รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : โครงการวิจัยการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อ พันธุกรรมพืช (ชุดโครงการวิจัยเดี่ยว)
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยเทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร
3. **กิจกรรมที่ ๒** : เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ
4. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ (รหัสการทดลอง ๐๓-๑๐-๕๙-๐๒-๐๒-๐๐-๐๓-๕๙)**

   (ภาษาอังกฤษ) : **Conservation of Gloriosa lily (*Gloriosa superba* L.) by Slow Growth Technique.**

5. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: น.ส. สุพินญา บุญมานพ	**สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ**
ผู้ร่วมงาน	: น.ส. ปาริฉัตร สังข์สะอาด	**สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ**
	น.ส. ภัทรียา สุทธิเชื้อนาค	**สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ**

6. **บทคัดย่อ**

ดองดึง อยู่ในวงศ์ Liliaceae เป็นไม้พื้นบ้านในแถบเอเชีย ประเทศไทยพบแถบชายทะเลมากกว่าแหล่งอื่นๆ (ทางภาคใต้และภาคตะวันออก) เหง้าดองดึงมีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด ชนิดที่พบว่ามีปริมาณมากได้แก่ โคลชิซิน (colchicine) จึงเป็นที่ต้องการ เนื่องจากถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และในทางการเกษตร ทำให้ปริมาณที่มีในธรรมชาติลดน้อยลง เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จึงถูกจัดในบัญชีแดง (red list) ของ IUCN จึงจำเป็นอย่างมากสำหรับการศึกษาวิธีการอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การขยายปริมาณเหง้าของดองดึงในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้โดยใช้ชิ้นส่วนของยอดดองดึงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS + NAA 4 mg/l +BA 4 mg/l และการเก็บรักษาเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ (การชะลอการเจริญเติบโต) สามารถเก็บรักษาได้นานสูงสุด 9 เดือน แม้ไม่มีการ subculture เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์ ½ MS + 20 m/l ในสภาพปลอดเชื้อ

คำสำคัญ : ดองดึง, การอนุรักษ์, การชะลอการเจริญเติบโต

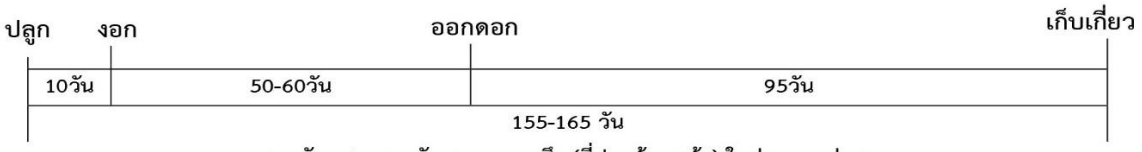
7. คำนำ

ดองดึง *Gloriosa superba* L. เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญชนิดหนึ่งและจัดอยู่ในแพทย์แผนโบราณของไทย ชื่อเรียกพื้นบ้านของประเทศไทย เช่น พันมหา หัวขวาน ว่านก้ามปู มะขาโก้ง (เสงี่ยม, 2522) ชื่อสามัญ Glory lily, Climbing lily, Superb lily, Turk's cap, Flame lily หรือ Gloriosa lily (สมสุข, 2534) อยู่ในวงศ์ Liliaceae (Backer และ Brink, 1965) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในป่าของทวีปแอฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa rothchildiana* ในทวีปเอเชีย เช่น ประเทศอินเดีย ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และประเทศแถบอินโดจีน พบเพียงชนิดเดียว คือ *G. superba* L. จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีหัว/เหง้าอยู่ใต้ดิน (rhizome) เป็นไม้พื้นบ้านในแถบเอเชีย ประเทศไทยพบเห็นพืชชนิดนี้ตามข้างทาง โดยเฉพาะแถบชายทะเลจะพบมากกว่าแหล่งอื่นๆ (ทางภาคใต้และภาคตะวันออก ดังแสดงในรูปที่ 1 และ2 ตามลำดับ) และสภาพธรรมชาติทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (รูปที่ 3) เป็นพืชล้มลุกประเภทไม้เลื้อย มีอายุหลายปี (หลายฤดู) ดอกดองดึง มีสีสันสวยงาม เด่นสะดุดตา และดอกทยอยบานจากล่างขึ้นสู่ยอด (รูป 1-2 และ4) ช่วงการออกดอกใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงถูกจัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้ไม่แพ้ไม้ดอกชนิดอื่นๆ จัดเป็นพืชสมุนไพรที่ส่วนต่างๆ สามารถรักษาโรคได้หลายชนิด เนื่องจากในเมล็ด และเหง้าดองดึงมีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด ชนิดที่พบว่ามีปริมาณมากได้แก่ โคลชิซิน (colchicine) ที่ได้จากส่วนของเมล็ดใช้รักษาโรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง (กรมวิชาการเกษตร, 2542) ทางด้านการเกษตรใช้โคลชิซินในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลพืชให้เกิดโพลีพลอย์ (polyploid) (Eigsti et al, 1949; Bunyapraphatsaya, 1991) ดองดึง จึงจัดเป็นพืชสมุนไพรเชิงพาณิชย์ที่มีการใช้งานที่หลากหลายของยา เกิดการแสวงหาผลประโยชน์ทั้งในด้านสมุนไพร และด้านไม้ดอกไม้ประดับ โดยการปลูกลงกระถาง จำนวน 5-10 เหง้า และทำค้างเพื่อให้ต้นดองดึงเกาะเกี่ยวและเกิดช่อออกดอกที่สวยงาม จึงทำให้พืชท้องถิ่นชนิดนี้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดองดึง เป็นไม้ดอกกึ่งไม้เลื้อย รากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root) เกิดบริเวณโคนต้นเหง้าดองดึงแบบแผ่กระจายไปทุกทิศทาง ใบ มีสีเขียวเป็นมัน ลักษณะเป็นใบเดี่ยว (simple) ไม่มีก้านใบ (sessile leaf) ไม่มีกาบใบหุ้ม (leaf sheath) รูปใบยาวปลายใบแหลม รูปคล้ายทวน (lanceolate) โคนกว้างสอบแคบไปหาปลาย ใบยาว ประมาณ 12 ซม. ปลายใบเรียวแคบยาวม้วนเป็นเส้นเปลี่ยนรูปร่างเพื่อเป็นมือเกาะ (tendril) เพื่อใช้พยุงลำต้นในการเลื้อยไปตามค้างหรือหลักเกาะ มีเส้นกลางใบชัดเจน การเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบเส้นขนาน การเรียงตัวของใบเป็นแบบ alternate สลับกับการเรียงตัวแบบ opposite และแบบ spiral ซึ่งแต่ละต้นมีเรียงตัวของใบไม่เหมือนกัน ใบตรงตำแหน่งที่เกิดดอก มีการจัดเรียงแบบ alternate (พรพรหม และคณะ, 2536) ต้นที่มีอายุ 3 ปี จะมีลำต้นมีความสูงประมาณ 1-3 เมตร เมื่อต้นมีความสูงประมาณ 75-100 ซม. แตกกิ่งแขนง 3-5 แขนงแต่ละแขนงเกิดดอก และติดฝักขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน และการผสมติดของ

เกสรตัวเมียและอับละอองเรณู (กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, 2542) ลักษณะดอกเป็นดอกเดี่ยว (solilary flower) ออกตามซอกใบ (leaf axil) กลีบดอก (perianth) มี 6 กลีบ ไม่ซ้อนกัน ค่อนข้างแข็งและเปราะ ปลายเรียวแหลม ขอบกลีบพลิ้วเป็นเกลียวคลื่น เมื่อดอกบานกลีบดอกจะโค้งงอกลับขึ้นไปด้านบน โคนกลีบและขอบกลีบเป็นสีเหลือง ปลายกลีบมีสีแดง มีเกสรตัวผู้ 6 อัน มีก้านเกสรตัวผู้ที่ปลายแตรติดอยู่ที่หลังของอับเกสรเพียงจุดเดียว เกสรตัวเมียอยู่ตรงกลางดอก มีก้านเกสรตัวเมียยาว 4-5 ซม.ทำมุมฉากกับรังไข่ (รูป 1-2 และ4) ตำแหน่งของรังไข่เป็นระบบ superior ovary การบานของดอกปกติจะบานจากด้านล่างขึ้นบน และตำแหน่งของยอดเกสรตัวเมียอยู่สูงกว่าตัวผู้ในดอกเดียวกัน ทำให้การผสมเกสรตัวเมียนั้นจะต้องได้รับละอองเกสรตัวผู้จากดอกอื่น แต่มีโอกาสที่จะผสมตัวเองในดอกเดียวกัน เนื่องจากมีช่วงเวลาพร้อมผสมที่เหลื่อม (overlap) (พรพรหม และคณะ, 2536) ลักษณะฝักเป็นแบบแคบซูล มี 3 พู (กระเปาะ) ฝักมีผิวมัน เมล็ดลักษณะกลม เมื่อเมล็ดอ่อนมีสีขาว แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นส้ม และเมื่อถึงระยะสุกแก่จะมีสีแสดแดง (รูปที่ 5) ผิวเมล็ดเรียบเป็นมัน (นันทิรา, 2533)

การขยายพันธุ์ สามารถขยายพันธุ์ดองดึงได้ 3 วิธี คือ เมล็ด เหง้า และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะ**เมล็ด**นั้นใช้ระยะเวลา7-10 วัน เมล็ดเริ่มงอก ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตทาง-ลำต้น ใช้เวลาประมาณ 6-8 เดือน การสร้างเหง้า (อายุ 8 เดือนการเจริญเติบโตทางลำต้นจะเหี่ยว และฟุบ จึงจะสามารถเก็บเหง้าได้) หลังจากนั้นนำเหง้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดไปลงปลูก 2-3 ครั้ง ซึ่งเป็นระยะเวลาปกติของการปลูกดองดึงจากเมล็ดจึงจะให้ช่อดอกและผลิตเหง้าพันธุ์ได้ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 2½-3 ปี (เกศรินทร์,2526) การแยก**เหง้า** เป็นวิธีนิยมมากกว่าการเพาะเมล็ดเนื่องจากให้ดอกเร็วกว่า ต้นที่ได้มีลักษณะคงเดิมเหมือนต้นแม่พันธุ์ และเป็นการประหยัดท่อนพันธุ์ที่ใช้ เพราะดองดึงมีจุดเจริญสองจุดอยู่ตรงปลายทั้งสองด้านของเหง้า ซึ่งมีลักษณะเป็นตุ่มขาวๆ ซึ่งหากตุ่มนี้หักหรือหลุดไปเหง้านั้นจะไม่งอกอีกทำให้ใช้ส่วนนี้ขยายพันธุ์อีกไม่ได้ เมื่อตัดแบ่งเหง้าโดยตัดห่างจากจุดเจริญ 3 นิ้ว ควรใช้ปูนแดงทาปิดปากแผล เพื่อกันเชื้อราไม่ให้เข้าทำลายบริเวณปากแผล ในการปลูกขยายวางเหง้าในแนวราบกับดินให้จุดเจริญอยู่ด้านบน แล้วจึงใช้ดินกลบ รดน้ำให้ชุ่มหลักจากนั้น 9-10 วัน ลำต้นใต้ดินของดองดึงจึงงอกโผล่พ้นดิน การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะใช้ 1 เหง้าปลูกได้ 2 ต้น ดองดึงจะให้ดอกภายใน 2-3 เดือน และดอกจะทะยอยบานติดต่อกันในระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือน นับระยะเวลาการปลูกด้วยเหง้าจนถึงติดฝักและเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 7 เดือน (กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, 2542) **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง**เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากในระยะเวลาอันสั้น โดยใช้ส่วนขยายพันธุ์คือ ส่วนที่เป็นจุดเจริญ (เหง้า และยอด) ละอองเกสร รังไข่ และเมล็ด เมื่อได้ต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำต้นกล้าออกปลูกในโรงเรือนเพาะชำ จะใช้เวลาประมาณ 2ปี จึงจะให้ดอก และเหง้าได้ (เกศรินทร์, 2526)



แผนผัง แสดงการพัฒนาของดองดึง (ที่ปลูกด้วยเหง้า) ในช่วงเวลาต่างๆ

รูปที่ 1 ดองดึงในสภาพธรรมชาติ แถบชายทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย

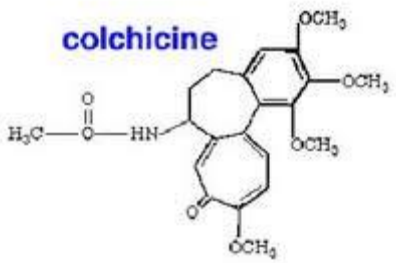
รูปที่ 2 ดองดึงในสภาพธรรมชาติ แถบชายทะเลทางภาคตะวันออกของประเทศไทย

รูปที่ 3 ดองดึงในสภาพธรรมชาติ แถบเชิงเขาภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย

รูปที่ 4 ลักษณะ เหง้า ต้น ดอก

รูปที่ 5 ลักษณะผลดองดึง (สดสีแสดแดง และ เมล็ดดองดึงที่แกะเปลือกเมล็ดออก)

โคลชิซิน เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สามารถจับ (bind) กับโปรตีนชื่อ ทิวบูลิน (tubulin) ดังแสดงในรูปที่ 6 ได้จึงมีคุณสมบัติยับยั้งระบบการขนส่งภายในเซลล์ (cellular transport system) หลายระบบ จึงทำให้มีการใช้โคลชิซินในการรักษาโรคต่างๆ เช่น อาการปวดจากโรคไขข้ออักเสบเฉียบพลัน (acute gouty arthritis) ส่วนใหญ่โคลชิซินสกัดได้จากเมล็ดและหัว (corm) ของพืชชนิดหนึ่งที่ชื่อ *Colchicum autumnale* L. และยังพบได้ในพืชสกุล Colchicum ชนิดอื่นๆ (Boye and Brossi, 1992) โคลชิซินมีสูตรทางเคมีวา $C_{22}H_{25}O_6N$ (Anderson, 1949) ทั้งนี้การผลิตสารโคลชิซีนจากต้น *C. autumnale* L. ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองในแถบยุโรปและอเมริกาเท่านั้นจึงทำให้มีราคาสูง ปัญหาสำคัญของการผลิตสารโคลชิซินจากดองดึงนั้นอยู่ที่การขยายพันธุ์ดองดึงให้มีปริมาณมาก สามารถทำได้ 2 วิธีคือ เพาะเมล็ด และเหง้าใต้ดิน โดยมีข้อเสียคือการเพาะเมล็ดใช้ระยะเวลานานเนื่องจากดองดึงเป็นพืชพื้นเมืองมีวงชีวิตในรอบปี สามารถงอกได้ 1 ครั้ง แต่การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถผสมข้ามได้ทำให้ต้นที่ได้จากเมล็ดมีความแปรปรวนของพันธุ์ มีผลทำให้ปริมาณสารโคลชิซินในแต่ละต้นไม่สม่ำเสมอกัน ส่วนการขยายพันธุ์ด้วยเหง้าใต้ดินนั้นมีปัญหาจากการพักตัวของพืชเองและพบว่าต้นดองดึงที่เกิดจากเหง้าเมื่อมีการเคลื่อนย้ายไปปลูกในวัสดุปลูกใหม่จะทำให้ชะงักการเจริญเติบโต จึงทำให้การย้ายปลูกไม่ประสบความสำเร็จ แต่หากนำเหง้าใต้ดินขึ้นมาพักให้เกิดยอดก่อนแล้วจึงทำลงปลูกก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ (กรมวิชาการเกษตร, 2542)



รูปที่ 6 โคลชิซิน (ที่มา http://raphiphan.tripod.com/Chapter2.htm)

พรพรหม และคณะ (2536) พบว่า ดองดึงเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีลำต้นใต้ดินแบบ tuber อายุหลายฤดู และลำต้นเหนือดินอายุสั้นเพียงฤดูเดียว ระบบรากฝอย การเรียงตัวของใบก่อนออกดอกเป็นแบบสลับ แบบวนรอบ และแบบตรงข้าม ใบเรียงตัวเป็นวงตรงจุดแตกแขนง รูปร่างใบเป็นแบบ lanceolate ปลายใบเปลี่ยนรูปเป็นมือเกาะ ดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ รังไข่มี 3 carpels มีเกสรตัวผู้ 6 อัน กลีบดอก 6 กลีบ มีสีเหลืองที่โคนกลีบส่วนปลายกลีบมีสีแดง ผลเป็นแบบ septicidal capsule ยาว 4-7 เซนติเมตร เมล็ดเมื่อสุกมีสีแดง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-7 มิลลิเมตร ลักษณะทางกายวิภาค รากมี xylem เป็นแบบ polyarch เกิดสลับกับ phloem มี pith ที่ราก ลำต้นพบชั้นของ epidermis ซึ่งมี cuticle ห่อหุ้มอยู่มากทางผนังด้านนอก,

collenchymas ที่มี chloroplast 1-2 ชั้น, annular collenchymas 5-6 ชั้น และถัดเข้ามาเป็นกลุ่มท่อลำเลียงอยู่อย่างกระจัดกระจายภายใน parenchyma ใบพบ cuticle เคลือบอยู่บน epidermis ทั้งด้านบนและล่าง มี spongy mesophyll และท่อลำเลียงอยู่ตรงกลาง ส่วนที่เป็นเส้นกลางใบพบท่อลำเลียงพวก xylem fiber และ phloem fiber ในหัวดองดึงพบเม็ดแป้งหลายชนิด ได้แก่ inulin, triticum และ simple ในหัวที่อายุน้อยพบเม็ดแป้งชนิด inulin มาก ส่วนหัวที่มีอายุมากพบเม็ดแป้งชนิด triticum มาก และ พรพรหม และคณะ (2537) ได้ทำการศึกษาต่อ พบว่า หัวดองดึงจะเกิดและเจริญเติบโตไปพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของลำต้นเหนือดิน ส่วนของหัวจะหยุดการเจริญเติบโต และเข้าสู่ระยะพักตัวเมื่ออายุ 90 วันหลังงอก ส่วนลำต้นเหนือดินจะหยุดการเจริญเติบโตทางด้านความสูงเมื่ออายุ 70 วัน และพักตัวเมื่ออายุ 120 วันหลังงอก สำหรับอิทธิพลของชีพจักรต่อการให้ผลผลิต พบว่า หัวพันธุ์ดองดึงที่ผ่านรอบของชีพจักรมาหลายรอบจะให้ผลผลิตน้ำหนักเมล็ดแห้งต่อต้นมากกว่าหัวดองดึงที่มีน้ำหนักเท่ากันแต่มีจำนวนรอบของชีพจักรน้อยกว่า สำหรับข้อมูลด้านการผลผลิตเมล็ดพันธุ์ตามรายงานการทดลองของสมสุข และปราโมทย์ (2541) พบว่า การเจริญเติบโต และผลผลิตของดอกดองดึง เช่น จำนวนดอก จำนวนฝัก น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ด และน้ำหนักเหง้าที่ปลูกในช่วงเวลาต่างๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นดอกดึงที่ปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน จะให้ผลดีกว่าเดือนอื่นๆ การพัฒนาของดอกพบว่า ระยะเวลาจากดอกตูมจนถึงดอกบาน ใช้เวลาประมาณ 9 วัน และระยะเวลาจากดอกบานถึงฝักแก่ประมาณ 84 วัน แต่ละดอกที่อยู่บนกิ่งแขนงเดียวกันจะทยอยบานจากดอกล่างขึ้นบน ห่างกันดอกละประมาณ 3 วัน ทั้งนี้ข้อมูลด้านความงอกของเมล็ดดองดึงปราโมทย์ และคณะ (2530) ทำการศึกษาพบว่า การนำเหง้าแช่น้ำก่อนปลูกจะให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าการแช่ด้วยจิบเบอเรลลิค แอสิค และโปแตสเซี่ยมไนเตรท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเหง้าดองดึงที่เก็บเกี่ยวในเดือนกันยายนจะงอกได้เร็วกว่าเก็บในช่วงเวลาอื่นๆ ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้เพื่อการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงที่แก่เต็มที่ คุณภาพและความแข็งแรงของเหง้า และเมื่อคำนึงถึงลักษณะของเหง้าที่ใช้ พบว่าเหง้าขนาดเล็กด้านยาวจะให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุด

เกศรินทร์ (2527) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง เพื่อเร่งการขยายพันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายเหง้าดองดึงทั้งสองข้างในอาหารสูตร MS และอาหารสูตร MS+BA 0.05 ppm+NAA 0.05 ppm เกิดเจริญเติบโตและได้ต้นที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด และเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS+BA 10 ppm เกิดยอดใหม่เพิ่มจำนวนมากที่สุด และในอาหาร MS ยอดเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากที่สุด สอดคล้องกับงานของ Hassan and Roy (2005) เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของยอด และตาข้าง ในอาหารสูตร MS+BA 1.5 ppm+NAA 0.5 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 92% และในปี 2529 วราภรณ์ ได้ทำการศึกษาพบว่า เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS+NAA 1 ppm + kinetin 0.1-2 ppm รากที่เกิดขึ้นจะมีขนาดใหญ่ สั้นและมีจำนวนมาก และการใช้ BA 2

ppm + NAA 1 ppm สามารถชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดรากได้ สอดคล้องกับงานของ ศุภฤกษ์ และคณะ (2545) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าดองดึง ในอาหารสูตรดัดแปลง MS+2,4-D 0.5 และ 1 ppm และอาหารสูตร MS+2,4-D 1 ppm + BA 1 ppm รวมทั้งอาหารสูตร MS+2,4-D ppm + kinetin 1 ppm สามารถชักนำเหง้าดองดึงให้เกิดแคลลัสได้ดี และสามารถใช้เพิ่มปริมาณแคลลัสได้ ส่วนอาหารสูตร MS, ½MS และ ¼MS ใช้เก็บรักษาแคลลัสดองดึงได้นานถึง 3 เดือน และสามารถนำแคลลัสที่เก็บรักษาไว้นั้นไปเพิ่มปริมาณได้ ทั้งนี้บุญยืนและชยันต์ (2535) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของดองดึง (*G. superb* Linn.) ในอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมนระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เนื้อเยื่อจากส่วนของยอดและก้านใบสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มี NAA (Naphthalene acetic acid) 4 ppm + น้ำมะพร้าว 5% หรือ NAA 1 ppm ร่วมกับ BA (Benznylamino purine) 1 ppm + น้ำมะพร้าว 5% การเจริญของอวัยวะเหล่านี้สิ้นสุดลงทั้งในอาหารเดิมและอาหารใหม่ ส่วนเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฮอร์โมนของ NAA, BA, GA_3 (Gibberellic acid) และ 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เมล็ดไม่สามารถงอกได้เลยในทุกความเข้มข้นของฮอร์โมน เนื้อเยื่อจากลำต้นใต้ดิน (ไรโซมหรือเหง้า) เป็นส่วนที่ดีที่สุดของเนื้อเยื่อที่นำไปเลี้ยง ซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นขนาดเล็กได้ ลำต้นใต้ดินมีการตอบสนองได้ดีในอาหารที่มี NAA, BA และ 2iP ส่วนในอาหารที่มี 2,4-D ไม่มีการตอบสนองเลย ต่อมาในปี 2544 จารุวรรณ ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยบางประการที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BA 4 ppm + NAA 1 ppm สามารถชักนำให้เมล็ดเกิดต้นได้ดีที่สุด 20% และการนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BA 4 ppm + NAA 4 ppm เกิดต้นได้ 100% และในอาหารที่มี BA 4 ppm ชักนำให้เกิดต้นได้ 83% และพบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ในปริมาณต่ำ การเพาะเลี้ยงเหง้าสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ และการเพาะเลี้ยงแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดต้นได้

รมณีย์ และ ศาลักษณ์ (2547) พบว่า manninol สามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เจริญจากตาของข้อได้ โดยเฉพาะความสูงของต้นจะลดลงถึง 83.1% ในอาหารที่มีสารความควบการเจริญเติบโต และ 93.3% ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนยอดของต้นอ่อนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี mannitol ความเข้มข้น 40 และ60 g/l ต้นอ่อนในอาหารที่เติม mannitol 20 g/l สามารถเก็บรักษาได้ถึง 8 เดือนโดยไม่มีการตาย และต้นอ่อนยังคงมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง ต้นอ่อนที่ยังคงมีชีวิตในอาหารทุกสูตรสามารถเจริญเติบโตให้ยอดใหม่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ ศิริกุล (2548) พบว่า การเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin)ในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25± 20C ความเข้มแสง 40 μmol m-2 s-1 แสง 16 hr./day ได้ศึกษาผลของ 1) ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 3 ระดับ คือ MS, 3/4 MS และ 1/2MS 2) ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่ Sucrose 20 และ 30 g/l

ใช้ร่วมกับ Mannitol 0, 10 และ 20 g/l 3) ความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญ Paclobutrazol ที่ระดับ 0, 10 และ 20 mg/l พบว่า ทุกปัจจัยมีผลต่อการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร โดยความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 3/4 MS Sucrose 20 g/l และ การเติม Paclobutrazol ที่ระดับ 10 mg/l ใช้เก็บรักษาปลายยอดได้ นาน 7 เดือน ซึ่งพบว่า มีการรอดชีวิต 73.3±8.2% การเจริญบน regeneration medium ได้ต้นที่มีลักษณะแข็งแรงเป็นปกติ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่ปัจจุบันทรัพยากรธรรมชาติถูกทำลายลงอย่างน่าเป็นห่วง ทำให้มีการขาดแคลนพรรณพืชต่าง ๆ สาเหตุหลักเนื่องมาจากพื้นที่แหล่งอาศัยหรือแหล่งกระจายพันธุ์ที่เกิดอยู่ในพื้นที่ป่าตามธรรมชาติถูกบุกรุกทำลายจากมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม การถูกจำกัดการกระจายพันธุ์จากปัจจัยธรรมชาติเอง และจากการถูกคุกคามโดยมนุษย์เก็บไปใช้ประโยชน์โดยขาดความรู้ ขาดจิตสำนึก และขาดการอนุรักษ์ที่เหมาะสม ซึ่งเป็นข้อกังวลของนักพฤกษศาสตร์ นักอนุรักษ์ ในภาพรวมว่าดองดึงเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ใกล้จะสูญพันธุ์ในปี 2020 และได้รับการยืนยันโดย International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Ade and Rai, 2009; Singh et al, 2013) จากปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการอนุรักษ์พืชในและนอกแหล่งกำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์ดองดึงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อตอบสนองความต้องการที่มากขึ้นของโรงงานอุตสาหกรรมทั้งใน และต่างประเทศ เพื่อแก้ไขปัญหาการขยายพันธุ์ดองดึงดังกล่าว จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ดองดึงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์ และเพื่อเป็นประโยชน์เบื้องต้นในการวิจัยด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและการวิจัยประยุกต์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

8. วิธีดำเนินการ :

<u>อุปกรณ์ และ วิธีการ</u>

- รวบรวมข้อมูล และรวมรวบต้นดองดึง ในพื้นที่ธรรมชาติมาปลูกในโรงเรือนทดลอง
- นำเมล็ดดองดึง และยอดดองดึงจากต้นที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือ เข้าห้องทดลองปฏิบัติการเพื่อดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนี้

วิธีการดำเนินการวิจัย

8.1 การขยายพันธุ์ดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ด/ยอด/ตาข้าง ดองดึงที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงลงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 4 mg/l ร่วมกับกลุ่ม ไซโตไคนิน (BA) 4 mg/l เพื่อชักนำการเกิดต้น ชักนำแคลลัสให้เกิดต้น BA 4 mg/l

8.2 การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth)

นำเหง้าดองดึงที่ได้จากการขยายในสภาพปลอดเชื้อ ทดสอบสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของพืช (slow growth) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) 9 ทรีตเม้นต์ ประกอบด้วย

1. อาหารสูตรสังเคราะห์ MS (control)
2. อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + 10 m/l
3. อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + 20 m/l
4. อาหารสูตรสังเคราะห์ ½ MS
5. อาหารสูตรสังเคราะห์ ½ MS + 10 m/l
6. อาหารสูตรสังเคราะห์ ½ MS + 20 m/l
7. อาหารสูตรสังเคราะห์ ¼ MS
8. อาหารสูตรสังเคราะห์ ¼ MS + 10 m/l
9. อาหารสูตรสังเคราะห์ ¼ MS + 20 m/l

มีจำนวนทรีตเม้นต์ทั้งสิ้น 9 ทรีตเม้นต์ ๆ ละ 15 ซ้ำ โดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) จนกว่าจะพบว่าเหง้าดองดึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกินกว่า 50 % ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในทรีตเม้นต์นั้น ๆ โดยข้อมูลที่บันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

<u>เวลาและสถานที่</u>

ระบุเวลา : ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์(บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

9. ผลการทดลองและวิจารณ์

9.1 การขยายพันธุ์ดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

การขยายปริมาณดองดึงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดในอาหารสูตรสังเคราะห์ 2 สูตร คือ อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + NAA 1 mg/l +BA 4 mg/l และ MS + NAA 4 mg/l +BA 4 mg/l พบว่า อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + NAA 4 mg/l +BA 4 mg/l มีการขยายเหง้าดองดึงในปริมาณที่เพิ่มขึ้น และเหง้าดองดึงที่มีลักษณะสีขาว-เขียว ในสภาพปลอดเชื้อ (รูปที่ 7 และ 8) และแยกเหง้าดองดึงเพื่อการทดลองการเก็บรักษาดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

รูปที่ 7 การขยายเหง้าดองดึงเพื่อเตรียมลงอาหารในการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

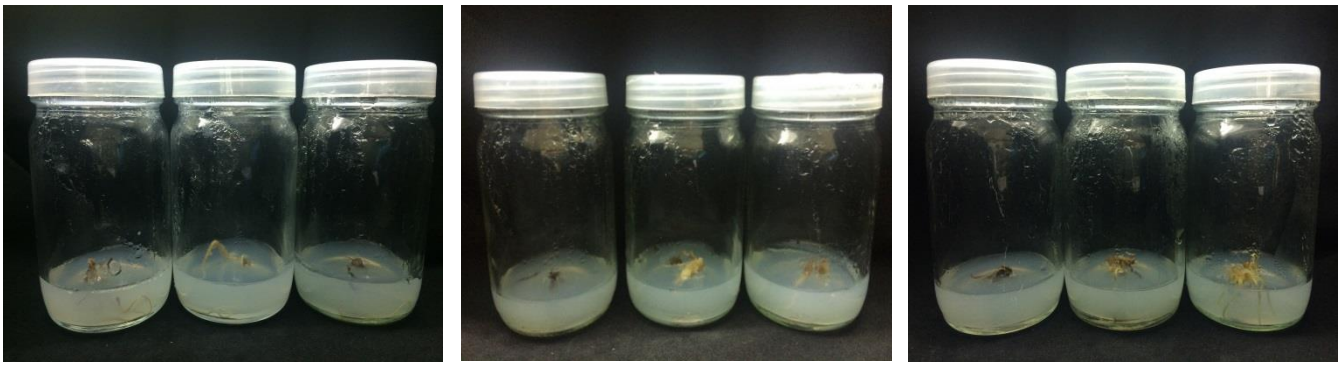
รูปที่ 8 เหง้าดองดึงที่มีสีขาว-เขียวก่อนการแยกเหง้าลงอาหารในการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

9.2 การเก็บรักษาเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) สภาพปลอดเชื้อ พบว่าชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (เหง้าดองดึง) ดังแสดงในรูปที่ 9 รากมีการเจริญด้านความยาว และมีสีขาว-เขียวบริเวณราก ทั้งนี้การเก็บรักษาเหง้าดองดึงที่อายุการเก็บรักษา 3, 6 และ 9 เดือน (รูปที่ 10, 11 และ12 ตามลำดับ) มีการเจริญเติบโตที่ล่าช้า จำนวนเหง้าและความยาวเพิ่ม แต่ไม่มีการเจริญเติบโตด้านยอด สอดคล้องกับการทดลองการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโตของ วรินทร์พร และปิยะ

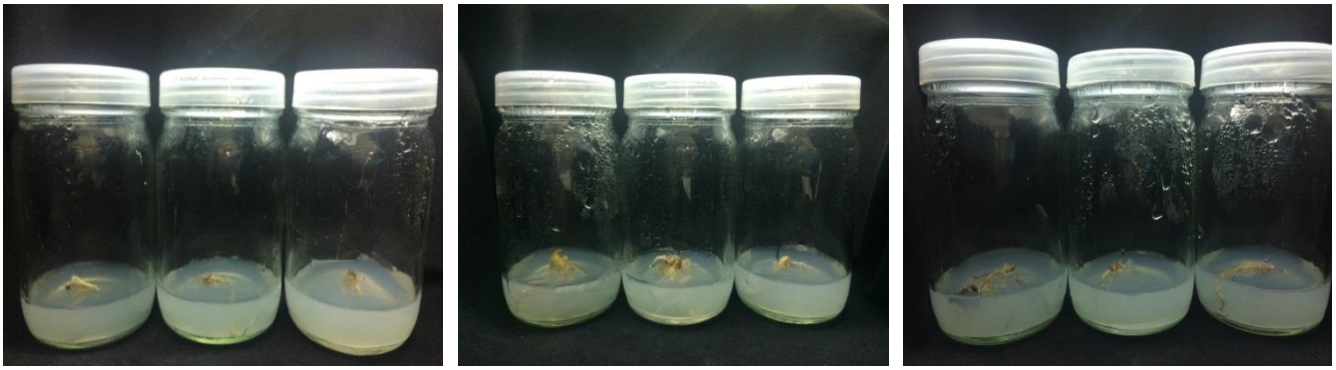
วดี (2557) ที่สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน และสนธิชัย (2548) ในการเก็บรักษาพืชวงศ์ขิง (ขิง ไพล และขมิ้นอ้อย) ในขณะที่การเก็บรักษาบนอาหารสูตรสังเคราะห์ ¼ MS ร่วมกับ mannitol (0, 10 และ 20 g/l) สรุปโดยรวมเหง้าดองดึงสามารถเก็บรักษาได้ที่อายุ 9 เดือน ทั้งนี้รากมีสีขาว-เขียว และรากมีจำนวนเพิ่มขึ้นในบางกรรมวิธี

รูปที่ 9 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ



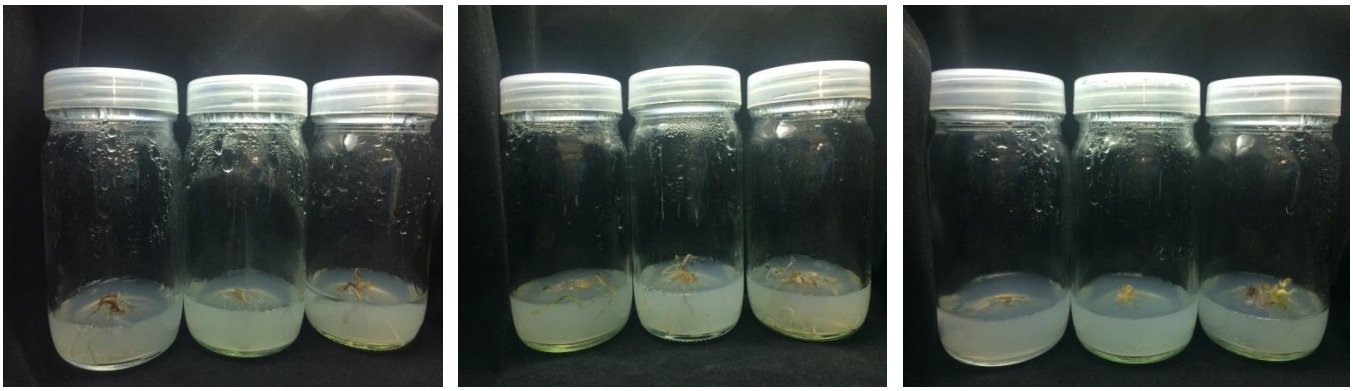
MS full-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MS half-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MS one-fourth strength+Mannitol (0,10, 20g/L)

รูปที่ 10 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุการเก็บรักษา 3 เดือน



MS full-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MS half-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MS one-fourth strength+Mannitol (0,10, 20g/L)

รูปที่ 11 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน



MS full-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MS half-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MS one-fourth strength+Mannitol (0,10, 20g/L)

รูปที่ 12 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุการเก็บรักษา 9 เดือน

10. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

10.1 การขยายปริมาณเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้ส่วนยอดของดองดึง

10.2 เหง้าดองดึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตรสังเคราะห์ อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + NAA 4 mg/l +BA 4 mg/l

10.3 การอนุรักษ์เหง้าดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นาน 9เดือน แม้ไม่มีการ subculture เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์ ½ MS + 20 m/l และควรมีการศึกษาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตทางลำต้นต่อไป ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- การเผยแพร่ในวารสาร
- หน่วยงานที่เกี่ยวข้องนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชหายาก/ใกล้สูญพันธุ์ : ดองดึง [Gloriosa lily (*Gloriosa superba* L.)]

12. คำขอบคุณ:

ขอขอบคุณ คุณสิริพันธุ์ ศรีจักรวาฬ คุณปราโมทย์ เกิดศิริ คุณจิราพรรณ แพกำเนิด คุณชาญวุฒิ วิถี และคุณขวัญฤทัย วังสุริย์ ที่ได้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงานจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโยชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

13. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2542. ดองดึง (*Gloriosa superb* Linn.) ไม้ดอกสารพัดประโยชน์. กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ: 30 หน้า.

เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว. 2527. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง (*Gloriosa superb* Linn.) เพื่อเร่งการขยายพันธุ์. ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ: 79 หน้า.

จารุวรรณ นกไม้. 2544. อิทธิพลของปัจจัยบางประการที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น: 72 หน้า.

บุญยืน กิจวิจารณ์ และชยันต์ พิเชียรสุนทร. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น: 48 หน้า.

ปราโมทย์ เกิดศิริ, นพรัตน์ หยีดจันทร์ และ สมสุข ศรีจักรวาฬ. 2530. ศึกษาเบื้องต้นการงอกของดองดึง. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร, 20 (2): หน้า 130-137.

พรพรหม พรหมเมศร์, ชัยฤกษ์ สงวนทรัพยากร, ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2536. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของดองดึง. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31: สาขาพืช 3-6 กุมภาพันธ์ 2536. กรุงเทพฯ: หน้า 420-427.

พรพรหม พรหมเมศร์, ชัยฤกษ์ สงวนทรัพยากร, ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2537. การศึกษาการเกิดของหัวดองดึงและอิทธิพลของชีพจักรต่อการให้ผลผลิต. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32: สาขาพืช 3-5 กุมภาพันธ์ 2537. กรุงเทพฯ: หน้า 567-575.

รมณีย์ เจริญทรัพย์ และ ศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2547. การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ : ผลของ mannitol ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 : สาขาพืช-สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร. หน้า 553-559.

วราภรณ์ ฉลองกิตติศักดิ์. 2529. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริกุล เกษา. 2548. การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์จำปีสิรินธร *Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin ในหลอดทดลองโดยการเก็บรักษาในภาวะชะลอการเจริญและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภฤกษ์ กุลปภังกร, บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ, อัมรัตน์ โกมลมาศ, ทรงศักดิ์ จันทร์อุดม, ประพฤติ พรหมสมบูรณ์, สุธัญญา พรหมสมบูรณ์, อนุสสรณ์ วิเศษสิงห์ และ นันทพร พึ่งสังวร. 2545. การศึกษาความหลากหลายและ

การอนุรักษ์สายพันธุ์ดองดึง ในภาคตะวันออกของประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์บางพระ, สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ชลบุรี: 107 หน้า.

สมสุข ศรีจักรวาฬ , ปราโมทย์ เกิดศิริ. 2541. การพัฒนาของดอกดองดึงเมื่อปลูกในช่วงเวลาต่าง ๆ. วารสารวิชาการเกษตร. 16 (1): หน้า 42-48.

Ade, R. and M.K. Rai. 2009. Review: Current Advances in Gloriosa superb L. Biodiversitas. 10(4): 210-214.

Anderson, H.T. 1949. The Plant Alkaloids. J.&A. Churchill Ltd., London.

Backer, A.C., and B.C., Bakhuizen Van Den Brink. 1965. Flora of Java. Vol. 2. The Netherlands. N.V.P. Noordhoff Groningen: 641 p.

Boye, O. and A. Brossi. 1992. Tropolonic *Colchicum* alkaloids and allo ongeners, p. 125-174. *In*: Brossi A and Cordell GA (Eds.). The Alkaloids. Academic Press, New York.

Bunyapraphatsara, N., S. Khongchuensin, C. Sagwansupayakorn, C. Sakulmeerit, T. Tipayasak and Y. Sri-ngen-ngaam. 1991. Colchicine content of the seeds of *Gloriosa superba* L. Cultivated in Thailand, pp. 126-134. *In* J.M. Pezzuto, A.D. Kingkorn, H.H. S. Fong, and G.A. Cordell (eds.). Progress on terrestrial and marine natural products of medicinal and biological intersest. American Botanical Council, Chicago.

Eigsti, O.J., Jr., Dustin and G.M., Grosvenor. 1949. On the discovery of the action of colchicines on mistosis. Science 110: 692.

Hassan, S.A.K.M. and S.K. Roy. 2005. Micropropagation of Gloriosa superba L. Through High Frequency Shoot Proliferation. Plant Tissue Cult. 15(1): 67-74.

IUCN. 1980. The Word Conservation Strategy. IUCN, Gland, Switzerland.

Singh, D., M. Mishra and A.S. Yadav. 2013. *Gloriosa superba* Linn: An Important Endangered Medicinal Plant and Their Conservation Strategies. International Journal of Botany and Research. 3(1): 19-26.