

การขยายพันธุ์แบบจุลภาคของหนอนตายหยากร ในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Micropropagation of *Stemona tuberosa* Lour.

อภิชาติ ชิดบุรี^{1/} พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง^{1/} และพิทักษ์ พุทธวรชัย^{1/}
Aphichat Chidburee^{1/}, Phongyuth Nualbunruang^{1/} and Pitak Puttawarachai^{1/}

Abstract: The study has given a method for rapid multiplication of *Stemona tuberosa* Lour., the medicinal plant that protects and kills insect worms. Multiple shoots were induced *in vitro* from shoot tip of *S. tuberosa* on MS (1962) medium containing 2 mg/l BA. The stem nodal segments derived from *in vitro* grown shoots also gave multiple shoots on the MS (1962) medium containing 4 mg/l BA and 1 mg/l NAA. The multiplication rate was 3.33 shoots per explant in 4 weeks. Rooting was achieved by transferring of the isolated shoot to MS (1962) medium containing with NAA (1 mg/l). The rooted plant were planted in containers (Sand: Rice husk charcoal; 1 : 1) and acclimatized under greenhouse, with over 80% of plant surviving transplantation. The morphology of the micropropagation plants was identical to the normal vegetatively propagated plants.

Keywords: *Stemona tuberosa* Lour., *in vitro*, micropropagation

บทคัดย่อ: การขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากรในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้สำหรับป้องกันและฆ่าหนอนของแมลง ยอดจำนวนมากสามารถชักนำได้จากส่วนของปลายยอดจากต้นหนอนตายหยากรที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ส่วนการเพิ่มจำนวนยอดได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. คือ 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน สามารถชักนำให้เกิดรากของต้นในสภาพปลอดเชื้อได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. หลังจากนั้นทำการย้ายออกปลูกมีการรอดตายสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางกายวิภาคของพืชที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อมีลักษณะเหมือนกับต้นที่ขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ

คำสำคัญ: หนอนตายหยากร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์แบบจุลภาค

^{1/} สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ. ลำปาง 52000

^{1/} Lampang Agricultural Research and Training Center. Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang 52000,

คำนำ

หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) พืชในวงศ์ Stemonaceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคได้หลายอย่าง ได้แก่ โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรคพยาธิภายใน มะเร็งตับลดระดับน้ำตาลสำหรับโรคเบาหวาน ริดสีดวง ปวดฟัน และปวดเมื่อย นอกจากนี้ใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช กำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนกัดกินใบ และเพลี้ยอ่อน กำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น *Rhizoctonia solani* และ *Erwinia carotovora* รวมทั้ง การกำจัดลูกน้ำ ยุง (นันทวัน และอรนุช, 2543) สำหรับสารออกฤทธิ์ที่ตรวจพบอยู่ในกลุ่ม alkaloids ได้แก่ stamofoline และ 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline (Jiwajinda *et al.*, 2001) ทำให้มีความต้องการใช้สมุนไพรขยายตัวเพิ่มขึ้น เมื่อมีการส่งเสริมการปลูกให้เพิ่มมากขึ้น ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาคือ ขาดแคลนต้นพันธุ์ ดังนั้นในการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในเวลาทีรวดเร็วสามารถนำเทคโนโลยีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ การขยายพันธุ์พืชสมุนไพรในสภาพปลอดเชื้อมีรายงานการศึกษาของ วิฑิตภาส (2530) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนตาข้างของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA 2 มก./ล. สามารถเพิ่มจำนวนต้นเฉลี่ยต่อขวดได้สูงสุด คือ 3.6 ต้น ในเวลา 4 สัปดาห์ และถ้าใช้ BA และ NAA อย่างละ 1 มก./ล. ก็สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นและรากได้ (เบญจพร, 2536) นอกจากนี้ อภิชาติ และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาผลของ BA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนต้นในสภาพปลอดเชื้อพบว่า เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหาร สูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถเกิดยอดใหม่ได้ 3 - 4 ยอดต่อชิ้นส่วน ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ จึงทำการศึกษาการขยายพันธุ์หนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้มีมากเพียงพอับความต้องการปลูกเพื่อการผลิตสมุนไพรในเชิงการค้า

อุปกรณ์และวิธีการ

นำชิ้นส่วนหน่อข้างที่แตกมาจากลำต้น ขนาด 1x3 ซม. มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนออกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์นาน 15 นาที หลังจากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนของปลายยอดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) แล้วนำไปเลี้ยงบนชั้นเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 3,000 ลักซ์ ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อได้ต้นที่ปลอดจากเชื้อแล้วนำไปศึกษาในแต่ละการทดลอง

การทดลองที่ 1

ศึกษาผลของไซโตไคนินและความเข้มข้นที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด โดยศึกษาชนิดของไซโตไคนิน (BA; N₆-Benzyladenine และ Kinetin) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง คือ 1, 2 และ 4 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD; Completely Randomized Design) มีทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ทำการบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นส่วน

การทดลองที่ 2

ศึกษาผลของ BA ร่วมกับ NAA ที่มีผลต่อการแตกยอด โดยศึกษา BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD; Completely Randomized Design) มีทั้งหมด 9 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ โดยใช้ชิ้นส่วนยอดหลังจากนำยอดที่ได้จากเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่ได้ 4 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามกรรมวิธี ทำการบันทึกความสูงของยอด (ซม.) จำนวนยอดที่เกิดขึ้นส่วน และจำนวนใบต่อกอ

การทดลองที่ 3

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นกล้าในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน โดยศึกษาสูตรวัสดุปลูก มี 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 ทราย ขุยมะพร้าว และขี้เถ้าแกลบ (อัตราส่วน 1 : 1 : 1), สูตรที่ 2 ดินร่วน ทราย และขี้เถ้าแกลบ (อัตราส่วน 1 : 1 : 1) และสูตรที่ 3 ทราย และขี้เถ้าแกลบ (อัตราส่วน 1 : 1) วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีทั้งหมด 3 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ โดยใช้ นำต้นกล้าไปเพาะชำในถุงพลาสติกขนาด 3 x 5 นิ้ว ใช้วัสดุปลูกตามแต่ละกรรมวิธี บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นกล้า

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนของหน่อข้าง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดปนเปื้อนอยู่ในช่วง 20.01 - 24.26 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มาจากเชื้อแบคทีเรีย มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนอยู่ในช่วง 17.14 - 20 เปอร์เซ็นต์ การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่ค่อนข้างสูงเนื่องจากชิ้นส่วนที่นำมามีเชื้อที่ติดมาบางส่วนอยู่แล้ว โดยเชื้อแบคทีเรียที่เรานั้น สามารถอาศัยอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อพืชได้ เช่น ในเนื้อเยื่อท่อน้ำและท่ออาหาร ทำให้คลอโรพลาสต์ไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อได้ ส่วนการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อรา นั้น พบว่า เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนที่ค่อนข้างต่ำ อยู่ในช่วง 2.86 - 4.26 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีเชื้อราอยู่ในส่วนของปลายยอดทำให้การฟอกฆ่าเชื้อทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากส่วนของยอดที่ถูกห่อหุ้มด้วยใบอ่อนจะมีช่องว่างภายในและมีฟองอากาศ ทำให้คลอโรพลาสต์ไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปฆ่าเชื้อได้

การทดลองที่ 1

การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากส่วนของปลายยอด (ภาพที่ 1) ระยะเวลาในการพัฒนาเป็นยอดใหม่ในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วงเฉลี่ย 14.89 -

25.48 วันและเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนมากกว่ากรรมวิธีอื่น คือ 2.33 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม Kinetin มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนที่เพิ่มขึ้นตาม ความเข้มข้นเช่นเดียวกัน ซึ่ง Kinetin มีผลต่อการแตกยอดใหม่ในบางชนิดของพืช (Gupta *et al.*, 2001)

การทดลองที่ 2

การเพิ่มปริมาณต้น (ตารางที่ 1) เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนมากกว่ากรรมวิธีอื่น (3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน) แต่มีความสูงของต้นที่ไม่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 2.42-4.58 ซม. ส่วนจำนวนใบต่อกอมีลดลงเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มก./ล. แต่กรรมวิธีอื่นไม่มีการเพิ่มของจำนวนใบต่อกอ ลักษณะของยอดใหม่ที่เกิด (ภาพที่ 2A) โดย Palai *et al.* (2000) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่างไซโตไคนินกับออกซินมีผลต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของยอดใหม่ในพืช สำหรับการชักนำให้เกิดรากของต้นกล้าหนอนตายหยากไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. มีจำนวนรากต่อกอ คือ 1 รากต่อกอ

การทดลองที่ 3

เมื่อย้ายต้นหนอนตายหยากออกปลูกในแต่ละกรรมวิธี (ตารางที่ 2) พบว่า ในวัสดุปลูกสูตร ทรายกับขี้เถ้าแกลบ (1:1) มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นกล้าหนอนตายหยาก (80 เปอร์เซ็นต์) มากกว่ากรรมวิธีที่ 1 และ 2 (60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีลักษณะของต้นทางกายภาพที่เหมือนกับต้นที่ขยายพันธุ์โดยวิธีการแยกหน่อ (ภาพที่ 2B)

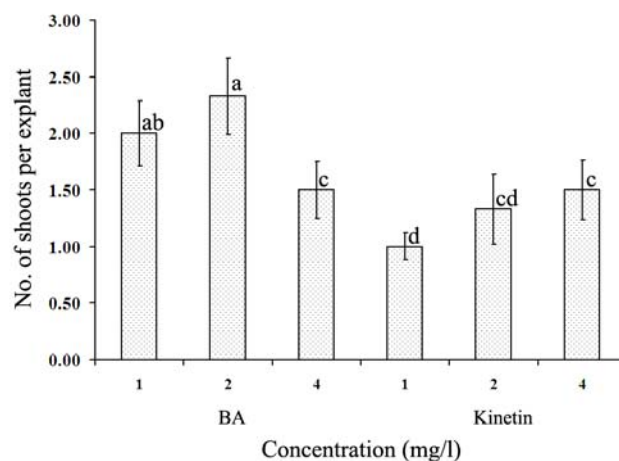


Figure 1 Effect of different type and concentration of cytokinin on number of shoots per explant of *S. tuberosa* Lour. after culture initiation.

Table 1 Effect of type and concentration of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation from explants of *S. tuberosa* Lour. after four weeks of culture.

Concentration (mg/l)		Height of shoot (cm)	No. of shoots per explant ^{1/}	No. of leaves per explant
BA	NAA			
1	1	4.43±0.91	1.33±0.52 ^d	1.33±0.67
	2	4.58±0.79	1.75±0.61 ^c	1.00±0.00
	4	3.46±0.46	1.75±0.33 ^c	1.00±0.00
2	1	3.83±0.52	2.83±0.17 ^b	- ^{2/}
	2	3.67±0.44	1.33±0.03 ^d	-
	4	2.42±0.88	1.33±0.82 ^d	-
4	1	3.08±0.02	3.33±0.75 ^a	-
	2	2.71±0.27	2.17±0.14 ^b	-
	4	3.29±0.51	1.83±0.47 ^c	-
BA		ns ^{3/}	ns	ns
NAA		ns	ns	ns
BA x NAA		ns	**	ns
LSD _{0.05}		ns	1.30	ns
CV(%)		26.15	30.12	50.13

^{1/} Mean within a column followed by the same letters were not significantly different by MINITAB analysis using Least Significant Difference test (LSD) at P=0.05

^{2/} - = Not initiate of leave

^{3/} ns = Not significant

Table 2 The percentage of survival of *S. tuberosa* were grown in different of planting materials after four weeks.

Treatment	Percentage of survival ^{1/}
Sand: Coconut husk :Rice husk charcoal (1 : 1 : 1)	60±12.81 ^b
Sand: Loam: Rice husk charcoal (1 : 1 : 1)	40±16.51 ^c
Sand: Rice husk charcoal (1 : 1)	80±10.47 ^a
LSD _{0.05}	19.48
CV(%)	30.46

^{1/} Mean within a column followed by the same letters were not significantly different by MINITAB analysis using Least Significant Difference test (LSD) at P=0.05

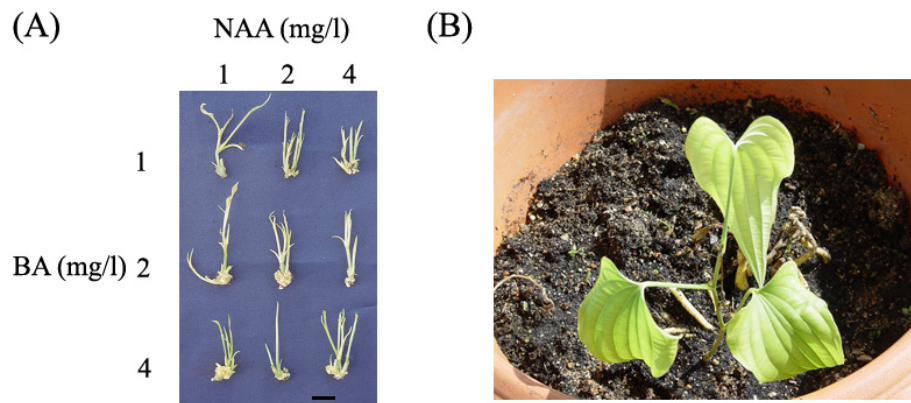


Figure 2 Shoot proliferation on type and concentration of *S. tuberosa* Lour. after four weeks of culture (A) (Bar = 1 cm), Plantlets of *S. tuberosa*, 4 weeks after transfer to sand and rice husk charcoal (B).

สรุป

การศึกษายานยพันธุ์ต้นหนอนตายหายากในสภาพปลอดเชื้อ สามารถชักนำได้จากส่วนของปลายยอดเมื่อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. การเพิ่มจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนได้ที่เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความ

เข้มข้น 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. จำนวน 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน หลังจากเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ และชักนำให้เกิดรากของต้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. หลังจากนั้นทำการย้ายออกปลูกมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายได้ดีในวัสดุปลูกที่มีทรายกับขี้เถ้าแกลบ (1 : 1) สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และมีลักษณะทางกายวิภาคของพืชที่เหมือนกับต้นที่ขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ

เอกสารอ้างอิง

- จิตติภาส ชิตโชติ. 2530. การผลิตต้นพันธุ์ซึ่งปลอดโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 18 หน้า.
- นันทวัน บุญยะประภัสร์ และ อรุณ ชัยชัยเจริญพร. 2543. สมุนไพรพื้นบ้าน. บริษัทประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 150 หน้า.
- เบญจพร เสียงเพราะ. 2536. การขยายพันธุ์ซึ่งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. โครงการงานชีววิทยาภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 38 หน้า.
- อภิชาติ ชิดบุรี พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และพิทักษ์ พุทธวรชัย. 2543. ผลของระดับความเข้มข้น BA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนต้นกระชายดำในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารเกษตร 17(2): 100-105.
- Gupta S. K., S. P. S. Khanuja and S. Kumar. 2001. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. Current Science 81(2): 206-210.
- Jiwajinda S., N. Hirai, K. Watanabe, V. Santisopasri, N. Chuengsamarnyart, K. Koshimiazu and H. Ohigashi. 2001. Occurrence of the insecticidal 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline in *Stemona collinsae*. Phytochemistry 56: 693-695.
- Palai, S. K., G.R. Rout, S. Samantaray and P. Das. 2000. Biochemical changes during *in vitro* organogenesis in *Zingiber officinale* Rosc. Journal of Plant Biology 27: 153-160.
-