รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรและเครื่องเทศที่มีศักยภาพ

   กิจกรรม : ศึกษาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตพืชสมุนไพรและเครื่องเทศเพื่อทดแทนการนำออกจากป่าหรือหายากใกล้สูญพันธุ์

   กิจกรรมย่อย : รวบรวมและขยายพันธุ์ว่านเพชรกลับเพื่อการใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ศึกษาการขยายพันธุ์ว่านเพชรกลับโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on Wan Phetchaklap's Propagation by Tissue Culture
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสุภาภรณ์ สาชาติ สังกัดสถาบันวิจัยพืชสวน

   ผู้ร่วมงาน : นางพรรณผกา รัตนโกศล สังกัดศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน

   นางสาวแสงมณี ชิงดวง สังกัดสถาบันวิจัยพืชสวน
5. **บทคัดย่อ**

ศึกษาการขยายพันธุ์ว่านเพชรกลับโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ **มี 2 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การชักนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญให้เจริญเป็นต้น** โดยนำหน่ออ่อนที่มีตา ขนาดยาวประมาณ 5-10 นิ้ว มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962)(MS) ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 ppm นาน 45 วัน พบว่า ทุกสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นจากหน่ออ่อนได้ไม่แตกต่างกัน และได้จำนวน 1 ต้นต่อ 1 ชิ้นส่วน จากนั้นนำส่วนยอดของต้นอ่อนว่านเพชรกลับที่ได้ขนาดประมาณ 4-5 ซม. มาขยายพันธุ์**เพิ่มปริมาณยอด** บนสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962) (MS) ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 2 4 6 และ 8 ppm นาน 45 วัน พบว่า ทุกสูตรอาหาร MS ทั้งที่เติมและไม่เติม BA มีการเพิ่มปริมาณยอด/หน่อใหม่สูงประมาณ 4-6 ต้น **และทุกสูตรอาหารสามารถเกิดรากได้** และดีที่สุดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 6ppm BA

Study on Wan Phetchaklap's Propagation by Tissue Culture, has 2 important steps. Meristem induction develop to plantlet, was conducted using young suckers with the bud and size length 5-10 inches. They were cultured on MS medium supplemented with 0 1 2 3 4 และ 5 ppm BA for 45 days. Every treatments cannot different to induce shoot from young sucker and only single shoot per tissue. Then was conducted using the top of young shoots with size length 4-5 cm to multiplication on MS medium supplemented with 0 2 4 6 และ 8 ppm BA for 45 days. Every treatment of MS medium can induce shoot multiplication, gave new shoots about 4-6 shoots and can rooting. BA at 6 ppm gave the highest number of shoots.

6. คำนำ

ปัจจุบันเป็นยุคแห่งโลกกระแสนิยม เรื่องสมุนไพรเป็นอย่างมาก จึงเป็นปัจจัยสำคัญก่อให้เกิดการบุกรุกป่าเพื่อแสวงหาสมุนไพรต่าง ๆ เป็นเหตุสำคัญที่ทำให้ กรมวิชาการเกษตร ได้ตระหนักถึงความสำคัญของทรัพยากรของพืชสมุนไพรป่า และสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์เป็นยารักษาโรค จึงได้สำรวจ ศึกษา รวบรวม ข้อมูลต่าง ๆ เพื่อหาพื้นที่และเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตพืชสมุนไพรและจัดทำแปลงเพื่อปลูกเปรียบเทียบกับเกษตรกรในพื้นที่ เพื่อส่งเสริมให้ถึงเกษตรกรผู้สนใจธุรกิจสมุนไพรต่อไปในอนาคต ซึ่งนอกจากการอนุรักษ์แล้วการพัฒนาการผลิตที่ให้มีการหมุนเวียนใช้อย่างเพียงพออย่างยั่งยืน

ว่านเพชรกลับ (*Boesenbergia cf. thorelii* (Gagnep.) Hoes) เป็นพืชสมุนไพรหายาก/หาไม่ได้ชนิดหนึ่ง ที่ปรากฏในรายการพืชสมุนไพรของร้านขายยาเจ้ากรมเป๋อ ซึ่งได้รายงานให้กับกองราชเลขานุการในพระองค์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เมื่อครั้งเสด็จพระตำหนักธงน้อย ตำบลดู่ใต้ อำเภอเมือง จังหวัดน่าน เมื่อวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2553 สรรพคุณของว่านเพชรกลับใช้เหง้าตำ พอกสมานแผลสด ใช้ดองกับเหล้าขาวดื่มเป็นยาอายุวัฒนะ (นายเกษตร, 2545) และสามารถรักษาโรคไตได้ ซึ่งศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่านได้รวบรวมพันธุ์ว่านเพชรกลับไว้บางส่วน (ปลูกเมื่อ 14 พฤษภาคม 2553) และพบว่า มีความแตกต่างด้านความสูง ขนาดของต้น ใบและความสามารถในการแตกกอ และได้ศึกษาศักยภาพ/ความเป็นไปได้ในการผลิตและพัฒนาเป็นเชิงการค้า เพื่อการใช้ประโยชน์ในทางยา และคัดเลือกหาสายพันธุ์ว่านเพชรกลับ ที่เป็นพืชสมุนไพรใกล้สูญพันธุ์ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้สูงยิ่งขึ้น สำหรับเผยแพร่และส่งเสริมเกษตรกรปลูกเป็นการค้า และยังเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรสมุนไพรไทยไม่ให้สูญพันธุ์ในอนาคตอันใกล้ **จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ให้มีการศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควบคู่ไปกับการรวบรวมและคัดเลือกพันธุ์**

สำหรับการศึกษาการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับว่านเพชรกลับยังไม่มีรายงานวิจัย แต่พืชชนิดนี้เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ ZINGIBERACEAE ซึ่งมีทั้งพืชชนิดที่เป็นการค้า ได้แก่ กล้วย ขิง ขมิ้น ปทุมมาและดาหลา เป็นต้น (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) และเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองหายาก ได้แก่ ว่านเปราะทอง เป็นต้น (ปิยะพร, 2555) ปัจจุบันจึงได้นำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในทางการค้าและการอนุรักษ์

7. วิธีดำเนินการ :

การชักนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญให้เจริญเป็นต้น

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง เหง้าของว่านเพชรกลับที่ ศวพ.น่าน รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แบบและวิธีการทดลอง สารกระตุ้นการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0 1 2 3 4 และ 5 ppm วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำคือชิ้นส่วนพืช 20 ชิ้นต่อ 1 สิ่งทดลอง (treatment)

ขั้นตอนการวิจัย

1. นำเหง้าของว่านเพชรกลับที่ ศวพ.น่าน รวบรวมได้ มาล้างให้สะอาด ใส่ไว้ในตะกร้าโดยไม่ต้องนำลงปลูกในดิน ทิ้งไว้จนแตกหน่ออ่อน

2. ตัดแยกหน่ออ่อนที่มีตา ขนาดยาวประมาณ 5-10 นิ้ว ออกจากเหง้า ล้างทำความสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 และ 10 % นาน 20 และ 15 นาที ตามลำดับ

3. ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

4. นำหน่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดแต่งส่วนที่เนื้อเยื่อสัมพัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ และตัดส่วนกาบใบทิ้ง

5. ตัดแบ่งโคนหน่ออ่อนเป็น 4 ส่วน และนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีที่กำหนด เปลี่ยนอาหารใหม่โดยใช้สูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 2-3 เดือน

6. เก็บข้อมูล การรอดชีวิตจากการฟอกฆ่าเชื้อ การปนเปื้อนของเชื้อ ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอด จำนวนยอดที่ชักนำได้ต่อชิ้นส่วน

การเพิ่มปริมาณยอด

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง ส่วนยอดของต้นอ่อนของว่านเพชรกลับที่ ได้จากการทดลองย่อยที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แบบและวิธีการทดลอง สารกระตุ้นการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 2 4 6 และ 8 ppm วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำคือชิ้นส่วนพืช 20 ชิ้นต่อ 1 สิ่งทดลอง (treatment)

ขั้นตอนการวิจัย

1. นำส่วนยอดของต้นอ่อนว่านเพชรกลับที่ ได้จากการทดลองย่อยที่ 1 ขนาดประมาณ 4-5 ซม. ตัดแต่งชิ้นส่วนโดยตัดส่วนที่เป็นกาบใบและส่วนที่เป็นสีดำออก

2. ตัดแบ่งโคนหน่ออ่อนเป็น 2 ส่วน และนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีที่กำหนด เปลี่ยนอาหารใหม่โดยใช้สูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 2-3 เดือน

6. เก็บข้อมูล การปนเปื้อนของเชื้อ ระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ จำนวนยอดที่ชักนำได้ต่อชิ้นส่วน การเกิดราก

7. การย้ายปลูกต้นกล้า นำขวดที่เพาะเลี้ยงว่านเพชรกลับ มาเลี้ยงให้ต้นอ่อนปรับสภาพในโรงเรือนเพาะชำ 1 สัปดาห์ จึงนำออกจากขวด ล้างน้ำให้หมดวุ้นที่ติดมากับราก และชำในถุงพลาสติกดำที่มีวัสดุปลูก เลี้ยงในโรงเรือนนาน 1-2 เดือน เพื่อดูอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายต้นกล้า

สถานที่ดำเนินงาน สวส ศวพ.น่าน

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2554 – กันยายน 2557

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การชักนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญให้เจริญเป็นต้น

เมื่อนำหน่ออ่อนขนาดยาวประมาณ 5-10 นิ้ว ออกจากเหง้า ล้างทำความสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 และ 10 % นาน 20 และ 15 นาที ตามลำดับ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแต่งส่วนที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ และตัดส่วนกาบใบทิ้ง ตัดแบ่งโคนหน่อออกเป็น 2 ส่วน เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีที่กำหนด เป็นเวลา 45 วัน พบว่า ทุกสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นจากหน่ออ่อนได้ไม่แตกต่างกัน และได้จำนวน 1 ต้นต่อ 1 ชิ้นส่วน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงการปนเปื้อนเชื้อ การตายและการแตกต้นของว่านเพชรกลับในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ระดับต่างๆ ภายหลังการนำเหง้ามาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 45 วัน

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น (ขวด)	ปนเปื้อนเชื้อ(ขวด)	ตาย (ขวด)	จำนวนขวดที่ได้	จำนวนต้นที่ได้
MS ไม่เติม BA	20	3	6	11	11
MS+1ppm BA	20	2	3	15	15
MS+2ppm BA	20	5	6	9	9
MS+3ppm BA	20	5	6	9	9
MS+4ppm BA	20	1	10	9	9
MS+5ppm BA	20	10	3	7	7

หมายเหตุ: จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น[๕] คือ ½ หน่ออ่อนต่อ 1 ขวด

การเพิ่มปริมาณยอด

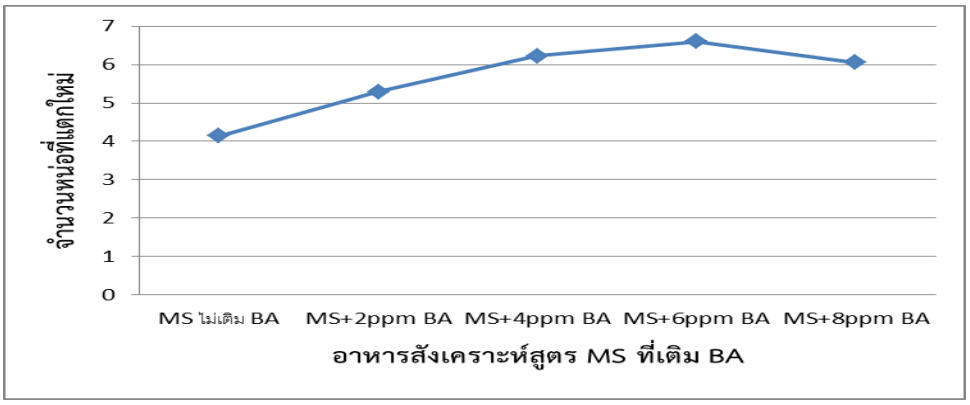
นำส่วนยอดของต้นอ่อนว่านเพชรกลับที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 เลือกขนาดประมาณ 2-3 ซม. ตัดแต่งชิ้นส่วนโดยตัดส่วนที่เป็นกาบใบและส่วนที่เป็นสีดำออก เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีที่กำหนด เป็นเวลา 45 วัน พบว่า ในทุกสูตรอาหาร MS ทั้งที่เติมและไม่เติม BA มีการเพิ่มปริมาณยอด/หน่อใหม่สูงประมาณ 4-6 ต้น และดีที่สุดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 6ppm BA (ตารางที่ 2และกราฟที่ 1) การเกิดรากสามารถเกิดได้ดีในทุกสูตรอาหาร

9.

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนหน่อที่แตกใหม่ของว่านเพชรกลับที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ระดับต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงส่วนยอดเพื่อเพิ่มปริมาณ เป็นเวลา 45 วัน

สูตรอาหาร	จำนวนหน่อที่แตกใหม่
MS ไม่เติม BA	4.14[c1/]
MS+2ppm BA	5.29[b]
MS+4ppm BA	6.22[a]
MS+6ppm BA	6.60[a]
MS+8ppm BA	6.05[ab]

1/ Defferent letter indicate significant within columns by Duncan's Multiple Range test at P< 0.05



กราฟที่ 1 แสดงจำนวนหน่อที่แตกใหม่ของว่านเพชรกลับที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ระดับต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงส่วนยอดเพื่อเพิ่มปริมาณ เป็นเวลา 45 วัน

จะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านเพชรกลับ ทั้งในขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น การเพิ่มปริมาณยอดและการเกิดราก เกิดขึ้นได้ดีโดยไม่ต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA แต่หากต้องการให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด สามารถเติม BA ลงไปในอาหารสังเคราะห์ได้ตั้งแต่ 2-8 ppm (5-7 ต้น/ชิ้นส่วน)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านเพชรกลับ คือ

1. ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำให้เกิดต้น

ใช้หน่ออ่อนขนาดยาวประมาณ 5 นิ้ว ตัดออกจากหัวเหง้า ล้างทำความสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 และ 10 % นาน 20 และ 15 นาที ตามลำดับ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแต่งส่วนที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ และตัดส่วนกาบใบทิ้ง ตัดแบ่งโคนหน่อออกเป็น 2 ส่วน เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

2. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด

นำต้นอ่อนที่แตกยอดใหม่ขนาด 2-3 เซนติเมตร จากขั้นตอนที่ 1 เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 6ppm และขยายเพิ่มปริมาณโดยเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 45 วัน จนได้ปริมาณต้นตามต้องการ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- สามารถนำไปใช้ขยายพันธุ์ว่านเพชรกลับพันธุ์คัดเลือกของศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย
- สามารถนำไปปรับใช้กับการขยายพันธุ์/การเพิ่มปริมาณโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรวงศ์ ZINGIBERACEAE ได้

11. คำขอบคุณ (ไม่มี)

12. เอกสารอ้างอิง

ปิยะพร แสนสุข. 2555. ว่านเปราะทอง: พืชหายากกับการอนุรักษ์. ใน วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เล่มที่ 40 (1) หน้า 34-39.

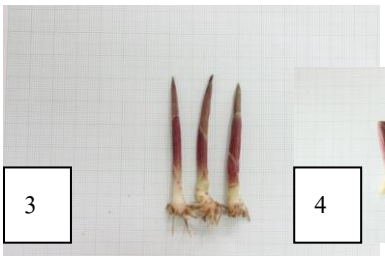
สถาบันวิจัยพืชสวน. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 156 หน้า.

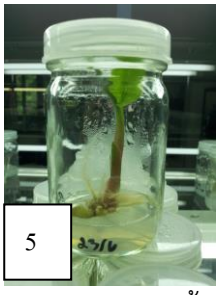
อรนุช เกษประเสริฐ. 2550. พืชสมุนไพรวงศ์ ZINGIBERACEAE สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 258 หน้า.

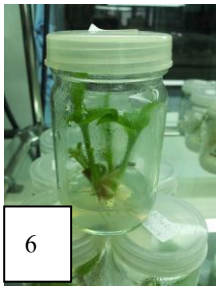
อรนุช เกษประเสริฐ มงคล เกษประเสริฐ และ วรกิจ ห้องแซง. 2548. รวบรวม ศึกษาลักษณะทางการเกษตร สารพฤกษเคมี และอนุรักษ์พืชสมุนไพรวงศ์ขิง รายงานความก้าวหน้างานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร ปี 2548 ไตรมาส 3 (เมษายน –มิถุนายน 2548) โครงการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสมุนไพร พืชพื้นเมืองและพืชใกล้สูญพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์. หน้า 506.

13. ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1-2 แสดงหัวว่านเพชรกลับ







ภาพผนวกที่ 3-4 แสดง หน่ออ่อนที่ใช้ขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5-6 แสดง ต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด