

จากการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นหนอนตายหยาก และการเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดต้นหนอนตายหยากเพื่อการเก็บรักษาสภาพแบบเยือกแข็ง โดยวิธีการเตรียมชิ้นส่วนประกอบด้วย 1) preculture 2) encapsulation 3) vitrification 4) dehydration และการผสมผสานกันทั้ง 4 วิธีการ พบว่า

การแช่ชิ้นส่วนข้อและปลายยอดในน้ำปูนใส 2 ก./ล 30 นาที ต่างทับทม 10 มก./ล 30 นาที ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นาน 5 นาที เอทานอล 70 % 1 นาที คลอโรกซ์ 20 % 10 นาที และ คลอโรกซ์ 10 % นาน 5 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด 30 ± 2.94 % ต่อจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1 มก./ล สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus สูงสุด ให้ขนาดแคลลัสเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.60 ± 0.48 ซม. โดยชิ้นส่วนตำแหน่งข้อที่ 1 (ปลายยอด) และตำแหน่งข้อที่ 2 สามารถเกิดยอดใหม่ได้สูงสุด มีจำนวนยอดใหม่ 3.62 ± 0.52 และ 3.37 ± 0.19 ยอด สำหรับการเติม NAA ความเข้มข้น 5 มก./ล ลงในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้ปลายยอดต้นหนอนตายหยากเกิดรากสูงสุด 62 ± 2.30 % สำหรับการไม่เติมออกซินจะทำให้รากมีแนวโน้มยาวมากที่สุดคิดเป็น 6.54 ± 0.54 ซม. ซึ่งการเพาะเลี้ยงในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 5 °ซ. และอาหารสูตร 1/2 MS มีแนวโน้มในการชะลอการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนต้นหนอนตายหยากได้

การเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดต้นหนอนตายหยาก โดยการ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ ร่วมกับ glycerol 2 โมลาร์ เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน อุณหภูมิ 0 °ซ. นำชิ้นส่วนปลายยอดไป encapsulate แล้วนำมา loading ลงใน glycerol 2 โมลาร์ ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ นาน 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไป dehydrate ด้วย laminar air flow cabinet นาน 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 °ซ แล้วแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที แช่นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำปลายยอดมา thaw ใน water bath อุณหภูมิ 40 °ซ. และเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 5 มก./ล สามารถทำให้ bead มีชีวิตรอดสูงสุด 70 ± 0.81 % และจากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้นหลังการเก็บรักษาโดยเทคนิค RAPD ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม และวิธีการเก็บรักษานี้ประหยัดต้นทุนกว่าการเก็บรักษาไว้ในสภาพปลอดเชื้อหรือเก็บรักษาโดยการปลูกบนแปลงปลูก

In vitro shoot multiplication of *Stemona tuberosa* Lour. and developing of the preparation methods of *Stemona* shoot tips for cryopreservation by using 1) preculture, 2) encapsulation, 3) loading, 4) dehydration and combination methods were studied. The results showed that the optimum conditions for nodal segment and shoot tip sterilization could be obtained when using 2 g/l Ca(OH)_2 solution for 30 minute then dipped in 10 mg/l KMnO_4 solution H_2O_2 for 30 minute followed by 5 minute in H_2O_2 , 1 minute in 70% Ethanol, 10 minute in 20% v/v Clorox solution and 5 minute in 10% Clorox solution, respectively. The optimum conditions for embryogenic callus induction and largest diameter of embryogenic callus (4.60 ± 0.48 cm) could obtain when the shoot tip were cultured on MS medium with 1.0 mg/l TDZ. Primary and Secondary nodal segments could induce highest shoot regeneration (3.62 ± 0.52 and 3.37 ± 0.19 shoots). The highest percentage of root induction (62 ± 2.30 %) was obtained when excised shoots were cultured on the medium with 5.0 mg/l NAA. However, The longest root induction (6.54 ± 0.54 cm) was induced on the medium with no hormone. The medium term storage of *Stemona* shoot tips was also investigated. The results found that the shoot tips cultured on half-strength MS medium and incubated under dark condition at 5 °C seemed to retard shoot growth.

For cryopreservation methods, *Stemona* shoot tips were precultured on MS medium supplemented with 0.4 M sucrose and 2 M glycerol at 0 °C for two days, shoot tips were then encapsulated and loading in mixture solution of 2 M glycerol with 0.4 M sucrose for two hours. After that they were dehydrated in laminar flow for four hours at 25 °C, then rapidly dipped in liquid nitrogen for an hour. The specimens were then rapidly thawed in water bath at 40 °C and transferred to culture on MS medium supplemented with 5 mg/l BA for 30 days. The results showed that the highest survival rate was $70 \pm 0.81\%$. Shoot derived from 3 different sources; natural growing, *in vitro* culture and cryopreserved shoots were tested for genetic variation using RAPD technique. The results revealed that no genetic variation was detected when using RAPD method. The summary results indicated that cryoperservation technique performed a reasonable method for cost saving and labor intensive than *in vitro* storage and growing in planting area.