แบบ 1

(แบบฟอร์ม)

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : โครงการวิจัยการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (ชุดโครงการวิจัยเดี่ยว)
2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : *In vitro* conservation of *Stemona* spp.
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางศิริลักษณ์ อินทะวงศ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่

: นายวรกิจ ห้องแซง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **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 พบว่าสูตร 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

6. **คำนำ**

หนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ทั้งด้านรักษาสุขภาพ โดยปรุงเป็นยารับประทานรักษาอาการไอ ขับเสมหะ ฆ่าพยาธิ นำมาพอกรักษาโรคผิวหนัง (วุฒิ, 2552) ด้านการควบคุมแมลงพาหะนำโรค สามารถใช้น้ำคั้นหรือสารสกัดจากรากกำจัดลูกน้ำยุงได้ (ณัฐวดี, 2551) ด้านเกษตรกรรม สามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยนำน้ำคั้นผสมน้ำฉีดพ่นฆ่าหนอน

และแมลงศัตรูพืชซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารเคมีได้ (วุฒิ, 2552; พนมกร, 2550; Montri, *et al.* 2006) การจะได้มาซึ่งสารดังกล่าวจะต้องขุดต้นหนอนตายหยากมาทั้งต้นแล้วนำรากมาคั้นน้ำหรือสกัดสารก่อนนำไปใช้

หนอนตายหยากเป็นพืชสกุล *Stemona* วงศ์ STEMONACEAE สามารถพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย แต่จะพบมากบริเวณป่าเชิงเขาไม่สูงมากนักในแถบภาคกลางและภาคเหนือ เป็นพืชที่มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยเถามีเนื้อแข็ง รูปใบคล้ายใบพลู แต่ปลายใบจะแหลมยาว เส้นใบตามยาวมีหลายเส้นเห็นได้ชัดขนานกับขอบใบ ระหว่างเส้นใบตามยาวจะมีเส้นใบตามขวางออกมาประสานกันจนดูเป็นตาสี่เหลี่ยม ดอกเป็นกลีบคล้ายดอกจำปามีสีขาว ข้างในมีสีม่วงแดง ฝักเล็กปลายแหลมมีสีน้ำตาล ในช่วงฤดูแล้งลำต้นบนดินจะโทรม เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนจังจะงอกใหม่พร้อมทั้งออกดอกขนาดเล็กสีขาวหรือสีม่วงแล้วแต่พันธุ์ ลำต้นใต้ดินจะมีรากออกเป็นพวงสีขาวรูปกระสวยคล้ายรากกระชาย จำนวน 50-80 ราก แต่ละรากจะยาว 12-20 ซม.ในประเทศไทยมีรายงานหนอนตายหยากจำนวน 8 ชนิด (เต็ม, 2544; สุทธพันธ์, 2544; Chuakul, 2000) ได้แก่ โป่งมดง่าม (*Stemona burkillii* Prain.) หนอนตายหยากใหญ่ (*S. collinsae* Craib.) รากลิงหรือหนอนตายหยาก (พัทลุง) (*S. curtisii* Hook.f.) หนอนตายหยากเล็ก (*S. tuberose* Lour.) เครือปรุง (*S. aphylla* Craib.) หญ้าปอบน้อย (*S. hutunguriana* Nov.) *S. phyllantha* Gangeb (ไม่พบรายงานชื่อไทย) และ *S. beerii* Craib. (ไม่พบรายงานชื่อไทย) และ สำหรับหนอนตายหยากที่นิยมใช้คือหนอนตายหยากใหญ่ และหนอนตายหยากเล็ก

การขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากโดยทั่วไปใช้วิธีการแยกเหง้าและเพาะเมล็ด โดยต้นหนึ่งจะมีผลประมาณ 2-5 ผล ภายในผลจะมีเมล็ดประมาณ 2-7 เมล็ด ซึ่งไม่เพียงต่อการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมากเพื่อทดแทนส่วนที่ถูกขุดออกมาจากป่า และการปลูกในเชิงการค้ายังมีน้อย ดังนั้นการนำหนอนตายหยากมาใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นยาสมุนไพร หรือสารควบคุมแมลงศัตรูพืช วัตถุดิบที่ได้ส่วนใหญ่มีที่มาจากป่าทั้งสิ้น ประกอบกับสภาพอากาศในปัจจุบันที่มีความแปรปรวนอย่างรุนแรงทั้งแห้งแล้งและน้ำท่วม ทำให้นับวันเริ่มที่จะหายากมากขึ้น มีการนำเข้าจากต่างประเทศตามช่องทางตะเข็บชายแดนต่างๆ เนื่องจากมีการรับซื้อในราคาแพง กิโลกรัมละ 60-100 บาท และยังเป็นที่ต้องการของตลาดสูง ทำให้มีการเก็บมาขายโดยไม่ได้ปลูกทดแทน นอกจากนี้การขุดรากจำนวนมากยังส่งผลต่อระบบนิเวศวิทยาของป่า จึงสมควรที่จะหาทางอนุรักษ์พืชเหล่านี้ไว้ โดยการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากและนำกลับคืนสู่ป่า ซึ่งวิธีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงคือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541)

กาญจนา และอริยาภรณ์ (2551) ทดลองขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำยอดหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.2 1.8 และ 2.4% นาน 15 นาที เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 มก./ล. อุณหภูมิ 25±2 ซ ความเข้มแสง 37.6 ไมโครโมล/ตร.ม./วินาที โดยให้แสงสว่าง 12 ช.ม. ต่อวัน สลับกับความมืด 12 ช.ม. ต่อวัน จากนั้นจึงนำไปชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 1 2 3 5 7 และ 9 มก./ล. ผลการทดลอง พบว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 1.2% มีประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี ทำให้ยอดมีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาได้ถึง 83.3% สูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด 7 ยอดต่อชิ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 และ 7.5 มก./ล. (ให้จำนวนยอดต่อชิ้น

เท่ากับ 6 และ 5 ยอด ตามลำดับ) ส่วนการชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IBA ระดับต่างๆ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100%

ศิริกุล และคณะ (2548) ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร (*Magnolia sirindhornias* Noot. & Chalermglin) ในหลอดทดลองระยะปานกลางในสภาพชะลอการเจริญ (minimal growth condition) พบว่า ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 ชนิดคือ น้ำตาลซูโครส และแมนนิทอล และความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคบิวทาโซล ต่างก็มีผลต่อการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร โดยความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 3/4MS น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสารแพคโคบิวทาโซล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บรักษาปลายยอดได้นานสูงที่สุดถึง 7 เดือน ตรวจพบการรอดชีวิต 73.3±8.2%

Animesh *et al.* (2011) ทดลองการชักนำส่วนข้อต้นหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) ที่มีตาข้างติดอยู่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 20 วัน แล้วจึงย้ายออกมาเพาะเลี้ยงไว้ภายใต้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน สลับกับสภาพมืด 8 ช.ม./วัน พบว่า สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้จำนวนมากถึง 12.7 ยอดต่อชิ้น จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP (0.1-1.5 มก./ล.) ร่วมกับ IBA (0.1-1.0 มก./ล.) เพื่อกระตุ้นให้ยอดที่เกิดยืดยาวเพิ่มขึ้น แล้วจึงชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร half strength MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ต้นหนอนตายหยากที่สมบูรณ์สามารถย้ายออกปลูกในกระถางได้สำเร็จ

Rakkimuthu *et al.* (2011) ศึกษาการขยายพันธุ์ของ *Alpinia zerumbet* ซึ่งเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยใช้ตาที่อยู่บนเหง้าด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Micropropagation) โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดได้แก่ BA (0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มก./ล.) และ Kinetin (0.5 มก./ล.) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6-7 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้สูงที่สุด ที่ 95% เมื่อนำยอดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เพื่อชักนำให้สร้างราก และสามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้สำเร็จ

Singlaw *et al.* (2008) ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของหนอนตายหยากในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดหนอนตายหยากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม Cytokinin 5 ชนิดคือ 2iP, BA, Kinetin, Zeatin และ TDZ แต่ละชนิดทดลองใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ กันคือ 0 1 5 10 และ 15 มก./ล. เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-28 ซ ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน พบว่า ทุกสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม cytokinin สามารถกระตุ้นให้หนอนตายหยากเกิดยอดใหม่ได้ โดย TDZ ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด (3.1±0.52 ยอดต่อชิ้น) รองลงมาคือ BA ความเข้มข้น 5 และ 10 มก./ล. (2.62±0.12 และ 2.6±0.76 ยอดต่อชิ้น) ตามลำดับ และพบกว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารควบคุมในอาหารสังเคราะห์จะส่งผลให้ความยาวยอดที่เกิดใหม่ลดลง

Montri *et al.* (2006) ศึกษาการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook f.) ในสภาพหลอดทดลอง โดยนำข้อ (node) ที่มีตาข้าง (axillary bud) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการ

เจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 20 μM เพื่อกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ จากนั้นจึงนำมาทดสอบความเหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินจำนวน 5 ชนิด (2iP, BAP, kinetin, TDZ, zeatin) เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่ความเข้มข้นที่ระดับแตกต่างกัน 0-20 μM พบว่า BAP ที่ความเข้มข้น 20 μM ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 4.4 ยอดต่อชิ้น จากนั้น จึง subculture ยอดใหม่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 เดือน ก่อนจะย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 3 ชนิด (IAA, IBA, NAA) เพื่อชักนำให้เกิดราก โดยใช้ความเข้มข้นที่ระดับแตกต่างกัน 0-20 μM พบว่า ทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยสูตรที่ชักนำให้เกิดรากได้จำนวนมากที่สุดคือ IAA ความเข้มข้น 10 μM เมื่อได้ต้นสมบูรณ์สามารถนำออกปลูกในโรงเรือนได้สำเร็จ

Montri *et al.* (2009) ศึกษาการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) ในสภาพหลอดทดลอง โดยนำปลายยอด (shoot) และข้อ (node) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 20 μM เพื่อกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ จากนั้นจึงนำมาทดสอบความเหมาะสมของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลองระหว่าง สูตร B5 เปรียบเทียบกับสูตร MS โดยใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า สูตร full-strengh MS เป็นสูตรที่เหมาะสมมากที่สุด ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จึงเลือกใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (0-20 μM) ร่วมกับ IBA (0-5 μM) พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM ให้จำนวนยอดสูงที่สุด เมื่อนำยอดใหม่ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเป็นเวลา 2 เดือน จึงเกิดรากและสามารถนำออกปลูกในโรงเรือนได้สำเร็จ

7. วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์และวิธีการ</u>

7.1 รวบรวมข้อมูล และรวบรวมหนอนตายหยาก มาปลูกในโรงเรือน

7.2 นำสมุนไพรหนอนตายหยาก มาทดลองเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนี้

(1) การฟอกฆ่าเชื้อ

นำยอดใหม่ที่แตกออกมาจากหน่อ หรือข้อปล้องของหนอนตายหยาก ซึ่งมียอดอ่อนยาวมาล้างดินออกโดยล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาดหรือผงซักฟอก แล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาดจนหมดคราบผงซักฟอก วางผึ่งไว้ให้หมาด เริ่มฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยตัดชิ้นส่วนให้มีความยาว 4-6 ซม. โดยให้มีข้อติดอยู่อย่างน้อย 2-3 ข้อต่อชิ้น นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 หรือ 10 % ที่เติม tween20 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนให้ติดข้อยาวอย่างน้อย 1-2 ซม. ขยายเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

(2) การเพาะเลี้ยงและชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ

ตัดแบ่งเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ของต้นหนอนตายหยากไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร 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. เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 50 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จัดสิ่งทดลองแบบแฟกทอเรียล 4×3 factorial จำนวน 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด/ 2 ชิ้นส่วน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดต่อชิ้น ลักษณะของยอดที่เกิดใหม่ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

(3) การชักนำให้เกิดราก

นำยอดที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร half-strength MS หรือ full-strengh MS ที่เติม sucrose 3% ร่วมกับ NAA 0 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จัดสิ่งทดลองแบบแฟกทอเรียล 2×3 factorial จำนวน 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด/ 2 ชิ้นส่วน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การเกิดราก ลักษณะรากที่เกิดขึ้น ปริมาณราก

13.3 การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (minimal growth storage)

(1) ตัดยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 13.2 ให้มีความยาวประมาณ 2 ซม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการชะลอการเจริญเติบโต สูตร MS full-strength และ MS half-strength ที่เติม sucrose 3% ร่วมกับการเติม mannitol 0 1 หรือ 2% โดยทุกสูตรจะเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 13.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จัดสิ่งทดลองแบบแฟกทอเรียล (factoria) 2x3 มีทั้งสิ้น 6 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 12 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองทุกเดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งยอดเกินกว่า 50% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในทรีทเมนต์นั้นๆ โดยข้อมูลที่บันทึกเป็นระยะเวลาที่รอดชีวิต จำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

(2) นำยอดที่รอดชีวิตมาฟื้นฟูภายหลังการเก็บรักษาบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA 2 ม.ก./ล. หรือ TDZ 1 ม.ก./ล. หรือ kinetin 2 ม.ก./ล. บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดที่เกิดใหม่ และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

13.4 การนำยอดสมบูรณ์ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 13.3 ย้ายออกปลูกโดยปรับสภาพด้วยการคลายฝาขวด (แต่ยังไม่เปิดฝา) และวางไว้ในบริเวณที่เป็นอุณหภูมิห้อง 1-2 สัปดาห์ จากนั้นนำมาล้างวุ้นที่เป็นอาหารสังเคราะห์ออกให้หมด แล้วปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ทรายกับขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว คลุมถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น วางไว้ในโรงเรือนที่มีการพรางแสงอย่างน้อย 1 เดือน ก่อนย้ายลงปลูกในกระถาง บันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนใบ จำนวนยอด และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>เวลาและสถานที่ทำการทดลอง</u>

การทดลองนี้เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2555 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2557 โดยดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ (บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การเพาะเลี้ยงและชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ</u>

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้นหนอนตายหยาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 0.25 และ 0.50 มก./ล. ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0 2.5 5.0 และ 10.0 มก./ล. เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 50 วัน พบว่า ที่บริเวณข้อซึ่งมีตาข้างอยู่นั้น สามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นยอดใหม่ได้จากทุกสูตรอาหาร ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะยืดยาวเป็นสีเขียวสด (ภาพที่ 1) โดยสูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดมากที่สุดคือสูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.25 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.55 ยอดต่อชิ้น รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. และสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มก./ล. เกิดยอดเฉลี่ย 2.40 และ 2.35 ยอดต่อชิ้น ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ไม่มีอิทธิพลร่วมกันในการชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลของระดับความเข้มข้นของ NAA มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ ผลของระดับความเข้มข้นของ BA มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 1)

จากการทดลองหาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนยอดต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนที่เป็นส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดและเพิ่มจำนวนยอดได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินเป็นส่วนประกอบ (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายฉบับที่มีการนำส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ของต้นหนอนตายหยากมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน เช่น BA Kinetin TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน สามารถชักนำให้ส่วนข้อต้นหนอนตายหยากดังกล่าวเกิดยอดขึ้นใหม่ได้ (สุมนา และคณะ, 2548; Montri *et al.,*2006; Singlaw *et al*., 2008; Montri *et al.,*2009; Animesh *et al.,* 2011) โดยผลการทดลองสูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.25 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.55 ยอดต่อชิ้น รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. และสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มก./ล. เกิดยอดเฉลี่ย 2.40 และ 2.35 ยอดต่อชิ้น ตามลำดับ นั้น สอดคล้องกับรายงานของ Montri *et al*. (2006) ซึ่งเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นหนอนตายหยาก (*S. curtisii* Hook f.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 20 μM (ประมาณ 5 มก./ล.) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.4 ยอดต่อชิ้น และรายงานของ Singlaw *et al*. (2008) เพาะเลี้ยงหนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 2.62 ยอดต่อชิ้น อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุมระหว่างการเพาะเลี้ยงต้นหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อนั้นส่งผลต่อการเกิดยอดใหม่ที่แตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Animesh (2011) เพาะเลี้ยงส่วนข้อต้นหนอนตายหยาก บนอาหาร MS ที่เติม BAP 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. ควบคุมการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาพมืดก่อนเป็นเวลา 20 วัน จึงย้ายมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงสลับมืด (16/8 ช.ม./วัน) เป็นเวลา 40 วัน สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 12 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ สุมนา และคณะ (2548) รายงานว่าเพาะเลี้ยงส่วนข้อของต้นหนอนตายหยากในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. ในสภาพแสง 24 ช.ม./วัน เป็นเวลา 1 เดือน เกิดยอดเฉลี่ยถึง 19.5 ต้นต่อชิ้นส่วน ดังนั้น

การชักนำให้หนอนตายหยากเกิดยอดใหม่ได้จำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อจึงจำเป็นต้องศึกษาทั้งในส่วนชนิดและประมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมที่ควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ได้จำนวนยอดเกิดใหม่ได้มากที่สุด

<u>การชักนำให้เกิดราก</u>

การเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากในอาหารทดลองเพื่อชักนำให้เกิดราก โดยนำยอดที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร half-strength MS หรือ full-strengh MS ที่เติม sucrose 3% ร่วมกับ NAA 0 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ยอดยังคงมีการเจริญเติบโตได้แต่ช้ากว่าการเจริญของยอดในสูตรอาหารที่ใช้ทดลองชักนำให้เกิดยอด อย่างไรก็ตาม สูตรทดลองกลุ่มนี้ไม่สามารถชักนำให้ยอดหนอนตายหยากเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ ซึ่งขัดแย้งกันกับการรายงานของ Animesh *et al.*(2011) ซึ่งสามารถชักนำยอดหนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Tour.) ให้เกิดรากได้เฉลี่ย 4.7 รากต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half strength MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในขณะที่ Montri *et al.* (2006) รายงานว่าการใช้ IAA ความเข้มข้น 10 μM (1.7 มก./ล.) สามารถชักนำยอดหนอนตายหยาก (*S. curtisii* Hook f.) ให้เกิดรากได้ดีที่สุด และรายงานของ กาญจนาและอริยาภรณ์ (2551) รายงานว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 1-3 มก./ล. สามารถชักนำต้นหนอนตายหยาก (*S. collinsae* Craib.) ให้เกิดรากได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม การชักนำให้ต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อเกิดรากขึ้นได้นั้น ขึ้นอยู่กับชนิด (species) ของพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงด้วยเช่นกัน เช่น หนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) นั้น สามารถเกิดรากได้บนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยง 2 เดือน (Montri *et al.,* 2009) เป็นต้น นอกจากนี้ ชนิดและความเข้มข้นของ Auxin ที่ใช้นั้น มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากในสภาพเพาะเลี้ยง โดยหากใช้ชนิดหรือความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมกับพืชและชิ้นส่วนนั้นๆ ก็ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ (Geogre, 1993) เช่นรายงานของ อรพิน (2557) พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นผักหวานป่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้

<u>การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (minimal growth storage)</u>

จากการเพาะเลี้ยงหนอนตายหยากในอาหารทดลองเพื่อชะลอการเจริญเติบโต สูตร MS full-strength และสูตร MS half-strength เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากการทดลองการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด (BA 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.25 มก./ล.) ร่วมกับ Mannitol ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ 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 สามารถเก็บรักษาได้นาน 3.92 และ 3.83 เดือน ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างปัจจัยที่ 1 สูตรอาหารและปัจจัยที่ 2 ระดับความเข้มข้นของ mannitol อย่างไรก็ตาม พบว่า ปัจจัยที่ 1 สูตรอาหาร MS full-strength และ MS half-strenght มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2, ตารางภาคผนวกที่ 2) ผลการทดลองสูตรอาหารดังกล่าว สอดคล้องการทดลองลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS เหลือเพียง 3/4MS ใช้ร่วมกับ

การใช้น้ำตาล (sucrose) ในอัตราปกติของสูตรอาหารคือ 30 ก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรได้นาน 4 เดือน (ศิริกุล, 2548)

เมื่อพิจารณายอดที่เกิดขึ้นใหม่ระหว่างการชะลอการเจริญเติบโต พบว่า สูตร MS half-strength ที่ไม่เติม Mannitol (0 เปอร์เซ็นต์) มียอดเกิดขึ้นใหม่มากที่สุด คือ จำนวนยอดเฉลี่ย 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ สูตร MS half-strength ร่วมกับ Mannitol 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเกิดขึ้นใหม่เฉลี่ย 2.17 และ 2.00 ยอดต่อชิ้น ตามลำดับ ซึ่งไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2, ตารางภาคผนวกที่ 3) ลักษณะยอดที่เกิดใหม่ส่วนใหญ่เกาะกลุ่มรวมกันเป็นกระจุก มีความยาวหดสั้นลง เมื่อ Mannitol มีระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ รมณีย์และศาลักษณ์ (2547) พบว่า การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในอาหารที่เติม mannitol เพื่อชะลอการเจริญเติบโตนั้น เมื่อระดับความเข้มข้นของ mannitol เพิ่มขึ้น ความสูงของยอดจะลดลง

เมื่อย้ายต้นหนอนตายหยากที่ยอดยังมีสีเขียวไปเลี้ยงบนอาหารฟื้นฟูพบว่าสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ในอาหารทุกสูตร แต่ไม่เกิดราก (ตารางที่ 3)

<u>ตารางที่ 1</u> จำนวนยอดเฉลี่ยต้นหนอนตายหยากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหาร MS ที่เติม BA และ NAA ในระดับต่างๆ กัน เป็นเวลา 50 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ

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

ตารางที่ 2 ระยะเวลาเฉลี่ยและยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเก็บรักษาบนสูตรอาหารชะลอการเจริญเติบโต

สูตรอาหาร	Mannitol (%)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงได้ก่อนยอดเหลืองเกินร้อยละ 50 (เดือน)	จำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดใหม่
MS full-strength	0	2.67	1.92
	1	2.33	2.25
	2	3.42	2.00
MS half-strength	0	4.50	3.75
	1	3.92	2.17
	2	3.83	2.00

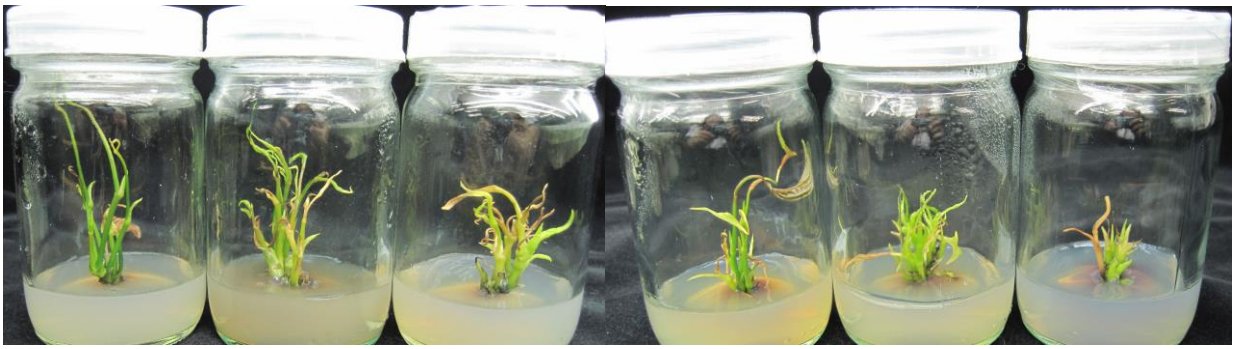
ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดใหม่ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ของต้นหนอนตายหยากที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารฟื้นฟู สูตร MS ที่เติม BA หรือ Kinetin หรือ TDZ ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ

	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	จำนวนยอดเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
BA 2 มก./ล.	90	3.2	0
Kinetin 2 มก./ล.	60	1.1	0
TDZ 1 มก./ล.	80	2.6	0

MS+BA10 มก./ล.+NAA 0.5 มก./ล.

MS+BA 10 มก./ล.+NAA 0.25 มก./ล.

<u>ภาพที่ 1</u> ลักษณะยอดใหม่ต้นหนอนตายหยากที่เกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรทดลอง เป็นเวลา 50 วัน



MS full-strength+Mannitol (0%, 1%, 2%)

MS half-strength+Mannitol (0%, 1%, 2%)

<u>ภาพที่ 2</u> ลักษณะยอดใหม่ต้นหนอนตายหยากที่เกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS full-strength และสูตร MS half-strength ร่วมกับ Mannitol (0%, 1%, 2%) เป็นเวลา 4 เดือน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรหนอนตายหยากเพื่อการอนุรักษ์ โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนข้อนั้น สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดมากที่สุดในการทดลองนี้คือสูตรที่ใช้ BA ความเข้มข้น 10 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.25 มก./ล. รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. และสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มก./ล. ตามลำดับ

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาสมุนไพรหนอนตายหยากในการทดลองนี้ ได้แก่ สูตรอาหาร MS half-strength ที่ไม่เติม Mannitol

สำหรับการทดลองชักนำต้นหนอนตายหยากให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อนั้น พบว่า สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ควรมีการทดลองปรับสูตรอาหารโดยเพิ่มปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตให้มากขึ้น หรือเปลี่ยนชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมทั้งการทดลองครั้งนี้ ใช้ตัวอย่างสมุนไพรหนอนตายหยากเพียง 1 ชนิด (species) จึงควรมีการเพิ่มจำนวนชนิดของหนอนตายหยาก และทดสอบความสามารถในการเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อของต้นหนอนตายหยากแต่ละชนิดเปรียบเทียบกัน รวมทั้งความสามารถในการตอบสนองของสมุนไพรหนอนตายหยากแต่ละชนิดต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อได้ต่อไป และเนื่องจากสารสำคัญของพืชชนิดนี้ สะสมอยู่มากในส่วนของราก จึงควรหาสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้หนอนตายหยากทุกชนิดเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ เพื่อเป็นแนวทางเพิ่มวัตถุดิบในการผลิตในอนาคต

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- สามารถนำข้อมูลสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์ให้กับกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รวมทั้งนักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป สามารถนำไปใช้ต่อยอดทางด้านการวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมสมุนไพรหนอนตายหยาก หรือพืชสมุนไพรอื่นในกลุ่มเดียวกันหรือใกล้เคียงกันได้

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ และ อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib). วารสารวิชาการ ม.อบ. 10 (2) : 1-13.

ณัฐวดี สมบัติเทพสุทธิ์. 2551. **ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.) และน้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง (*Azadirachta excels* (Jack) Jacobs.) เพื่อควบคุมผีเสื้อหนอนใยผักในการปลูกผักกวางตุ้งแบบไฮโดรโพนิกส์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขากีฏวิทยา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

พนมกร ขุนอ่อน. 2550. **การใช้น้ำสกัดชีวภาพสมุนไพรหนอนตายหยากควบคุมหนอนแมลงวันบ้าน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม, สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์.

เต็ม สมิตินันทน์. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. หอพรรณไม้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ปี 2544. ที่มา http://web3.dnp.go.th/botany/ThaiPlantName/Default.aspx สืบค้นเมื่อ วันที่ 31 พฤษภาคม 2554.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2552. **ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร**. พิมพ์ครั้งที่ 3. ศิลป์สยายบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 224 น.

สุมนา นีระ, ปรีชา นีระ และ วชิระ เกตุเพชร. 2548. การขยายพันธุ์สมุนไพรหนอนตายหยากโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ใน* การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว (ภาคโปสเตอร์) ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2548, หน้า 289-294.

ศิริกุล เกษา. 2548. การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์จำปีสิรินธร *Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin ในหลอดทดลอง โดยการเก็บรักษาในภาวะชะลอการเจริญและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขาวิชาพฤกษศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. อติสรรค์, กรุงเทพฯ. 133 น.

อรพิน เสละคร. 2557. ผลของ BA และ IBA ต่อการเพิ่มปริมาณหน่อและการออกรากของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ. ราชภัฏเพชรบูรณ์สาร, 16(1): 87-94.

Animesh, B., M. A. Bari, M. Roy and S. K. Bhadra. 2011. *In vitro* Propagation of *Stemona tuberosa* Lour. – A Rare Medicinal Plant through High Frequency Shoot Multiplication using Nodal Explants. Plant Tissue Cult. & Biotech. 21(2): 151-159.

George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology (2nd Edition). Exegetics Ltd., Edington, Wilts., England.

Montri, N., Wawrosch, C. H. and B. Kopp. 2006. **Micropropagation of *Stemona curtisii* Hook f., a Thai medicinal plant**. Acta Horticulturae, 725: 341-345.

Montri, N., Ch. Wawrosch, and B Kopp. 2009. In Vitro Propagation of *Stemona tuberosa* Lour., an Antitussive Medicinal Herb. Acta Horticulturae, 812: 165-172.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Paunescu, A. 2009. **Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview**.
Rom. Biotechnol. Lett. 14(1): 4095-4103.

Rakkimuthu, R., J. Jacob and K. M. Aravinthan. 2011. ***In vitro* micropropagation of *Alpinia zerumbet* Variegate, an important medicinal plant, through rhizome bud explants**. Research in Biotechnology, 2(1): 07-10.

Shibli, R. A., M. A. Shatnawi, W. S. Subaih and M. M. Ajlouni. 2006. ***In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A Review**. World J. Agric. Sci. 2(4): 372-382.

Singlaw, C., A. Kongbangkerd, K. Promthep and P. Saenpote. 2008. **Effect of cytokinins on *In vitro* shoot proliferation of *Stemona tuberose* Lour. NU** Science Journal 5(2): 221-229.

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยอดเฉลี่ยของสมุนไพรหนอนตายหยากจากการทดลองการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ

Sum of Variation	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
ทรีทเม้นต์	11	189.892	17.263	6.26	**
ผลของ NAA	2	24.62	12.308	4.47	*
ผลของ BA	3	139.292	46.431	16.84	**
ผลของ NAAxBA	6	25.983	4.331	1.57	ns
Error	108	297.7	2.756		
Total	119	487.592			

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาเฉลี่ยจากการทดลองการชะลอการเจริญเติบโตเพื่อเก็บรักษาสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ

Sum of Variation	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
ทรีทเม้นต์	5	39.944	7.988	1.64	ns
สูตรอาหาร (F)	1	29.388	29.388	6.03	*
Mannitol (M)	2	3.694	1.847	<1	ns
ผลของ FxM	2	6.861	3.430	<1	ns
Error	66	321.833	4.876		
Total	71	361.777			

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเฉลี่ยจากการทดลองการชะลอการเจริญเติบโตเพื่อเก็บรักษาสมุนไพรหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ

Sum of Variation	df	SS	MS	F-Value	Pr>F
ทรีทเม้นต์	5	28.777	5.755	1.37	ns
สูตรอาหาร (F)	1	8.000	8.000	1.91	ns
Mannitol (M)	2	8.444	4.222		ns
ผลของ FxM	2	12.333	6.166		ns
Error	66	276.333	4.186		
Total	71	305.111			

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ