รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด
แผนงานวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม.
โครงการวิจัยการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช

ชื่อการทดลอง : การเก็บรักษาพืชหายากใกล้สูญพันธุ์สกุลไก่ฟ้าในสภาพปลอดเชื้อ : กระทุงบวบเหลี่ยม (*Aristolochia baenzigeri* B.Hansen & Phuph) และ กระเช้าหนู (*Aristolochia helix* Phuph.)

ชื่อการทดลอง : Conservation of rare species and very risk to distinction *Aristolochia baenzigeri* B.Hansen & Phuph. and *Aristolochia helix* Phuph.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นายปราโมทย์ ไตรบุญ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
นางชยานิจ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

กระทุงบวบเหลี่ยม (*Aristolochia baenzigeri* B.Hansen & Phuph) และ กระเช้าหนู (*Aristolochia helix* Phuph.) จัดเป็นพืชถิ่นเดียว (Endemic plant) และพืชหายาก (Rare) โดยกระทุงบวบเหลี่ยมพบได้ที่ จ.แม่ฮ่องสอน และกระเช้าหนู พบได้ที่ จ.พังงา ซึ่งปัจจุบันมีจำนวนลดลง เนื่องจากสภาพตามธรรมชาติถูกทำลาย จึงทำการศึกษาเพื่อการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พืชทั้งสองชนิดในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ โดยฟอกฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง สำหรับกระทุงบวบเหลี่ยมใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 20 นาที ครั้งที่ 1 และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 30 นาที ครั้งที่ 2 ส่วนต้นกระเช้าหนูใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ครั้งที่ 1 และ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ครั้งที่ 2 และเมื่อทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอดของต้นกระเช้าหนู พบว่า สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ต้นกระเช้าหนูเกิดยอดมากที่สุด 3.13 ยอด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ต้นกระเช้าหนูมีความยาวของยอดใหม่สูงที่สุด 5.12 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนต้น

กระทุงบวบเหลี่ยมไม่ตอบสนองต่อสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบและต้นตายในที่สุด และต้นกระเช้าหนูสามารถเก็บอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 4 เดือน โดยการเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ABSTRACT

Aristolochia baenzigeri B.Hansen & Phuph and *Aristolochia helix* Phuph are identified as endemic plant and rare species of Thailand. *A. baenzigeri* is rarely found at Mae Hong Son province, and *A. helix* is also rarely found at Phangnga province. Reduction of this rare species are occurred by the ecological changed. To conserve this rare species they were propagated *in vitro* in the laboratory. Seeds of *A. baenzigeri* was sterilized twice by 15% and 5% sodium hypochlorite for 20 and 30 minutes, respectively. Seeds of *A. helix* was sterilized twice by 15% and 10% sodium hypochlorite for 10 minutes. Shoot induction was developed using MS medium complemented with 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 $mg.L^{-1}$ BA (6-Benzylaminopurine) and 0.5, 1.0, 1.5 $mg.L^{-1}$ NAA (Napthaline acetic acid). Shoot induction of *A. helix* was significantly increased with completely plant type on the MS medium complemented with 1 $mg.L^{-1}$ BA and 0.5 $mg.L^{-1}$ NAA for 3.13 shoots per clump. Unfortunately, *A. baenzigeri* was not responded to the developing medium, and they died after treatment. The plantlets of *A. helix* were transferred to MS medium and then were conserved for 4 months before sub-culturing.

คำนำ

การสำรวจรวบรวมพันธุ์พืชตามพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยโดยนักวิชาการ กลุ่มวิจัยพันธุ์พืช กองคุ้มครองพันธุ์พืช พบว่า มีพืชหายาก และใกล้สูญพันธุ์ทั้งหมดในประเทศไทยนั้นประเมินได้ว่ามากกว่าร้อยละ 30 ถึงแม้ว่าจากการประเมินในพืชหายากที่ขึ้นบัญชีไว้มีเพียง 1,407 ชนิด โดยมีสาเหตุหลักหลายประการได้แก่ พื้นที่แหล่งอาศัยหรือแหล่งกระจายพันธุ์ที่เกิดอยู่ในพื้นที่ป่าตามธรรมชาติถูกบุกรุกทำลายจากมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม การถูกจำกัดการกระจายพันธุ์จากปัจจัยธรรมชาติเอง และจากการถูกคุกคามโดยมนุษย์เก็บไปใช้ประโยชน์โดยขาดความรู้และขาดจิตสำนึก (วินัย และคณะ, 2550)

วงศ์ไก่ฟ้า ARISTOLOCHIACEAE (ก่องกานดา, 2548 ; Phuphathanaphong, 1984)

ลักษณะประจำวงศ์ ไม้เลื้อยเนื้อแข็ง เป็นพืชกินแมลง มีรสขม หรือรสพริกไทย มีน้ำยางใส ใบเดี่ยว มีเส้นใบออกจากจุดโคนใบ และออกจากสองข้างของเส้นกลางใบแบบขนนก โคนใบรูปหัวใจ ดอกสมมาตร

ด้านข้าง กลีบรวมเชื่อมติดกัน ที่โคนเป็นกระเปาะมีรูปร่างแตกต่างกัน รูปร่างคล้ายไก่ฟ้า มีกลิ่นเหม็น สีสะดุดตา ก้านเกสรเพศเมีย และเกสรเพศผู้มักเชื่อมกันเป็นเส้าเกสร รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 6 ช่อง บางชนิดจะบิดเป็นเกลียวขณะที่เจริญขึ้น ผล เป็นแบบผลแห้งแตก แตกตามรอยตะเข็บมีรูปร่างคล้ายกระเช้า

ลักษณะเด่นของวงศ์ ไม้เลื้อย ใบเดี่ยว มีเส้นใบออกจากจุดโคนใบ ดอกที่โคนเป็นกระเปาะรูปร่างคล้ายไก่ฟ้า ผลมีรูปร่างคล้ายกระเช้า

ประโยชน์ บางชนิดเป็นพืชสมุนไพร โดยใช้ราก หัวใต้ดิน และลำต้น

การกระจายพันธุ์ ในเขตร้อน ในประเทศไทยมี 2 สกุล

- สกุลไก่ฟ้า *Aristolochia* เป็นไม้เลื้อย ชนิดที่พบทั่วไป คือ กระเช้าผีมด *Aristolochia tagala* Cham กระเช้าถุงทอง *Aristolochia pothieri* Pierre ex Lecomte
- สกุลหูหมี *Thottea* เป็นไม้ล้มลุก ชนิดที่พบทั่วไป คือ *Thottea tomentosa* (Blume) Ding Hou

<u>กระทุงบวบเหลี่ยม</u> มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Aristolochia baenzigeri* B. Hansen & L.Phuphathanaphong มีลักษณะเป็นไม้เถาที่มีเนื้อไม้ มีการกระจายพันธุ์ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยในเขต อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน โดยอยู่ในแถบภูเขาหินปูน ที่มีระดับความลึก 800 เมตร จัดเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic species) และพืชหายาก (Rare)

<u>กระเช้าหนู</u> มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Aristolochia helix* Phuph. มีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน (Herbaceous) มีการกระจายพันธุ์ในพื้นที่แถบคาบสมุทรประเทศไทย ในเขต จ.กระบี่ และ จ.พังงา โดยอยู่ในเขาหินปูนซึ่งมีความเป็นเอกลักษณ์โดยลักษณะภูมิประเทศ และองค์ประกอบทางชีวภาพที่ไม่สามารถหาทดแทนได้จากที่ใดในโลก จัดเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) และพืชหายาก (Rare)

ดังนั้นการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนทรัพยากรพืชถิ่นเดียว (Endemic plant) และพืชหายาก (Rare) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเก็บรักษาพรรณพืชที่หายากและพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์ของพืชสกุลไก่ฟ้า (*Aristolochia*) ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งอาจมีศักยภาพในเชิงเศรษฐกิจในอนาคต และเพื่อเก็บรักษาความหลากหลายของประชากรพืชที่มีคุณลักษณะพิเศษ สำหรับการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์พืชต่อไป

การอนุรักษ์พืช (สุญาณี, 2550) คือ การเก็บรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ปรับปรุงพันธุ์พืช หรือพืชบางชนิดมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง จึงควรนำมาอนุรักษ์ไว้เพื่อคนรุ่นหลังได้พัฒนาใช้ประโยชน์ด้วย

ความหมายของคำว่าการอนุรักษ์ไม่ใช่เป็นการเก็บรักษาไว้อย่างเดียว แต่หมายถึง การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน รวมถึงการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณและนำกลับคืนสู่ถิ่นกำเนิดในธรรมชาติอีกด้วย (ในกรณีของพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์)

การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสามารถทำได้หลายรูปแบบ และเมื่อเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับการพัฒนาขึ้น ก็ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีนี้มาใช้เพื่อการอนุรักษ์ด้วย เนื่องจากการเก็บรักษาในรูปแบบของ *in vitro* storage นั้น มีข้อดีหลายอย่าง เช่น

1. สามารถเก็บได้ในพื้นที่จำกัด เช่น ใน vials, ขวดแก้ว, Petri-dishes บนหิ้งเพาะเลี้ยงในตู้ incubator หรือในภาชนะบรรจุ liquid nitrogen กรณีที่ทำ cryopreservation

2. ปลอดเชื้อ เพราะใช้ aseptic techniques

3. สะดวกในการแลกเปลี่ยน germplasm โดยเฉพาะส่งข้ามพรมแดน

Manjula และคณะ(1997) รายงานการศึกษา *Aristolochia indica* L. ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเฉลี่ย 40-50 ยอด จากชิ้นส่วนของตาข้างบนอาหาร MS ซึ่งเติม NAA 0.54 µM และ BA 13.31 µM และชักนำการเกิดยอดจากแคลลัสซึ่งเกิดจากชิ้นส่วนใบได้ในอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA 2.69 µM, BA 13.31 µM และ Phloroglucinol (PG) 1.0 mg/l.

Siddique และคณะ (2006) ทำการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างของ *Aristolochia indica* Linn. ได้จากการเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ร่วมกับ Kinetin 2 mg/l และ BAP 1 mg/l และสามารถชักนำยอดได้บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ร่วมกับ Kinetin 2.5 mg/l และ BAP 1 mg/l.

Bravo และคณะ (1999) ศึกษาการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Aristolochia fimbriata* Cham. ด้วยชิ้นส่วนตาข้างบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ Vitamins ในสูตร Gamborg ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA3 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2.5 mg/l และ IBA 0.25 mg/l สามารถชักนำยอดในอัตรา 5 เท่าได้ในระยะเวลา 14 วัน

Joseph และ Sidique (2011) ศึกษาการเพิ่มปริมาณของ *Aristolochia bracteolata* Lam. พบว่าการชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณยอดได้ 8.9 ยอด เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำรากได้เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ IBA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช ได้แก่ ต้นกระเช้าหนู และ ต้นกระทุงบวบเหลี่ยม
2. ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BA (6-Benzyladenine), NAA (Naphthaleneacetic acid), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)
5. สารอินทรีย์ ได้แก่ น้ำมะพร้าว
6. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ เช่น สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) (Clorox ®)

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างพืชจากแหล่งกำเนิด
   - *Aristolochia baenzigeri* B. Hansen & Phuph., พื้นที่ จ.แม่ฮ่องสอน
   - *Aristolochia helix* Phuph. พื้นที่ จ.พังงา
2. คัดเลือกวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม
3. ทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอด โดยทดสอบบนสูตร MS ร่วมกับ BA ที่ระดับ 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกผลจำนวนยอดและความยาวยอด
4. ทดสอบสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์เพื่อการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ โดยทดสอบบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ น้ำมะพร้าวปริมาตร 100 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกอัตราการรอดชีวิตเมื่อเก็บในระยะเวลานาน 4 เดือน

สถานที่ทำการทดลอง /เก็บข้อมูล

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

ระยะเวลาทำการวิจัย

ตุลาคม 2553 - กันยายน 2556

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างพืชจากแหล่งกำเนิด

1) <u>กระเช้าหนู</u> (*Aristolochia helix* Phuph.) จากการสำรวจพบต้นกระเช้าหนูมีการเจริญเติบโตในสภาพเขาหินปูน ต้นมีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน รากจะอยู่ตามซอกหิน ลักษณะต้นจะเกาะไปตามหิน หรือห้อยย้อย (ภาพที่ 1) ดอกมีขนาดเล็กสีน้ำตาล ใบเป็นรูปหัวใจ (ภาพที่ 2) พบได้เฉพาะพื้นที่เขาหินปูน อ.ทับปุด จ.พังงา สอดคล้องกับ (ก่องกานดา, 2548) พบต้นกระเช้าหนู มีการกระจายพันธุ์ในพื้นที่แถบคาบสมุทรประเทศไทย ในเขต จ.กระบี่ และ จ.พังงา โดยอยู่ในเขาหินปูนซึ่งมีความเป็นเอกลักษณ์โดยลักษณะภูมิประเทศ และองค์ประกอบทางชีวภาพที่ไม่สามารถหาทดแทนได้จากที่ใดในโลก จัดเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) และพืชหายาก (Rare)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะพื้นที่เขาหินปูนที่พบต้นกระเช้าหนู อ.ทับปุด จ.พังงา

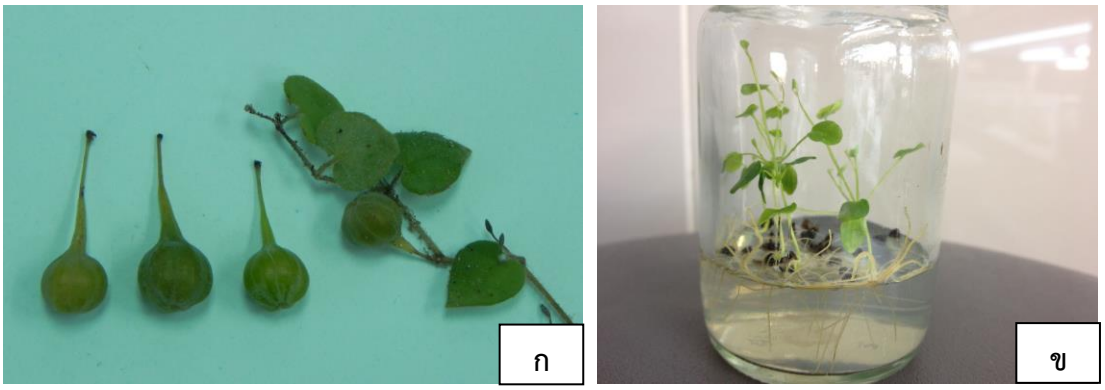
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะดอก และ ใบของต้นกระเช้าหนู *(Aristolochia helix* Phuph)

2) <u>กระทุงบวบเหลี่ยม</u> *(Aristolochia baenzigeri* B. Hansen & Phuph.) จากการสำรวจในพื้นที่ดอยปุย บ้านห้วยฮี้ ต.ห้วยปูลิง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน พบต้นกระทุงบวบเหลี่ยมในพื้นที่มีลักษณะเป็นไม้เถาที่มีเนื้อไม้ (ภาพที่ 3) โดยอยู่ในแถบภูเขาหินปูน ที่มีระดับความลึก 800 เมตร จัดเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic species) และพืชหายาก (Rare) (ก่องกานดา, 2548)

ภาพที่ 3 ลักษณะต้น ใบ และฝัก ของต้นกระทุงบวบเหลี่ยม พื้นที่บ้านห้วยปูลิง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน

2. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อพืชสกุลไก่ฟ้า

<u>กระเช้าหนู</u> การฟอกฆ่าเชื้อ พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Clorox ®) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ครั้งที่ 1 และ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Clorox ®) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ครั้งที่ 2 จากนั้นเลี้ยงบนอาหารสูตร MS สามารถเกิดต้นได้คิดเป็นร้อยละ 70 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลของกระเช้าหนู (ก) และต้นที่งอกเมื่อผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (ข)

<u>กระทุงบวบเหลี่ยม</u> วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Clorox ®) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 1 ระยะเวลา 20 นาที และ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 2 ระยะเวลา 30 นาที เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เมล็ดมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นร้อยละ 30 (ภาพที่ 5) และพบว่าเมล็ดมีอัตราการงอกต่ำมากคิดเป็นร้อยละ 10

สูตรอาหาร MS

ภาพที่ 5 การงอกจากเมล็ดของต้นกระทุงบวบเหลี่ยมเมื่อผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ

3. ทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอด โดยทดสอบบนสูตร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>กระเช้าหนู</u> นำต้นที่งอกจากสูตรอาหาร MS มาทดสอบการเพิ่มปริมาณโดยการชักนำยอดบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ต้นกระเช้าหนูเกิดยอดมากที่สุด 3.13 ยอด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ต้นกระเช้าหนูมีความยาวของยอดใหม่สูงที่สุด 5.12 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดจัดอยู่ในกลุ่มอักษรที่ดีที่สุด ร่วมกับพิจารณาค่าเฉลี่ยของ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีเฉลี่ยการเกิดจำนวนยอดอยู่ในกลุ่มอักษรที่ดีที่สุดเช่นกัน (โดยพิจารณาค่าตัวอักษรเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference ของตารางที่ 1) รวมทั้งลักษณะต้นที่สมบูรณ์ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1 , ภาพที่ 6) จึงควรเลือกใช้ สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อการชักนำยอด สอดคล้องกับ Joseph และ Sidique (2011) ศึกษาการเพิ่มปริมาณของ *Aristolochia bracteolata* Lam. พบว่า การชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณยอดได้ 8.9 ยอด เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และรายงานการศึกษาของ Manjula และคณะ (1997) พบว่า *Aristolochia indica* L. ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพรสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเฉลี่ย 40-50 ยอด จากชิ้นส่วนของตาข้างบนอาหาร MS ซึ่งเติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 1 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยอด และความยาวของยอดของกระเช้าหนู ทดสอบในสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

กรรมวิธี	จำนวนยอด (ต้น)	ความยาวยอด (ซม.)
MS + BA 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l	2.33 abc [1/]	4.72 ab
MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l	2.60 ab	5.12 a
MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1.5 mg/l	1.13 c	1.60 d
MS + BA 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l	3.13 a	4.47 abc
MS + BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l	2.13 ab	3.01 cd
MS + BA 1 mg/l + NAA 1.5 mg/l	2.93 a	4.96 a
MS + BA 1.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l	2.06 abc	3.46 abc

MS + BA 1.5 mg/l + NAA 1 mg/l	2.06 abc	3.16 bc
MS + BA 1.5 mg/l + NAA 1.5 mg/l	2.53 abc	3.47 abc
MS + BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l	2.00 abc	4.02 abc
MS + BA 2 mg/l + NAA 1 mg/l	1.46 bc	3.16 bc
MS + BA 2mg/l + NAA 1.5 mg/l	2.46 abc	4.06 abc
F-test	ns	**
cv (%)	35.66	32.96

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

MS + BA 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l

MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l

MS + BA 0.5 mg/l + NAA 1.5 mg/l

MS + BA 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l

MS + BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l

MS + BA 1 mg/l + NAA 1.5 mg/l

MS + BA 1.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l

MS + BA 1.5 mg/l + NAA 1 mg/l

MS + BA 1.5 mg/l + NAA 1.5 mg/l

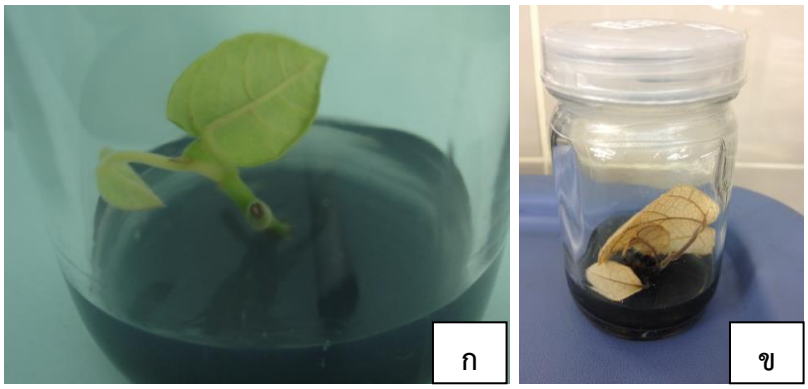
MS + BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l

MS + BA 2 mg/l + NAA 1 mg/l

MS + BA 2mg/l + NAA 1.5 mg/l

ภาพที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดของต้นกระเช้าหนู

<u>กระทุงบวบเหลี่ยม</u> นำต้นกระทุงบวบเหลี่ยมที่งอกจากเมล็ดภายในสภาพปลอดเชื้อ มาทดสอบหาสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA และ NAA พบว่า เมื่อนำตายอด และ ตาข้าง ของต้นกระทุงบวบเหลี่ยมทดสอบบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ พบว่าตายอดมีการพัฒนาขึ้นเป็นต้น แต่ไม่เกิดราก และเมื่อเลี้ยงนาน 3 เดือน ต้นเกิดการแห้งตายไปในที่สุด (ภาพที่ 7) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงไม้ป่าเหล่านี้ ปัญหาที่สำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง นอกจากเรื่องการปนเปื้อน ก็คือการร่วงของใบ อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสม ซึ่งสามารถแก้ไขโดยการเติม $AgNO_3$ เพื่อแก้ไขการร่วงของใบในอาหาร และปัญหาชิ้นส่วนพืชเกิดสีดำและตาย ซึ่งอาจแก้ไขโดยการแช่ชิ้นส่วนใน ascorbic acid ก่อนย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร หรือปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในสภาพแวดล้อมให้สูงขึ้น (วรรัตน์ และคณะ, 2549 ; Kyte และ Kleyn, 1996) และสอดคล้องกับ Pierik (1987) ได้กล่าวไว้ว่า พืชเขตร้อนส่วนใหญ่จะตอบสนองต่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่สูงกว่าพืชในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยจำกัดที่สำคัญปัจจัยหนึ่งของความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย



ภาพที่ 7 ต้นกระทุงบวบเหลี่ยมที่พัฒนาจากสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 13.31 ไมโครโมลาร์ และ NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลาร์ (ก) และ สภาพต้นที่แห้งตาย เมื่อเลี้ยงนาน 3 เดือน (ข)

4. ทดสอบสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์เพื่อการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดของกระเช้าหนูที่เกิดจากากรชักนำในการทดลองที่ 3 ตัดแยกและเลี้ยงทดสอบบนสูตรอาหารเพื่อให้เจริญเติบโตเป็นต้นเดี่ยวที่มีราก พร้อมสำหรับการนำออกปลูก โดยทดสอบบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ น้ำมะพร้าวปริมาตร 100 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลา 4 เดือน พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมน้ำมะพร้าวและ 2,4-D ต้นกระเช้าหนูจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด (ภาพที่ 8) โดยมีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในต้นพืช (plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติ การเจริญเติบโตตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ทั้งสิ้น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่จำเป็นเสมอไป และสัดส่วนและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดที่ต้องการจะผันแปรไป ขึ้นกับระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงและชนิดพืช (รังสฤษฎ์, 2540)

MS (control)

MS + CW 100 ml + 2,4-D 0.1 mg/l

MS + CW 200 ml + 2,4-D 0.1 mg/l

MS + CW 100 ml + 2,4-D 0.5 mg/l

MS + CW 200 ml + 2,4-D 0.5 mg/l

MS + CW 100 ml + 2,4-D 1 mg/l

MS + CW 200 ml + 2,4-D 1mg/l

ภาพที่ 8 ผลของน้ำมะพร้าวและ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของต้นกระเช้าหนู

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การฟอกฆ่าเชื้อพืชสกุลไก่ฟ้าสามารถใช้ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Clorox ®) ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ โดยฟอกฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง จะได้ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ
   - กระเช้าหนู ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ครั้งที่ 1 และความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10 นาที ครั้งที่ 2
   - กระทุงบวบเหลี่ยม ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 20 นาที ครั้งที่ 1 และความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 30 นาที ครั้งที่ 2
2. การชักนำยอดของต้นกระเช้าหนู ควรใช้ สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ต้นกระเช้าหนูเกิดยอดมากที่สุด ส่วนต้นกระทุงบวบเหลี่ยมไม่ตอบสนองต่อสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบและต้นตายในที่สุด
3. สูตรอาหารที่ทำให้ต้นกระเช้าหนูสมบูรณ์และเก็บในสภาพปลอดเชื้อได้นานที่สุด 4 เดือน คือ สูตรอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อของพืชสกุลไก่ฟ้า 2 ชนิด คือ กระเช้าหนู และกระทุงบวบเหลี่ยม
2. ได้สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ต้นกระเช้าหนูเกิดยอดได้
3. ได้สูตรอาหารที่เลี้ยงต้นกระเช้าหนูและสามารถเก็บในสภาพปลอดเชื้อได้

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2548. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้ : Key Characters of Plant Families. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ. 107 หน้า

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 219 น.

วรรัตน์ บุญสนองสุภา, มาลี ณ นคร, กมลพรรณ นามวงศ์พรหม, ลิลลี่ กาวีต๊ะ, สุรียา ตันติวิวัฒน์ และ ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2549. การเพิ่มปริมาณยอดและการป้องกันการหลุดร่วงของใบพืชสกุล *Uvaria* บางชนิดในสภาพหลอดทดลอง. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ (700 หน้า) : 282-288.

วินัย สมประสงค์, พงษ์ศักดิ์ พลตรี, ปราโมทย์ ไตรบุญ, กาญจนา พฤษพันธ์, วิลาสินี ปานอินทร์, บดินทร สอนสุภาพ และประนัย เพ็ญจิตร. 2550. พรรณไม้แห่งแผ่นดิน เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระ

เจ้าอยู่หัว เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 80 พรรษา 5 ธันวาคม 2550. เอกสารเผยแพร่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ ลำดับที่ 2, กรมวิชาการเกษตร. 133 หน้า

สุญาณี เวสสบุตร. 2550. การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (In vitro Conservation). องค์การสวนพฤกษศาสตร์, กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.qsbg.org/webboard/webboard_Detail-1.asp?Board_ID=614

Bravo, C., Yormann, G. and B. Llorente. 1999. Micropropagation of *Aristolochia fimbriata* Cham. Acta Hort 205 : 339-346.

Joseph S. and K.M. Inayath Sidique. 2011. In vitro Rapid Clonal Propagation of *Aristolochia bracteolata* Lam. (Aristolochiaceae)-A Valuable Medicinal Plant. World Journal of Agricultural Sciences 7 (6): 653-658.

Kyte, L. and J. Kleyn. 1996. Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation. 3rd ed. Timber Press, Inc., Hong Kong. 240 pp.

Manjula, S.,Anita, T., Benny, D. and G.M. Nair. 1997. *In vitro* plant regeneration of *Aristolochia indica* through axillary shoot multiplication and organogenesis. . Plant Cell Tissue Organ Cult 51 : 145-148.

Phuphathanaphong, L., 1984. *Aristolochia helix* sp. nov. Aristolochiaceae from Thailand. Nordic journal of botany 4(4): 467-468

Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, The Netherland. 344 pp

Rewat L. and B. Siriwan, 1993. Growth Reduction of Papaya Plantlets for *In Vitro* Germplasm Preservation. Kaset. J. 27: 12-14.

Siddique, N.A., Bari, M.A., Pervin, M.M., Nahar, N., Banu, L.A., Paul, K.K., Kabir, M.H., Huda, A.K.M.N., Ferdaus, K.M.K.B. and M.J. Hossin. 2006. Plant Regeneration from Axillary Shoots Derived Callus in *Aristolochia indica* Linn. An Endangered Medicinal Plant in Bangladesh. Pakistan Journal of Biological Sciences 9 (7) : 1320-1323.