การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช

In vitro conservation of *Stemona* spp.

นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล[1/] *นางศิริลักษณ์ อินทะวงศ์*[2/] *นายวรกิจ ห้องแซง*[1/]

[1/]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ [2/]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่

****

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรหนอนตายหยากเพื่อการอนุรักษ์ โดยนำชิ้นส่วนข้อของหนอนตายหยากมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS full-strengh ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดได้แก่ BA และ NAA เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 50 วัน พบว่า สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดมากที่สุดคือสูตรที่ใช้ BA 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.25 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.55 ยอดต่อชิ้น เมื่อนำยอดเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในอาหารทดลองการเก็บรักษาโดยชะลอการเจริญเติบโตสูตร MS full-strength และสูตร MS half-strength ร่วมกับ Mannitol ที่ระดับต่างๆ กัน พบว่า สูตร MS half-strength ที่ไม่เติม Mannitol (0%) สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุด คือ 4.50 เดือน เมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมระหว่างสูตรอาหาร MS full-strength และ MS half-strenght กับระดับความเข้มข้นของ Mannitol ที่ใช้ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสูตรอาหาร MS full-strength และ MS half-strenght อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองกระตุ้นให้เกิดรากไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ทำให้ไม่สามารถทดสอบการย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือนได้

คำนำ

หนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ทั้งด้านรักษาสุขภาพของคน โดยเป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมุนไพรรักษาโรค (วุฒิ, 2552) ด้านการควบคุมแมลงพาหะนำโรค สามารถใช้น้ำคั้นหรือสารสกัดจากรากกำจัดลูกน้ำยุงได้ (ณัฐวดี, 2551) ด้านเกษตรกรรม สามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยนำน้ำคั้นผสมน้ำฉีดพ่นฆ่าหนอนและแมลงศัตรูพืชซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารเคมีได้ (วุฒิ, 2552; พนมกร, 2550; Montri, *et al.* 2006) การจะได้มาซึ่งสารดังกล่าวจะต้องขุดต้นหนอนตายหยากมาทั้งต้นแล้วนำรากมาคั้นน้ำหรือสกัดสารก่อนนำไปใช้ ซึ่งการขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากโดยทั่วไปใช้วิธีการแยกเหง้าและเพาะเมล็ด โดยต้นหนึ่งจะมีผลประมาณ 2-5 ผล ภายในผลจะมีเมล็ดประมาณ 2-7 เมล็ด ซึ่งไม่เพียงต่อการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมากเพื่อทดแทนส่วนที่ถูกขุดออกมาจากป่า และการปลูกในเชิงการค้ายังมีน้อย ดังนั้นวัตถุดิบที่ได้ส่วนใหญ่มีที่มาจากป่าทั้งสิ้น ประกอบกับสภาพอากาศในปัจจุบันที่มีความแปรปรวนอย่างรุนแรงทั้งแห้งแล้งและน้ำท่วม ทำให้เริ่มหายากมากขึ้น มีการรับซื้อในราคาแพง กิโลกรัมละ 60-100 บาท และยังเป็นที่ต้องการของตลาดสูง ทำให้มีการขุดเก็บจากป่ามาขายโดยไม่ได้ปลูกทดแทนส่งผลต่อระบบนิเวศวิทยาของป่าเปลี่ยนแปลงไป จึงสมควรที่จะหาทางอนุรักษ์พืชเหล่านี้ไว้ โดยการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากและนำกลับคืนสู่ป่า ซึ่งวิธีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงคือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช รวมถึงการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อโดยชะลอการเจริญเติบโต (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541)

วิธีดำเนินการ

นำต้นหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดลอง ดังต่อไปนี้

- การเพาะเลี้ยงและชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ ตัดส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ของต้นหนอนตายหยากไปเพาะเลี้ยงบนอาหารห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA 0 2.5 5.0 และ 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0 0.25 และ 0.5 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบ 4×3 factorial in CRD จำนวน 10 ซ้ำ
- การชักนำให้เกิดราก นำยอดที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารห์สูตร half-strength MS หรือ full-strengh MS ที่เติม sucrose 3% ร่วมกับ NAA 0 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน วางแผนการทดลองแบบ 2×3 factorial in CRD จำนวน 10 ซ้ำ
- การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต โดยตัดชิ้นส่วนข้อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS full-strength และ MS half-strength ที่เติม sucrose 3% ร่วมกับการเติม mannitol 0 1 หรือ 2% วางแผนการทดลองแบบ 2x3 factoria in CRD จำนวน 12 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองทุกเดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งยอดเกินกว่า 50% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในสูตรอาหารนั้นๆ แล้วจึงนำยอดที่รอดชีวิตมาฟื้นฟูภายหลังการเก็บรักษาบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA 2 ม.ก./ล. หรือ TDZ 1 ม.ก./ล. หรือ kinetin 2 ม.ก./ล.
- การนำยอดสมบูรณ์ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ นำต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อที่มีรากสมบูรณ์ย้ายออกปลูกในโรงเรือน

ระยะเวลาดำเนินงาน

การทดลองนี้เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2555 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2557

ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การเพาะเลี้ยงชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ</u>

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นหนอนตายหยากเพื่อชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดบนอาหาร เป็นเวลา 50 วัน พบว่า ที่บริเวณข้อซึ่งมีตาข้างอยู่นั้น สามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นยอดใหม่ได้จากทุกสูตรอาหาร (ภาพที่ 1) โดยสูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดมากที่สุดคือสูตรที่ใช้ BA 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.25 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.55 ยอดต่อชิ้น รองลงมาคือสูตรที่เติม BA 5 มก./ล. และสูตรอาหารที่เติม BA 10 มก./ล. เกิดยอดเฉลี่ย 2.40 และ 2.35 ยอดต่อชิ้น ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

<u>การชักนำให้เกิดราก</u>

การเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากในอาหารทดลองเพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ยอดยังคงมีการเจริญเติบโตได้ แต่ช้ากว่าการเจริญของยอดในสูตรอาหารที่ใช้ทดลองชักนำให้เกิดยอด อย่างไรก็ตาม สูตรทดลองกลุ่มนี้ไม่สามารถชักนำให้ยอดหนอนตายหยากเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ

<u>การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต</u>

จากการเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากในอาหารทดลองเพื่อชะลอการเจริญเติบโต พบว่า สูตร MS half-strength ที่ไม่เติม Mannitol (0 เปอร์เซ็นต์) สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุด คือ 4.50 เดือน รองลงมาคือ สูตร MS half-strength ร่วมกับ Mannitol 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดมากที่สุดในการทดลองนี้คือสูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้น 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.25 มก./ล.

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาสมุนไพรหนอนตายหยากในการทดลองนี้ ได้แก่ สูตรอาหาร MS half-strength ที่ไม่เติม Mannitol

3. สูตรอาหารที่ใช้ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ควรมีการทดลองปรับสูตรอาหาร หรือเปลี่ยนชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต และเนื่องจากสารสำคัญของพืชชนิดนี้สะสมอยู่มากในส่วนของราก จึงควรหาสูตรที่สามารถชักนำให้หนอนตายหยากเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้เพื่อเป็นแนวทางเพิ่มวัตถุดิบการผลิตต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รวมทั้งนักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป สามารถนำข้อมูลสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชได้ รวมทั้งนำไปต่อยอดทางด้านการวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง หรือนำไปใช้กับพืชสมุนไพรชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันหรือใกล้เคียงกันได้

<u>ตารางที่ 1</u> จำนวนยอดเฉลี่ยหนอนตายหยากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารทดลองในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 50 วัน

NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ย
0	0	1.10
	2.5	1.95
	5.0	2.40
	10.0	2.35
0.25	0	1.00
	2.5	1.00
	5.0	1.90
	10.0	2.55
0.50	0	0.85
	2.5	0.85
	5.0	2.20
	10.0	1.70

<u>ตารางที่ 2</u> ระยะเวลาเฉลี่ยและยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเก็บรักษาบนสูตรอาหารชะลอการเจริญเติบโต

สูตรอาหาร	Mannitol (%)	ระยะเวลา (เดือน) ที่เพาะเลี้ยงได้ก่อนยอดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเกินร้อยละ 50
MS full-strength	0	2.67
	1	2.33
	2	3.42
MS half-strength	0	4.50
	1	3.92
	2	3.83

BA10 มก./ล.+NAA 0.5 มก./ล.

BA 10 มก./ล.+NAA 0.25 มก./ล.

<u>ภาพที่ 1</u> ลักษณะยอดใหม่ต้นหนอนตายหยากที่เกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรทดลองเป็นเวลา 50 วัน