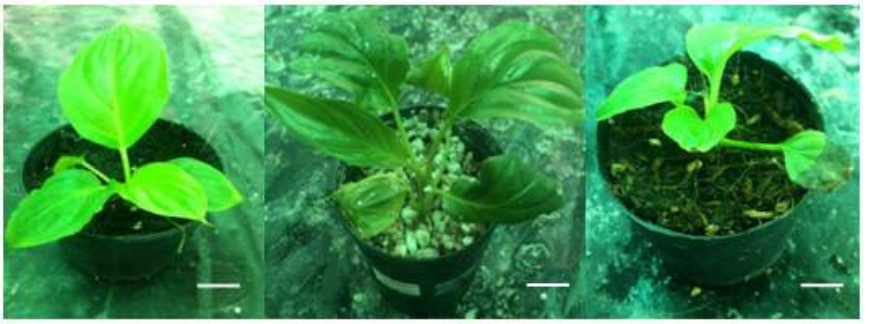
A) MS+2 mg/l BA B) MS+2 mg/l BA +1 mg/l IAA C) MS+2 mg/l BA +2 mg/l IAA D) MS+2 mg/l BA+3 mg/l IAA

ภาพที่ 2 ลักษณะของรากที่เกิดขึ้นหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสาร BA เข้มข้น 2 มล. /ล. และเติม IAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (บาร์ = 1 ซม.)

ผลของวัสดุปลูกพืชที่มีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของว่านค้างคาวเขียวในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกจากอาหารวุ้น และล้างด้วยน้ำประปาให้ไหลผ่าน นำรากจุ่มแช่ในเบต้าดีน (ยาเหลือง) เพื่อป้องกันเชื้อรา แล้วนำไปปลูกในกระถางที่มีส่วนผสมของ ดิน, ดินและปุ๋ยคอก (1:1), ดิน ปุ๋ยคอกและทราย (1:1:1), เพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ (1:1) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 15 ต้น หลังจากนั้นคลุมต้นพืชที่อยู่ในกระถางด้วยถุง เพื่อให้มีความชื้นสูงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วรดน้ำ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสองสัปดาห์แรก ต้นว่านค้างคาวเขียวมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่าต้นว่านค้างคาวเขียวที่อยู่ในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของเพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการออกปลูก ต้นว่านค้างคาวเขียวมีลักษณะสีเขียวเข้ม ต้นสมบูรณ์แข็งแรง แต่บางต้นมีการเน่าที่บริเวณโคนต้น สำหรับว่านค้างคาวเขียวที่ออกปลูกในวัสดุปลูกคือ ดิน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 33.33 เปอร์เซ็นต์

ต้นว่านค้างคาวเขียวมีลักษณะต้นที่สมบูรณ์ แข็งแรง ลำต้นและใบมีสีเขียวอ่อน ส่วนว่านค้างคาวเขียวที่ออกปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน ปุ๋ยคอกและทราย (1:1:1) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 11.76 เปอร์เซ็นต์ลักษณะต้นที่ได้จะมีขนาดเล็ก ปลายใบมีเชื้อราเกิดขึ้นและต้นเหี่ยว และการออกปลูกว่านค้างคาวเขียวในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดินและปุ๋ย (1:1:) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)



A. ดิน B.เพอไรท์:เวอร์มิคูไรท์ (1:1) C.ดิน ปุ๋ยคอกและทราย (1:1:1)

ภาพที่ 3 ลักษณะของว่านค้างคาวเขียวที่ออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1ซม.)

อภิปรายผล

ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดของแคลลัสว่านค้างคาวเขียว เมื่อนำแคลลัสของว่านค้างคาวเขียวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนแคลลัสว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กับอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดเท่ากัน สำหรับอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต กับอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตอนตัดแยกแคลลัส (subculture) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นระดับต่างๆ ทำให้แคลลัสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราทั้งในส่วนของชิ้นส่วนพืชเองและในส่วนของอาหาร อีกทั้งแคลลัสยังมีการปล่อยสาร phenolic compound ซึ่งถูกปล่อยออกมาจากรอยตัดของเนื้อเยื่อ ทำให้อาหารมีสีน้ำตาลเข้มและเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชได้ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์, 2546) สำหรับแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่และแข็งที่บริเวณโคนต้น และมีขนาดเล็กที่บริเวณก้าน และใบ สีเขียวอมเหลือง หลังจากย้ายชิ้นส่วนแคลลัสว่านค้างคาวเขียวบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด โดยยอดมีลักษณะเป็นยอดแหลม ขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน และเกิดขึ้นบริเวณใบและลำต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นยอดดังกล่าวมีการเจริญพัฒนาเป็นใบ สีเขียวเข้ม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ส่งผลให้จำนวนยอดของว่านค้างคาวเขียวเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรมณีย์ เจริญทรัพย์ (2008) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดของเนระพูสีไทย พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอด คือสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ Martin, Ermayanti, Hapsari & Rantau (2008) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดของเท้ายายมอม พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด คือสูตร MS เติม KN เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนยอดสูงสุด 25 ยอดต่อชิ้นส่วน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แคลลัสว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.46±0.15 เซนติเมตร ดังนั้นแสดง

ให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีการเติม BA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับการรายงานของ สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์ (2544) พบว่าสารในกลุ่มไซโตไคนินสามารถขยายขนาดของแวคิวโอลในเซลล์ ทำให้เซลล์ขยายใหญ่ขึ้นได้ และพบว่าในเซลล์ที่เจริญเต็มที่ของแผ่นใบและใบเลี้ยงซึ่ง ปกติจะไม่มีการขยายตัว ไซโตไคนินสามารถส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ในส่วนที่ตัดจากแผ่นใบและใบเลี้ยงได้

ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ IAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของว่านค้างคาวเขียว พบว่าชิ้นส่วนยอดของว่านค้างคาวเขียวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย IAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด สำหรับอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติม IAA มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำสุด จะเห็นได้ว่า ในขณะที่ความเข้มข้นของ IAA ที่เพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของว่านค้างคาวเขียวเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ IAA มีบทบาทสำคัญการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และควบคุมการขยายตัวของเซลล์ (Ma, Prasad, Rajkumar & Freitas, 2011) และ IAA เป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในพืช เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของพืช (สุชาติ เกียรติธนาพงษ์, 2548) จากการศึกษาความเข้มข้นของ IAA ที่เหมาะสมในการชักนำรากของว่านค้างคาวเขียว พบว่าอาหารที่ไม่เติม IAA จะชักนำให้เกิดรากจำนวนน้อยกว่าและรากจะสั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติม IAA โดยสังเกตได้จากการเกิดจำนวนรากสูงสุดบนอาหารเติม IAA เข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Borokini, Lawyer & Ayodele (2011) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดของเท้ายายม่อมบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 6 ราก และสอดคล้องกับการศึกษาของ พัชราวดี วัฒนวิกย์กิจ, พนิดา วงษ์แหวน, วราพร วีระพลากร และยุพา มงคลสุข (2545) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของเท้ายายม่อมบนอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 17.5 รากต่อชิ้นส่วนยอด ซึ่งสาร IAA NAA และ IBA อยู่ในกลุ่มออกซิน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ควบคุมการขยายตัวของเซลล์ กระตุ้นการเกิดรากและการเจริญของราก (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544)

วัสดุปลูกพืชที่มีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของว่านค้างคาวเขียวในสภาพธรรมชาตินำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ออกจากอาหารวุ้น และล้างด้วยน้ำประปาให้ไหลผ่าน นำรากจุ่มแช่ในเบต้าดีน (ยาเหลือง) เพื่อป้องกันเชื้อรา แล้วนำไปปลูกในกระถางที่มีส่วนผสมของ ดิน, ดินและปุ๋ยคอก (1:1), ดิน ปุ๋ยคอกและทราย (1:1:1), เพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ (1:1) หลังจากนั้นคลุมต้นพืชที่อยู่ในกระถางด้วยถุง เพื่อให้มีความชื้นสูงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วรดน้ำ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสองสัปดาห์แรก ต้นว่านค้างคาวเขียวมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่าต้นว่านค้างคาวเขียวที่อยู่ในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของเพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดภายหลังการออกปลูก 50 เปอร์เซ็นต์ ต้นว่านค้างคาวเขียวมีลักษณะสีเขียวเข้ม ต้นสมบูรณ์แข็งแรง แต่บางต้นมีการเน่าที่บริเวณโคนต้น เนื่องมาจากรดน้ำมากเกินไป และมีเชื้อราเกิดขึ้นที่ใบ วิธีเหมาะสำหรับการเพาะปลูกในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้นทุนของวัสดุปลูกมีราคาค่อนข้างสูง แตกต่างกับการทดลองของพัชราวดี วัฒนวิกย์กิจ และคณะ (2545) พบว่าเมื่อทำการย้ายต้นเท้ายายม่อมออกปลูกในสภาพธรรมชาติที่มีส่วนผสมของเพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ (1:1) พบอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 60 วัน และต้นเท้ายายม่อมมีลักษณะที่แข็งแรง สมบูรณ์ และแตกต่างกับการทดลองของ Bin et al., (2012) ทำการออกปลูกต้นบัวหิมะในโรงเรือน ในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดิน เพอไรท์และเวอร์มิคูไรท์ (3:1:1) หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 21 วัน เมื่อครบเวลา 45 วัน พบว่าต้นบัวหิมะมีอัตราการรอดชีวิต 83 เปอร์เซ็นต์ และต้นบัวหิมะมีลักษณะที่แข็งแรง สำหรับว่านค้างคาวเขียวที่ออกปลูกในวัสดุปลูกคือ ดิน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 33.33

ต้นว่านค้างคาวเขียวมีลักษณะต้นที่สมบูรณ์ แข็งแรง ลำต้นและใบมีสีเขียวอ่อน วิธีนี้เหมาะสำหรับกลุ่มเกษตรกร สามารถทำได้ง่าย และวัสดุปลูกมีราคาต้นทุนต่ำ ส่วนว่านค้างคาวเขียวที่ออกปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน ปุ๋ยคอกและทราย (1:1:1) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 11.76 ลักษณะต้นที่ได้จะมีขนาดเล็ก ปลายใบมีเชื้อราเกิดขึ้นและต้นเหี่ยว เนื่องมาจากส่วนผสมของวัสดุปลูกมีส่วนประกอบของมูลสัตว์ทำให้ในดินมีอุณหภูมิที่สูง จึงเป็นเหตุทำให้เกิดลักษณะดังกล่าว แตกต่างกับการทดลองของ Martin et al., (2008) นำต้นเท้ายายม่อมที่มีรากเรียบร้อยแล้ว มาปลูกในวัสดุที่มีส่วนผสมของ ดินและทราย (1:1:) พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ ต้นเท้ายายม่อมมีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง และการออกปลูกว่านค้างคางเขียวในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดินและปุ๋ย (1:1:) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0 เปอร์เซ็นต์

สรุป

แคลลัสว่านค้างคาวเขียว อายุ 1 เดือน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 16.00±4.96 ยอดต่อชิ้นส่วน และความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.46±0.15 เซนติเมตร สำหรับอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะให้จำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 9.11±5.32 ใบต่อชิ้นส่วน ให้ความกว้างใบเฉลี่ยสูงสุด 1.45±1.61 เซนติเมตร

ชิ้นส่วนยอดที่ได้เพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 เดือน ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากสูงสุด 23.98±9.36 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 3.28±1.59 รากต่อชิ้นส่วน สำหรับอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 0.87±0.35 เซนติเมตร

เพอร์ไรท์และเวอร์มิคูไรท์ (1:1) เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์และต้นว่านค้างคาวเขียวมีลักษณะที่แข็งแรง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการจุ่มแช่น้ำยากันเชื้อราก่อนออกปลูกในสภาพธรรมชาติ
2. ควรเพิ่มจำนวนซ้ำในการทดลองให้มากกว่านี้เพื่อลดค่าความแปรปรวน
3. ควรศึกษาสูตรของปุ๋ยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นว่านค้างคาวเขียวในสภาพธรรมชาติ เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช (อพ.สธ.– มรภ. นครศรีธรรมราช)

รายการอ้างอิง

เครือข่ายวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย. (2555). **รายชื่อพรรณไม้ป่าในประเทศไทย.** เข้าถึงเมื่อวันที่ 12 กันยายน 2558, จาก http://tfern.forest.ku.ac.th/Forest/TACCACEAE.html.

ไชยยง รุจจนเวท และณวัชพงศ์ ไชยรัตน์. (2556). **การใช้ผงแห้งจากเหง้าว่านค้างคาวบรรเทาอาการกล้ามเนื้ออักเสบ.** เชียงราย : สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

ไตรรัตน์ หนูเอียด วิบูลย์ จงรัตนเมธีกุล และสุวิมล วงศ์พลัง. (2552). ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและพาหะมีที่มีต่อหนอนใยผัก *Plutellaxylostella* L.(Lepidoptera: Yponomeutidae). **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**, (น. 415-422). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชราวดี วัฒนวิกย์กิจ, พนิดา วงษ์แหวน, วราพร วีระพลากร และยุพา มงคลสุข. (2545). การขยายพันธุ์เท้ายายม่อมในสภาพปลอดเชื้อ. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร,** (น. 203-207), 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรฉัตร เกื้อชู, ศิริพรรณ ตันตาคมและธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. (2553). **ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนใยผักของสารสกัดจากเหง้าค้างคาวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.** นครปฐม: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รมณีย์ เจริญทรัพย์. (2008). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเนระพูสีไทย (Taccachantrieri Andre.): พืชสมุนไพร. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาพืช**, (น. 425-430), 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2551. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรินทร์พร จิ่วรัตนสกุล และ ปิยะวดี เจริญวัฒนะ. (2557). การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต. **แก่นเกษตร, 42**(3), 562-566.

วงศ์สถิต ฉั่วกุล, พร้อมจิต ศรลัมพ์, วิชิต เปานิล และ รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (2539). **สมุนไพรพื้นบ้านล้านนา.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. (2546). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** อุดรธานี: สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2544). **สรีรวิทยาของพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาติ เกียรติธนาพงษ์. (2548). **พืชศาสตร์.** นครศรีธรรมราช: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

Bin, W.S., Wei, L.K., Ping, D.W., Li, Z., Wei, G., Bing, L.J., ... , Feng, C.J. (2012) Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. **Molecular Breeding, , 30**(3), 1393–1400. doi: 10.1007/s11032-012-9726-7.

Borokini, T.I., Lawyer, E.F. & Ayodele, A.E. (2011). In vitro propagation of *Taccaleontopetaloides* (L.) Kuntze in Nigeria. **Egyption Journal of Biology, 13**, 51-56.

Kay, D.E. (1987). Root Crops (2nd ed.). In: Gooding, E.G.B. (ed.) **Tropical Development and Research Institute**, UK (now, National Resources Institute, UK), 380 pp.

Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. & Freitas, H. (2011). Plant growth promotingrhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances, 29**, 248-258.

Martin, A.F., Ermayanti, T.M., Hapsari, B.W. & Rantau, D.E. (2008). **Rapid micropropagation of *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze.** Indonesia: Indonesiainstitute of Sciences.