

การเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงบางชนิดโดยการลดการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

สนธิชัย จันทน์เปรม

ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Germplasm preservation of certain Zingiberaceae using *in vitro* minimal growth.

Sontichai Chanprame

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture Kamphaengsean, Kasetsart University

บทคัดย่อ

ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์ขิง 3 ชนิดคือ ขิง ไพล และขมิ้นอ้อย ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. เพื่อเพิ่มจำนวนหน่อ จากนั้นได้ตัดย้ายหน่อลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ ½ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. และ sucrose และ/หรือ mannitol ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อลดการเจริญเติบโตของพืช พบว่า การใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ sucrose 40-60 ก./ล. หรือ sucrose 30 ก./ล. ร่วมกับ mannitol 30 ก./ล. หรือ อาหารสูตร ½ MS ร่วมกับ sucrose 40-50 ก./ล. หรือ sucrose 30 ก./ล. ร่วมกับ mannitol 30-40 ก./ล. สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเดิมได้นานอย่างน้อย 8 เดือน

Abstract

Three kinds of Zingiberaceae, ginger (*Zingiber officinale* Rose.) Pli (*Zingiber cassumunar* Roxb.) and ka-min-ao (*Curcuma zedoaria* Rose.) were cultured on MS basal medium supplemented with 5 mg/l BA for multiplication. Then the individual shoot was transferred onto MS or ½ MS salts plus 1 mg/l BA with various concentration of sucrose and/or mannitol for minimal growth induction of the plants. It was found that MS supplemented with 40-60 g/l sucrose or 30 g/l sucrose + 30 g/l mannitol or ½ MS supplemented with 40-50 g/l sucrose or 30 g/l sucrose + 30-40 g/l mannitol could decrease growth of the plants. Those plants could be maintained in those media for at least 8 months without subculturing.

บทนำ

ประเทศในเขตร้อน เช่นประเทศไทย เป็นแหล่งพันธุกรรมของพืชที่สำคัญที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพธรรมชาตินั้น นับวันจะต้องพบกับความเสี่ยงมากยิ่งขึ้น จากการทำลายสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะมนุษย์ โดยที่มีพืชหลายชนิด เช่น อ้อย มันสำปะหลัง และพืชวงศ์ขิง มีการขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของลำต้น พืชเหล่านี้จึงต้องเก็บรักษาในแปลงปลูก ซึ่งต้องเสี่ยงต่อการสูญเสียเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นการหาแนวทางที่สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเหล่านี้ให้ปลอดภัยจากการสูญเสียทั้งจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและฝีมือมนุษย์ จึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับการเพิ่มความสามารถในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช

ปัจจัยที่นำมาใช้ในการลดการเจริญเติบโตของพืชในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่หลายปัจจัย เช่น การนำเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ไปไว้ในอุณหภูมิต่ำ (Bertrand-Desbrunais *et al.*, 1992; Lersrutaiyotin *et al.*, 1993) การลดปริมาณสารอาหารที่เพาะเลี้ยง (Lersrutaiyotin *et al.*, 1993) และการใส่สารลดการเจริญเติบโต (Lersrutaiyotin and Burikam, 1993; Chanprame *et al.*, 1992) โดยสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการลดการเจริญเติบโต ได้แก่ mannitol ที่มีผลต่อ osmotic pressure ของพืช (Mix, 1982) paclobutrazo เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Stang and Weis, 1984) และสาร mepiquat chloride (Pool, 1982) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับลดการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ขิงบางชนิด เพื่อเป็นแนวทางสำหรับเก็บรักษาพันธุกรรมของพืชวงศ์ขิงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว:

1. ล้างแง่งขิง หรือลำต้นใต้ดินของพืชวงศ์ขิงอื่น ๆ ให้สะอาดโดยผ่านน้ำไหลแล้วผึ่งให้แห้ง
2. ตัดตาโดยผ่านน้ำไหล ลอกกาบตาออกโดยผ่านน้ำไหล นำตาใส่ขวดน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ น้ำยาล้างจาน 2-3 หยด เขย่า 1 นาที จากนั้นปล่อยผ่านน้ำไหล 10 นาที
3. นำมาแช่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที
4. นำมาฟอกด้วยคลอโรกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที
5. นำมาฟอกด้วยคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที
6. จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง
7. นำมาวางในจานแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ลอกกาบตาชั้นนอกออก ตัดส่วนที่ชำและดำที่ถูกทำลายโดยคลอโรกซ์ในขณะฟอกฆ่าเชื้อ นำเนื้อเยื่อที่ได้มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารสูตร MS + BA 5 มก./ล. และ sucrose 30 ก./ล.

การเพาะเลี้ยงในอาหารที่สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้

ตัดย้ายต้นขิง ไพล และขมิ้นอ้อย ลงเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรพื้นฐาน MS + BA 1 มก./ล. ที่ใส่ sucrose หรือ mannitol หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน โดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

- MS + sucrose 30-60 ก./ล.
- MS + sucrose 30 ก./ล.+ mannitol 10-40 ก./ล.
- ½ MS + sucrose 30-60 ก./ล.
- ½ MS + sucrose 30 ก./ล.+ mannitol 10-40 ก./ล.

เพาะเลี้ยงพืชทั้ง 3 ชนิด ในอาหารแต่ละสูตร จำนวน 10 ขวดต่อสูตร ตรวจสอบการเจริญเติบโต และการมีชีวิตรอดทุกเดือนนาน 8 เดือน

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงในอาหารที่สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้

หลังจากตัดย้ายต้นขิง ไพล และขมิ้นอ้อย ลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชะลอการเจริญเติบโตสูตรต่าง ๆ แล้วเพาะเลี้ยงไว้ในสภาพปกติ 8 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลยสามารถพบว่าพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม และเมื่อสิ้นสุดเดือนที่ 2 พืชในสูตรควบคุมเริ่มมีอาการขอบใบและปลายใบแห้ง รากมีการเจริญเติบโตเต็มขวด ส่วนในสูตรที่ทำให้มีการชะลอการเจริญเติบโตยังคงเจริญเติบโตเป็นปกติ ใบยังคงมีสีเขียว รากมีการเจริญเติบโตเต็มขวดเช่นกัน และเมื่อสิ้นสุดเดือนที่ 4 พืชในสูตรควบคุมมีการเจริญเติบโตอย่างมาก ต้นมีขนาดใหญ่คับขวดที่เพาะเลี้ยง ใบยาวม้วนขดอยู่ภายในขวด มีใบที่แห้งทั้งใบหรือขอบใบแห้งจำนวนมาก มีบางต้นตายไป อาหารเพาะเลี้ยงแห้งไปเกือบหมด ส่วนในสูตรชะลอการเจริญเติบโตเริ่มมีอาการขอบใบแห้ง ต้นมีขนาดเล็กกว่าสูตรควบคุมอย่างเห็นได้ชัด มีบางต้นตายเช่นเดียวกัน แต่ยังมีต้นที่รอดชีวิตอยู่

ประมาณ 80-90% รากมีจำนวนมากขึ้น มีการแตกหน่อใหม่บ้างเล็กน้อย และเมื่อสิ้นสุดเดือนที่ 8 พืชทั้ง 3 ชนิดในสูตรควบคุมมีขนาดใหญ่ ใบบาง ใบและกาบใบส่วนใหญ่แห้งตาย และรากเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง มีต้นที่รอดชีวิต 10-40% ขณะที่พืชที่เพาะเลี้ยงในสูตรชะลอการเจริญเติบโตยังคงมีสีเขียวถึงเขียวอ่อน และยังมีรากเจริญเติบโตอยู่แต่ต้นมีขนาดเล็ก รากยังคงเป็นสีขาวหรือเขียว มีสีน้ำตาลบ้างเล็กน้อย โดยมีต้นที่รอดชีวิตประมาณ 80-90% ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชะลอการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ขิงทั้ง 3 ชนิด ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

จากตารางที่ 1 พบว่า ความเข้มข้นของ sucrose ที่เหมาะสมส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 40-60 ก./ล. และเมื่อเติม sucrose 30 ก./ล. ร่วมกับ mannitol ความเข้มข้นของ mannitol ที่เหมาะสมจะเป็น 30 ก./ล. และถ้าลดความเข้มข้นของสารอาหารอนินทรีย์ลงครึ่งหนึ่ง ความเข้มข้นของ sucrose ที่เหมาะสมจะลดลงเหลือ 40-50 ก./ล. ในขณะที่ mannitol เป็น 30-40 ก./ล. โดยพืชที่ทดลองเมื่อมีอายุครบ 8 เดือน ยังมีสีเขียวสด มีการเจริญเติบโตทางลำต้นและรากเป็นปกติ แต่รากจะมีสีน้ำตาลแดงและเจริญออกมานอกอาหารเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 1: ความเข้มข้นของ mannitol และ sucrose (ก./ล.) ที่เหมาะสมต่อการชะลอการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ขิง 3 ชนิดตัวอย่าง ในสภาพปลอดเชื้อนาน 8 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ก./ล.)		
	ขิง	ไพล	ขมิ้นอ้อย
MS+sucrose (30-60 ก./ล.)	60	40	60
MS+sucrose 30 ก./ล.+ mannitol (10-40 ก./ล.)	30	30	30
½ MS+ sucrose (30-60 ก./ล.)	40	50	50
½ MS+ sucrose 30 ก./ล.+ mannitol (10-40 ก./ล.)	40	30	40



รูปที่ 1: การลดการเจริญเติบโตของขิงโดยใช้อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม sucrose ความเข้มข้นต่าง ๆ
ก. อายุ 2 เดือน ข. อายุ 8 เดือน



รูปที่ 2: การลดการเจริญเติบโตของไฟลโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม sucrose 30 ก./ล.ร่วมกับ mannitol 10-40 ก./ล
ก. อายุ 1 เดือน ข. อายุ 8 เดือน



รูปที่ 3: การลดการเจริญเติบโตของขมิ้นน้อยโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม sucrose 30 ก./ล.ร่วมกับ mannitol 10-40 ก./ล ก. อายุ 1 เดือน ข. อายุ 8 เดือน

สรุปผลการศึกษา

การลดการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ขิง 3 ชนิด ตัวอย่าง คือ ขิง ไพล และขมิ้นน้อย พบว่า การใช้ อาหารสูตร MS ร่วมกับ sucrose 40-60 ก./ล. หรือ sucrose 30 ก./ล. ร่วมกับ mannitol 30 ก./ล. หรือ อาหารสูตร 1/2 MS ร่วมกับ sucrose 40-50 ก./ล. หรือ sucrose 30 ก./ล. ร่วมกับ mannitol 30-40 ก./ล. สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ โดย เพาะเลี้ยงในอาหารเดิมได้นานอย่างน้อย 8 เดือน

เอกสารอ้างอิง

Bertrand-Desbrunais, A., Noirot, M. and Charrier, A. 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 2: Influence of reduced concentration of sucrose and low temperature. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31: 105-110

Chanprame, S., Lersrutaiyotin, R. and Weerasathakul, C. 1993. Effect of cryoprotectant on cryopreservation of sugarcane plantlets. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 27: 1-3.

Lersrutaiyotin, R., Chit-areerat, P. and Vissessuwan, R. 1993. *In vitro* preservation of sugarcane plantlets under low temperature. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 27: 9-11.

_____, Roongruengchanchai, N., Chindonnirat, J., Burikam, S. and Wongmaniro, M. 1993. Growth of sugarcane plantlets on media limiting concentration of inorganic nutrient and growth promoter supplement. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 27: 4-8.

_____, and Burikam, S. 1993. Growth reduction of papaya plantlets for *in vitro*

- preservation. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 27: 12-14.
- Mix, G. 1982. *In vitro* preservation of potato material. Plant Gent. Res. Newst. 51: 6-8.
- Orlikowska, T. 1992. Effect of *in vitro* storage at 4 °C on survival and proliferation of two apple rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31: 1-7.
- Pool, R.M. 1982. Effect of mepiquat chloride on the growth and yield of concord grapevines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 376-380.
- Stang, E.J. and Weis, G.G.. 1984. Influence of paclobutrazol plant growth regulator on strawberry plant growth, fruiting and runner suppression. Hort. Sci. 19: 643-645.