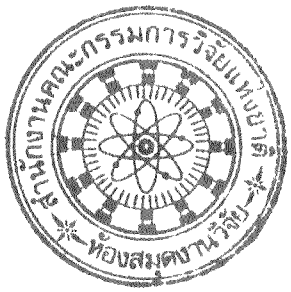

บทที่ 7
การเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ป่าด้วยวิธี Slow growth technique ภายใต้สภาพหลอดทดลอง

โดย นิรมล รังสยาธร[1]
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา จังหวัดพะเยา[1]

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงโดยเฉพาะกล้วยไม้ แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยประสบปัญหาเรื่องการลดลงของความหลากหลายทางชีวภาพ อันเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ กล้วยไม้ก็เป็นหนึ่งในทรัพยากรธรรมชาติที่มีประสบปัญหา จากการเริ่มทำโครงการการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา นั้นคณะผู้วิจัยได้รวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ป่าหลายชนิดจากทั้งในพื้นที่มหาวิทยานเรศวร พะเยา และจากพื้นที่อื่นเพื่อเก็บเป็นคลังพันธุกรรมกล้วยไม้ การขยายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นการเพาะเมล็ดจากฝักกล้วยไม้ที่หาได้เนื่องจากจะทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าการทำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากต้นเดียวมาเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น แต่ปัญหาจากการนำเมล็ดมาเพาะขยายพันธุ์นั้นจะทำให้เกิดต้นอ่อนจำนวนมากเมื่อต้นอ่อนเจริญเติบโตต้องนำออกจากขวดและเก็บรักษาเป็น living collection ซึ่งต้องอาศัยพื้นที่ในการดูแลรักษา รวมทั้งแรงงาน งบประมาณเป็นจำนวนมาก คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะหาวิธีเก็บรักษา living collection โดยใช้พื้นที่และการดูแลรักษาน้อยที่สุดแต่สามารถรักษาความหลากหลายทางชีวภาพไว้ให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีที่คณะผู้วิจัยสนใจคือการชลอการเจริญ living collection เหล่านี้ไว้ในขวดภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เพื่อลดระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารและการนำออกจากขวดเพื่อลดปัญหาการดูแลรักษาในโรงเรือน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาหาวิธีอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อได้ในระยะยาว ด้วยวิธี slow growth techniques และ artificial seeds

การทบทวนวรรณกรรมและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชไม่ได้หมายความว่าเป็นการเก็บรักษาเพียงอย่างเดียว แต่หมายถึงการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนรวมถึงการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณและนำกลับคืนสู่ถิ่นกำเนิดในธรรมชาติอีกด้วย การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสามารถทำได้หลายรูปแบบ ส่วนใหญ่ที่เรารู้จักกันดีคือการเก็บรักษา

เมล็ดพืชในธนาคารเมล็ดพันธุ์(seed bank) หากเป็นพืชที่ไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดเป็นประเภท recalcitrant seeds ก็มักจะทำการอนุรักษ์โดยการปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ (field gene-bank) ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้พื้นที่และแรงงานคนมากมีค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการติดโรค (Divakaran 2006) เมื่อเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับการพัฒนาขึ้น ก็ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีนี้มาใช้ในการอนุรักษ์ด้วย โดยการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชภายใต้ขวดในสภาพปลอดเชื้อ (in vitro storage) ซึ่งข้อดีในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในรูปแบบนี้ได้แก่

1. สามารถเก็บได้ในพื้นที่จำกัด เช่น ใน vials, ขวดแก้ว, Petri-dishes บนหิ้งเพาะเลี้ยงในตู้ incubator

2. พืชที่เก็บในสภาพนี้จะปลอดเชื้อทำให้สะดวกในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมพืช ระหว่างประเทศ (Thammasiri, 2000)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชนั้นทำได้หลายวิธีโดยชิ้นส่วนพืชที่นำมาเก็บรักษาควรใช้เป็นชิ้นส่วนที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ ชิ้นส่วนที่นิยมใช้ได้แก่ ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) ปลายยอด (shoot tip) คัพภะ (embryos) เป็นต้น ไม่ควรใช้ callus เพื่อป้องกันการแปรผันของพันธุกรรม ที่สำคัญเทคนิคที่ใช้ในการเก็บรักษานั้นไม่ควรทำให้เกิดความเสียหายต่อชิ้นส่วนพืช หรือทำให้เกิดความเสียหายน้อยที่สุด slow growth techniques เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช เนื่องจากใช้งบประมาณน้อย การทำ slow growth เป็นการบังคับพืชที่จะอนุรักษ์ให้โตอย่างช้าๆ ทั้งนี้ เพื่อประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องในการถ่ายเนื้อเยื่อไปขวดใหม่ (subculture) วิธีการลดอัตราการเจริญของพืชในสภาพหลอดทดลองทำได้ 2 วิธี คือ การปรับสูตรอาหารที่เลี้ยง หรือการปรับสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น (สุญาณี ,2550; Nikishina et al, 2007; Seaton and Hailes, 1989; Sarkar 2001) ในการปรับสูตรอาหารเพื่อชลอการเจริญเติบโตของพืชที่เพาะเลี้ยวในขวดภายใต้สภาพปลอดเชื้อนั้นอาจทำได้โดยการลดแหล่งของพลังงานในอาหาร ซึ่งได้แก่น้ำตาล หรือลดสารอาหารอื่น ๆ ในอาหารเพื่อลดการเจริญของเนื้อเยื่อ รวมทั้งฮอร์โมนทั้งนี้ต้องไม่ลดมากเกินไปจนทำให้พืชเจริญเติบโตผิดปกติ ในพืชบางชนิดการใส่สารกลุ่มยับยั้งการเจริญของพืชเช่น ABA (abscisic acid) เพื่อชะลอการเจริญได้ ตัวอย่างเช่นการเลี้ยงมันฝรั่งในอาหารที่มี N-dimethyl-amino succinamid acid ที่ 10 °C สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนมันฝรั่งได้ประมาณ 1 ปี (สุญาณี ,2550)

เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb. f) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่มีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่เอเชีย อินเดีย ตลอดจนถึงคาบสมุทรแปซิฟิค และพบมากในมหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยาจากการสำรวจในปี 2550 มีลักษณะดอกสีขาวใหญ่ จึงทำให้เป็นที่ต้องการของนักเลี้ยงกล้วยไม้และมีชื่ออยู่ในบัญชีของ International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora หรือ (CITES) ซึ่งมักพบมีการ

ลักลอบนำกล้วยไม้ชนิดนี้ของไปขายอยู่เป็นประจำ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการอนุรักษ์พันธุกรรมเอื้องเงินในสภาพปลอดเชื้อด้วยวิธีชลอการเจริญด้วยผงกวาวเครือดำ (*Mucuna collettii,* Lace)

วิธีการศึกษาวิจัย

ทำการผสมเอื้องเงินจนติดฝักเมื่อฝักมีอายุได้ 5 เดือนจึงนำมาเมล็ดในฝักมาเพาะในอาหาร Vacin and Went (VW) ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิตรต่อลิตร ปรับ pH ที่ 5.5 แล้วนำไปเทใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 20 นาที นำเมล็ดเอื้องเงินมาเพาะในอาหารเตรียมไว้แล้วนำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ให้แสงที่ความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน นำเมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์มที่มีอายุ 3 เดือนมาทำการทดลองชลอการเจริญ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมผงของกวาวเครือดำ (*Mucuna collettii*) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 5, 10, 15, 20 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมผงกวาวเครือดำโดยนำรากกวาวเครือดำมาตากให้แห้งหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 ° C หลังจากนั้นนำไปบดให้ละเอียดจนเป็นผง แล้วนำมาผสมในอาหารสูตร VW

ทำการเพาะเลี้ยงเอื้องในอาหารชลอการเจริญสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน สังเกตและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ต่อไปนี้ ความสูงต้น จำนวนใบและรากต่อต้น หลังจากนั้นนำเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหารชลอการเจริญย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารปกติสูตร VW สังเกตการเจริญและบันทึกผล ค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบและรากต่อต้น จะถูกนำไปทดสอบความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan multiple range test.

ผลการศึกษาวิจัย

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตารางที่ 7.1 พบว่ากวาวเครือดำมีผลต่อการเจริญของโปรโตรคอร์มเอื้องเงิน โดยโปรโตคอร์มเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหาร VW ที่เติมกวาวเครือดำจะมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าโปรโตคอร์มเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหาร VW ปกติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มไปเป็นเวลา 6 เดือนในอาหารปกติพบว่าโปรโตคอร์มเจริญไปเป็นต้นที่มีความสูง 17.8 มิลลิเมตร และโปรโตคอร์มเหล่านี้ยังมีการแบ่งตัวให้ยอดใหม่ประมาณ 4-5 ยอดต่อโปรโตคอร์ม ในขณะที่โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกวาวเครือดำมีความสูงเฉลี่ยของยอดอยู่ที่ 3.3 มิลลิเมตร ถึง 3.8 มิลลิเมตร เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกวาวเครือไม่มีผลต่ออัตราการชลอการเจริญของเอื้องเงิน

Table 7.1. Shoot height (mm) and number of leave of *D. draconis* after 6 months of storage under slow growth and after recovery on normal medium.

kwao keur powder (mg/L)	after 6 months of storage		after recovery (8 months of storage)	
	shoot height (mm)	no. of leave	shoot height (mm)	no. of leave
0	$17.8^{a} \pm 0.36$	$2.3^{a} \pm 0.47$	$3.03^{a} \pm 0.45$	$4.32^{a} \pm 0.65$
5	$3.8^{b} \pm 0.11$	$1.3^{b} \pm 0.47$	$1.42^{b} \pm 0.21$	$2.9^{b} \pm 0.72$
10	$3.3^{b} \pm 0.14$	$1.2^{b} \pm 0.37$	$1.50^{b} \pm 0.20$	$3.03^{b} \pm 0.61$
15	$3.7^{b} \pm 0.15$	$1.2^{b} \pm 0.38$	$1.37^{b} \pm 0.23$	$3.06^{b} \pm 0.78$
20	$3.8^{b} \pm 0.11$	$1.2^{b} \pm 0.40$	$1.49^{b} \pm 0.27$	$2.47^{c} \pm 0.62$

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเติมกวาวเครือดำในอาหารที่เพาะเลี้ยงเอื้องเงินสามารถชลอการเจริญของโปรโตคอร์มของเอื้องเงินได้ถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติโดยไม่ต้องลดอุณหภูมิแต่อย่างใด ซึ่งในการชลอการเจริญของพืชในเขตร้อนหลายชนิดนั้นทำโดยการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าอุณหภูมิที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายมากและยุ่งยากในการทำการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชด้วยวิธีนี้ (Sarkar 2001; Botau 2005) นอกจากนี้ไม่พบการแบ่งตัวของต้นเอื้องเงินในอาหารที่ชลอการเจริญ และกวาวเครือไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มเอื้องเงิน โดยพบว่าเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชลอการเจริญมีอัตราการรอดชีวิต 100 % และเมื่อทำการย้ายเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชลอการเจริญมาเป็นระยะเวลา 6 เดือนในอาหารปกติเพื่อกระตุ้นให้ต้นเอื้องเงินมาเจริญเป็นปกตินั้นก็พบว่าเอื้องเงินสามารถกลับมาเจริญได้ตามปกติภายใน 2 เดือน ซึ่งสังเกตพบว่าเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกวาวเครือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารปกติมีการเจริญเติบโตเร็วกว่า เอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกวาวเครือความเข้มข้นอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตที่เร็วกว่านี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองจะพบว่าผงกวาวเครือดำมีผลต่อการชลอการเจริญของโปรโตคอร์มเอื้องเงินคล้าย mannital แต่มีประสิทธิภาพมากกว่าเนื่องจาก mannital เมื่อใช้ในการชลอการเจริญของพืชหลายชนิดพบว่ามีผลต่อการเจริญของต้นพืช โดยพืชจะมีลักษณะต้นแคระ (Sarkar 2001) แต่ลักษณะเหล่านี้ไม่พบในเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกวาวเครือดำ นอกจากนี้ยังสามารถชลอการเจริญของพืชได้ในอุณหภูมิปกติอีกด้วย

จากการวิเคราะห์ผงกวาวเครือดำพบว่ามีสารหลายตัว เช่น daidzin, daidzein, genistein, coumestrol, genistin, puerarin, mirificin, kwakhurin และ mirificoumestan นอกจากนี้ยังพบสารอีกหลายตัวในกลุ่ม isoflavonoids (Cherdshewasart 2004) ซึ่งสารเหล่านี้คาดว่ามีบทบาทสำคัญในการชลอการเจริญของโปรโตคอร์มเอื้องเงิน ซึ่ง Woo et al. (2005) ได้เคยรายงานไว้ว่าการสะสมของ flavonoid-like compounds สามารถกดการเจริญของเซลล์ของพืชในตระกูลถั่วได้ อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะบอกว่าสารตัวในกวาวเครือดำที่มีผลต่อการชลอการเจริญของโปรโตคอร์มเอื้องเงิน จึงเป็นเรื่องที่ต้องการศึกษาต่อไป

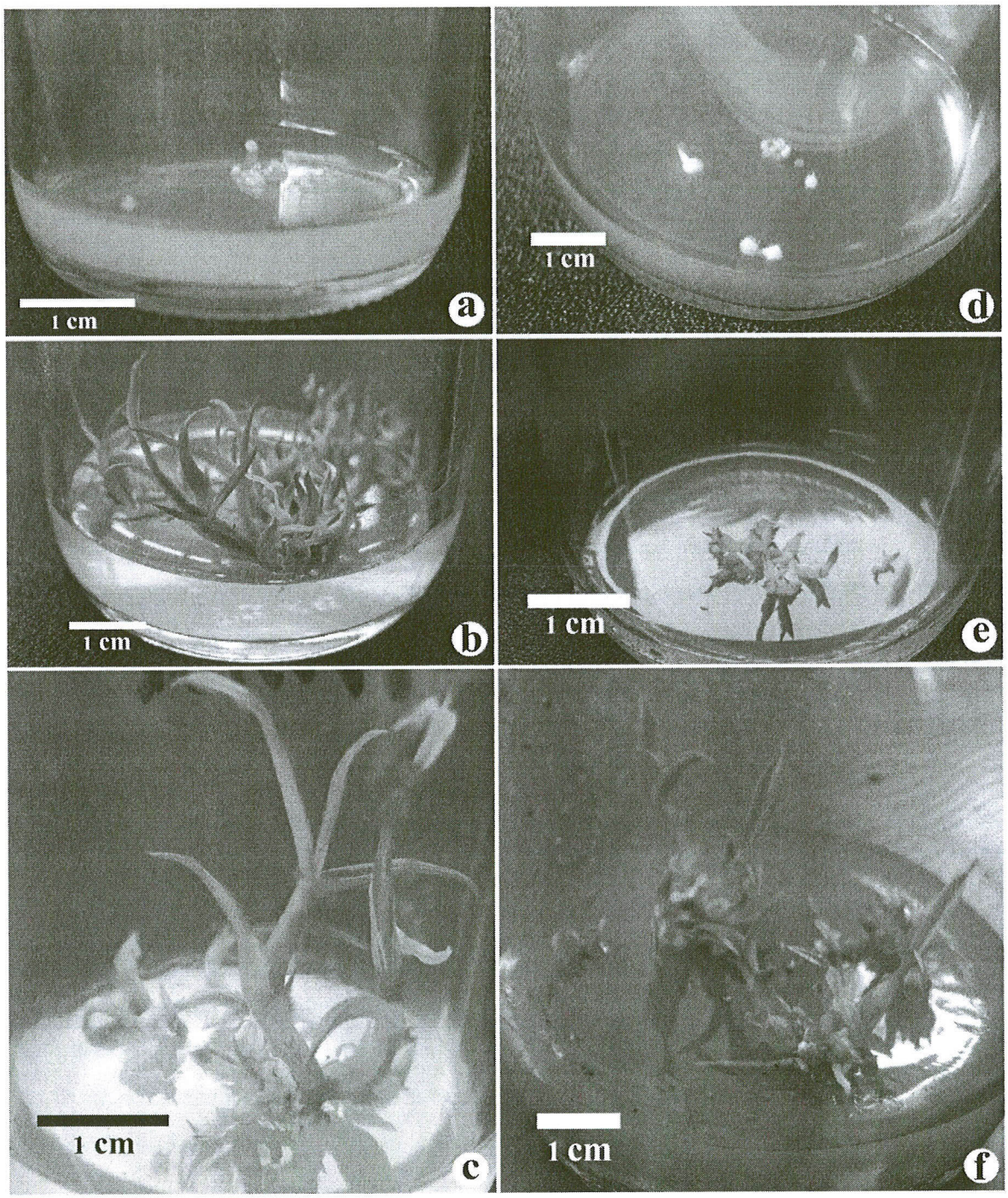

Fig. 7.1. *In vitro* conservation of *Dendrobium draconis*. a) 8-week-old protocorm on VW medium. b) 6-month-old shoot on VW. c) 8-month-old shoot on VW. d) 8-week-old protocorm on slow growth medium. e) 6-month-old shoot on slow growth medium. f) shoots after 2 months on recovery medium (VW).

สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่า เราสามารถพัฒนาวิธีการรักษาพันธุกรรมเอื้องเงินในสภาพปลอดเชื้อด้วยวิธีการชลอการเจริญไว้ได้ ซึ่งเป็นการรักษาพันธุกรรมพืชเหล่านี้ไว้เพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืนในอนาคต อีกทั้งเป็นพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้ชนิดอื่นด้วย

เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. **เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้**. อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

สุญาณี เวสสบุตร. 2550. **การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** http://www.qsbg.org/article/suyanee4Jan2007/article4Jan2007.htm

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. **กล้วยไม้เมืองไทย**. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

Botau, D., Danci, M., Danci, O. (2005). "In vitro" medium term preservation of different romanian landraces. Acta Biol Szeged 49: 41-42.

Cherdshewasart, W., Cheewasopit, W., Picha, P. (2004). **The differential anti-proliferation effect of white (Pueraria mirifica), red (Butea superba), and black (Mucuna collettii) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells**. Journal of Ethnopharmacology 93: 255-260.

Divakaran, M., Babu, K. N., Peter, K.V. (2006). Conservation of Vanilla species, in vitro. Scientia Horticulturae 110: 175-180.

Nikishina, T., Popova, E., Vakhrameeva, M., Varlygina, T., Kolomeitseva, G., Burov, A., Popovich, E., Shirokov, A., Shumilov, V., Popov, A. **2007**. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. Russian Journal of Plant Physiology, V 54 (1) p 121-127.

Sarkar, D., Chakrabart, S.K., Naik, P.S. (2001). Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro. . Euphytica 117: 133-142.

Seaton, P.T. and Hailes, N.S.J. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seeds. In: H.W. Pritchard, Editor, *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology, and Management*, Cambridge University Press, Cambridge , pp. 17–29.

Thammasiri, K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification, *Cryo-Letters* **21** , pp. 237–244.

Vacin, F., E. andWent, F. W. (1949). Some pH Changes in Nutrient Solutions Botanical Gazette 110: 605-613.

Woo, H. H., Jeong, B. R., Hawes, M. C. (2005). Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. Biotechnology Letters. 27: 365-374.