การอนุรักษ์พืชสกุล *Kaempferia* ด้วยเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro Conservation of *Kaempferia* sp. via Slow Growth Technique.

สุกัลยา ศิริฟองนุกูล[1]
Sirifongnukul, S.[1]

Abstract

A study on an appropriate medium for *in vitro* conservation of 2 species of *Kaempferia* L. (Wan-Kra-Chaea-Chan: *K. marginat*a Carey ex Roscoe and Wan-Thipya-Nate: *K. rotunda* L.) via slow growth technique was carried out. Shoot tips were cultured on 12 treatments with different medium concentrations of MS or half-MS medium supplemented with sucrose 3-9% w/v and mannitol 0-2% w/v. The results showed that Wan-Kra-Chaea-Chan was found to extend the storage period to 10.69 months on MS supplemented sucrose 3%w/v and mannitol 2% w/v while Wan-Thipya-Nate was found to extend the storage period to 9 months on MS containing sucrose 3% w/v. The survival shoots were transferred to recover medium. The plantlets were regenerated under normal growth conditions which its survival rate of the plantlets in the greenhouse was higher than 80%.

Keywords: *Kaempferia* sp., Plant Conservation, *In vitro*, Slow growth

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชสมุนไพรสกุล *Kaempferia* L. 2 ชนิด ได้แก่ ว่านกระแจะจันทร์ (*K. marginata* Carey ex Rosceo) และว่านทิพยเนตร (*K. rotunda* L.) ด้วยเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารทดลองจำนวน 12 สูตร ประกอบด้วยสูตร MS หรือ half-MS ที่เติม sucrose 3% หรือ 9% ร่วมกับ mannitol 0-2% พบว่า ในว่านกระแจะจันทร์ อาหารสูตรที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อได้นานสูงสุดเป็นเวลาเฉลี่ย 10.69 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร ได้แก่ สูตร MS ที่เติม sucrose 3% และ mannitol 2% และในว่านทิพยเนตร สูตรอาหาร MS ที่เติม sucrose 3% สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุดเป็นเวลาเฉลี่ย 9 เดือน เมื่อย้ายพืชสกุล *Kaempferia* ทั้ง 2 ชนิด ที่รอดชีวิตไปเพาะเลี้ยงบนอาหารฟื้นฟูสภาพ พบว่า สามารถฟื้นตัวและเจริญเติบโตต่อไปได้ดี เมื่อนำออกปลูกในโรงเรือนมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 80

คำสำคัญ: พืชสกุล *Kaempferia* การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช การชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

คำนำ

พืชสกุล *Kaempferia* sp. เป็นพืชในวงศ์ ZINGIBERACEAE หรือพืชวงศ์ขิง ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยสะสมอยู่มากในส่วนของหัวหรือเหง้าและเป็นส่วนขยายพันธุ์หลัก มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจทั้งด้านการนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ และพืชสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในยารักษาโรคที่สำคัญหลายขนาน ปัจจุบันมีกระแสตื่นตัวเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรกันมากขึ้น เช่น การใช้รักษาโรค การใช้เพื่อความงาม สุวคนธบำบัด และอาหารเพื่อสุขภาพ (คมสัน, 2549; วุฒิ, 2552) รวมทั้งนำมาใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโรคพืชในการทำเกษตรกรรม (ต. ชาตรี, 2553) เมื่อมีการนำไปใช้ประโยชน์มากขึ้น ทำให้พืชเหล่านี้อยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จึงควรเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ไว้เพื่อไม่ให้สูญพันธุ์ไป การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในหลอดทดลองด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยลดขนาดพื้นที่การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมได้มากขึ้น การทดลองนี้เลือกใช้เทคนิคการเก็บรักษาในระยะปานกลาง (Medium term storage) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการชะลอหรือการลดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในหลอดทดลองให้เจริญช้าลง (Slow growth, Minimal growth) (Shibli และคณะ, 2006) ซึ่งจะช่วยลดปริมาณงานหรือจำนวนครั้งของการเปลี่ยนถ่ายอาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงได้ มีรายงานการศึกษาเพื่อเก็บรักษาขิง (*Zingiber officinale* Rosc. Cv. Rio de Janeiro) ในหลอดทดลอง พบว่า โดยร้อยละ 50 ของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ถึง 14 เดือนบนอาหาร CM (MS+9% sucrose+0.8% agar+0.1 mgl-1 NAA+1 mgl-1 BA) ภายใต้แสงสว่าง 16 และ

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน) 50 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[1] Biotechnology Research and Development Office, 50 Phaholyothin Rd., Ladyao, Chatuchack, Bangkok, 10900

24 ช.ม./วัน และสามารถเก็บรักษาได้อย่างน้อย 12 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร (Tyagi *et al.*, 2006) ในส่วน *Glycyrrhiza glaba* ก็มีรายงานการเปรียบเทียบการใช้ osmotic agents 3 ชนิด ได้แก่ sucrose sorbitol และ mannitol เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า mannitol 2% ให้ผลดีที่สุด โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารได้นาน 12 เดือน (Srivastava และคณะ, 2013) การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชสกุล *Kaempferia* โดยการชะลอการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

(1) การเตรียมและเพิ่มจำนวนต้นในสภาพปลอดเชื้อสำหรับการทดลอง

เก็บเหง้าพืชสกุล *Kaempferia* spp. 2 ชนิด คือ กระแจะจันทร์ และว่านทิพยเนตร ซึ่งมียอดอ่อนยาว 2-3 ซม. ล้างผ่านน้ำไหล ลอกกาบใบหรือใบชั้นนอกออก ล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาด จุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70% 10 วินาที นำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 10% ที่เติม tween20 2-3 หยด เขย่า 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA 2 มก./ล. ให้แสง เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เพิ่มปริมาณยอดโดยการตัดส่วนของยอดที่เกิดใหม่ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุกๆ 4 สัปดาห์

(2) การเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงในหลอดทดลองระยะปานกลางในสภาพชะลอการเจริญเติบโต

ตัดยอดติดเหง้าให้มีความยาวประมาณ 1.5-2 ซม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS full-strength (full-MS) และ MS half-strength (half-MS) ที่เติม sucrose 3% หรือ 9% ร่วมกับการเติม mannitol 0% 1% หรือ 2% (Table 1) โดยทุกสูตรจะเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)มีทั้งสิ้น 12 ทรีทเมนต์ๆละ 12 ซ้ำๆละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงโดยไม่เปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งยอดและมีจำนวนเกินกว่า 50% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในทรีทเมนต์นั้นๆ บันทึกระยะเวลา (เดือน) อัตราการรอดชีวิต จำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่ อัตราการเกิดราก

(3) นำยอดที่รอดชีวิตมาฟื้นฟูภายหลังการเก็บรักษาบนอาหารสังเคราะห์สูตร full-MS ที่เติม BA 2 มก./ล. หรือ TDZ 1 มก./ล. หรือ kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 05 ม.ก./ล. (Table 2) บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นและให้คะแนนการเกิดราก

(4) นำพืชที่ผ่านการฟื้นฟูสภาพมาปรับสภาพ ก่อนนำออกปลูกในโรงเรือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่อายุ 60 วัน

ผลการทดลอง

เมื่อเพาะเลี้ยงว่านกระแจะจันทร์ (*Kaempferia marginata* Carey ex Roscoe) และว่านทิพยเนตร (*Kaempferia rotunda* L.) บนอาหารทดลองสูตรชะลอการเจริญเติบโตทั้ง 12 ทรีทเมนท์ (Table 1) พบว่า สูตรที่สามารถชะลอการเจริญเติบโตในว่านกระแจะจันทร์ได้ดีที่สุด คือ สูตร Z2 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เป็นเวลาเฉลี่ย 10.69 เดือน ส่วนสูตรที่สามารถชะลอการเจริญเติบโตในว่านทิพยเนตรได้ดีที่สุดคืออาหารสูตร Z1 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เป็นเวลาเฉลี่ย 9.00 เดือน

ภายหลังได้นำยอดที่รอดชีวิตเกินร้อยละ 50 ย้ายมาเพาะเลี้ยงเพื่อฟื้นฟูสภาพบนอาหารทดลอง 6 ทรีทเมนท์ (Table 2) เป็นเวลา 60 วัน พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 90 บนอาหารสูตร T2 และ T4 โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.7 และ 4.3 ยอดตามลำดับ ในทุกทรีทเมนท์สามารถเกิดรากได้ แต่บนอาหารสูตร T3 และอาหารสูตร T6 นั้น เกิดรากได้น้อยกว่าอาหารสูตรอื่น (Table 3) เมื่อทดลองปรับสภาพแล้วย้ายออกปลูกในถุงดำที่ใส่วัสดุปลูกในโรงเรือน พบว่า ว่านกระแจะจันทร์สามารถรอดชีวิตได้คิดเป็น 83.33% และว่านทิพยเนตรสามารถรอดชีวิตได้ 88.89%

วิจารณ์ผล

การชะลอการเจริญเติบโตพืชในสภาพปลอดเชื้อเป็นการควบคุมอย่างเฉพาะเจาะจงโดยใช้ผลจากการเพิ่มแรงดันออสโมซิสในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยการเติมสารต่างๆ เช่น sugar alcohols (เช่น mannitol, sorbitol) หรือ sucrose อย่างไรก็ดี ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันนั้น มีผลต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด (Goncalves และ Romano, 2007) จากการเพาะเลี้ยงว่านกระแจะจันทร์ และว่านทิพยเนตร ในอาหารทดลองเพื่อชะลอการเจริญเติบโตทั้ง 12 ทรีทเมนต์ พบว่า ปัจจัยที่ส่งผลอย่างเห็นได้ชัดคือระดับของ sucrose โดยระดับ sucrose 3% ให้ผลในการชะลอการเจริญเติบโตได้ดีกว่าที่ระดับ sucrose 9% (Figure 1) ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นของ sucrose เพื่อการลดการเจริญเติบโตของ ขิง ไพล และขมิ้นอ้อยในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งอยู่ในช่วง 40-60 ก./ล. (4%-6%) (สนธิชัย, 2548) แต่ต่างจากการทดลองของ Tyagi และคณะ (2006) ซึ่งรายงานว่า

Zingiber officinale Rosc. Cv. Rio de Janeiro สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ถึง 12-14 เดือนบนอาหาร CM ซึ่งมี sucrose สูงถึง 9% โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร ระดับความเข้มข้นของ sucrose และ mannitol ที่สูงขึ้น นอกจากจะส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลงแล้ว ยังส่งผลให้พืชสกุล *Kaempferia* แสดงจำนวนยอดที่มีแนวโน้มลดลงด้วย (Figure 2) เนื่องจากการใช้ mannitol ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ร่วมกับ sucrose ที่ระดับความเข้มข้นสูงก็จะยิ่งส่งผลให้การแพร่ของน้ำเข้าสู่เซลล์พืชเป็นไปได้ยากทำให้ประสิทธิภาพของการเกิดออสโมซิสในเซลล์ลดลง พืชจึงอยู่ในภาวะขาดน้ำ ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะเสื่อมถอย กลายเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาล และตายในที่สุด (Guicherd และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตาม ชนิดของพืชก็มีส่วนในการตอบสนองต่อระดับแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกันด้วย

สรุปผล

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตในว่านกระแจะจันทร์ คือสูตร full-MS+sucrose 3%+mannitol 1%
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตในว่านทิพยเนตร คือ สูตร full-MS +sucrose 3%
3. ว่านกระแจะจันทร์ และว่านทิพยเนตร ฟื้นตัวและเจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรฟื้นฟูสภาพทุกสูตร สามารถเกิดยอดและรากใหม่ได้ดีบนอาหารสูตร full-MS ที่เติม BA 2 มก./ล. หรือ Kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. หรือไม่เติม NAA ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม สูตรที่ เติม TDZ 1 มก./ล. เกิดรากได้น้อยกว่าสูตรอื่น
4. เมื่อนำว่านกระแจะจันทร์ และว่านทิพยเนตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วปลูกในโรงเรือนสามารถรอดชีวิต และเจริญเติบโตต่อไปได้เป็นปกติ

เอกสารอ้างอิง

คมสัน หุตะแพทย์, 2549, การสกัดน้ำมันหอมระเหย, ออฟเซ็ทครีเอชั่น, กรุงเทพฯ, 108 น.

ต. ชาตรี, 2553, สมุนไพรเพื่อการเกษตร, พิมพ์ครั้งที่ 5, นีออนบุ๊ค มีเดีย, กรุงเทพฯ, 110 น.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2552, ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร, พิมพ์ครั้งที่ 3, ศิลป์สยามบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 223 น.

สนธิชัย จันทร์เปรม, 2548, การเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงบางชนิดโดยการลดการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ, *ใน* รายงานการประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว, วันที่ 20-22 ตุลาคม 2548, ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ คลองไผ่, นครราชสีมา, หน้า 384-389.

Gocalves, S. and Romano, A., 2007, *In Vitro* Minimum Growth for Conservation of *Drosophyllum lusitanicum*, Biologia Plantarum, 51: 795-798.

Guicherd, P., Peltier, J.P., Gout E. and Bligny R., 1997, Osmotic Adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: Malate and Mannitol Accumulation in Leaves Under Drought Condition, Trees, 11: 155-161.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Shibli, R.A., Shatnawi M.A., Subaih W.S. and Ajlouni M.M., 2006, *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources: A Review, World Journal of Agricultural Sciences, 2(4): 372-382.

Srivastava, M., Purshottam, D.K., Srivastava, A.K. and Misra, P., 2013, *In Vitro* Conservation of *Glycyrrhiza glabra* by Slow Growth Culture, International Journal of Bio Technology and Research, 3:49-58.

Tyagi, R.K., Agrawal, A. and Yusuf, A.., 2006, Conservation of Zingiber Germplasm Through *In Vitro* Rhizome Formation, Scientia Horticulturae, 108: 210-219.

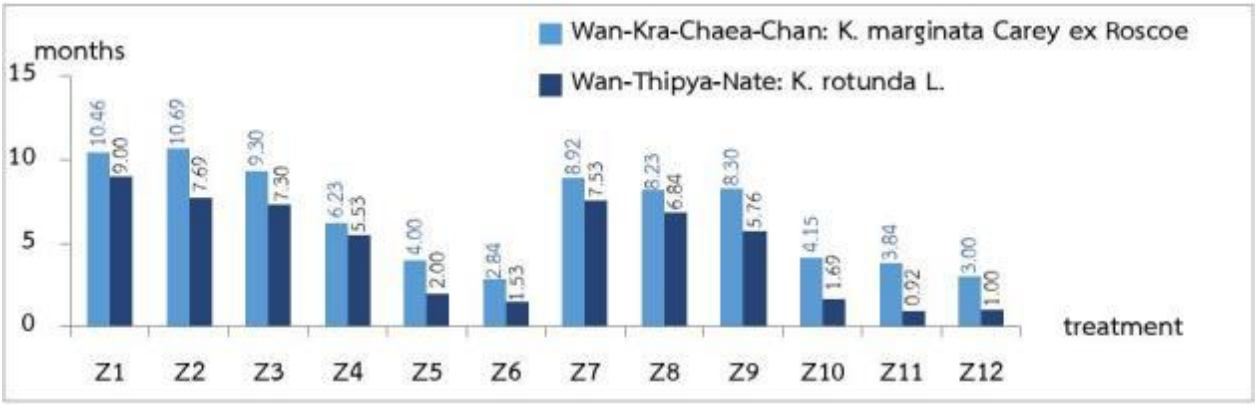

Figure 1 Average storage period of 2 species of *Kaempferia* on slow growth medium.

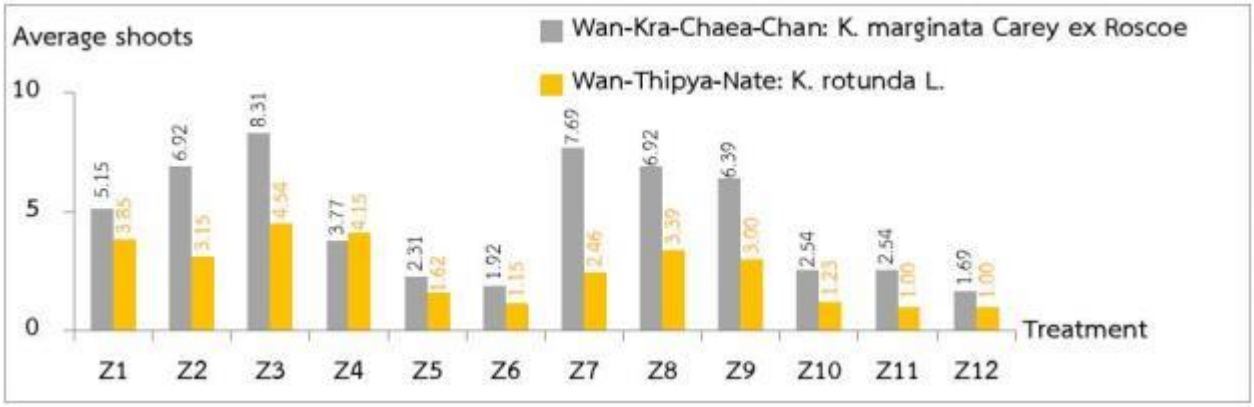

Figure 2 Average shoots of 2 species of *Kaempferia* on slow growth medium.

Table 1 Experimental treatment medium to slow down the growth.

	MS full-strength		MS half-strength	
	Sucrose 3%	Sucrose 9%	Sucrose 3%	Sucrose 9%
mannitol 0%	Z1	Z4	Z7	Z10
mannitol 1%	Z2	Z5	Z8	Z11
mannitol 2%	Z3	Z6	Z9	Z12

Table 2 Experimental treatment medium to recover the growth.

	Full-MS	
	NAA 0 mg/l	NAA 0.5 mg/l
Kinetin 2 mg/l	T1	T4
BA 2 mg/l	T2	T5
TDZ 1 mg/l	T3	T6

Table 3 Survival percentage, average number of shoot and root score after transfer to recover medium for 60 days

Kaempferia	% survival						Average number of shoots						Average score of roots					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Wan-Kra-Chaea-Chan	60	80	80	80	80	60	2.7	4.2	4.7	4.5	5.3	3.1	1.2	2.1	2.1	1.8	2.3	1.2
Wan-Thipya-Nate	70	100	80	100	70	100	2.4	3.2	3.1	4.0	2.7	4.1	1.7	2.0	1.1	2.0	2.2	1.4
Average	65	90	80	90	75	80	2.6	3.7	3.9	4.3	4.0	3.6	1.5	2.1	1.6	1.9	2.3	1.3