

การขยายพันธุ์หัวข้าวเย็น (*Smilax glabra* Roxb.)

ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

In vitro propagation of Hao-Khao-Yen

(*Smilax glabra* Roxb.)

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, อรุมา สองศรี และภาณุมาศ ฤทธิไชย

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อิฐรัตน์

ภาควิชาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Onouma Songsri and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

หัวข้าวเย็น (*Smilax glabra* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ร่วมกับหัวข้าวเย็นอีก 4 ชนิด เพื่อรักษาโรคเมหะเร็ง เอดส์ เลือดเป็นพิษ และน้ำเหลืองเสีย จากความต้องการใช้ที่มีมากขึ้นจึงศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ ต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดและชักนำให้เกิดรากของต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ในการเพิ่มจำนวนยอด ทำการเพาะเลี้ยงข้อของยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อแล้วบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid) และ NAA (α -naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ 4.6 และ 4.9 ยอด และมีจำนวนข้อต่อยอด 4.4 และ 4.5 ข้อ/ยอด ตามลำดับ ส่วนการชักนำให้เกิดรากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหาร

*ผู้รับผิดชอบบทความ : yjirakia@tu.ac.th

สูตร ½ MS (half strength) และ MS ที่เติม NAA และ IBA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่เติม NAA และ IBA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้ยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) เกิดรากได้ในขณะที่สูตรอาหาร ½ MS และ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดราก โดยอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) คือ อาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำต้นที่มีรากออกปลูกในโรงเรือนพรางแสง 70 % พบว่ามีการรอดชีวิต 77.5 % หลังออกปลูกรานาน 2 สัปดาห์

คำสำคัญ : หัวข้าวเย็น; การเพิ่มจำนวนยอด; การชักนำให้เกิดราก; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Abstract

Hao-Khao-Yen (*Smilax glabra* Roxb.) is one of the medicinal plants which is commonly used with other four species of Hao-Khao-Yen to treat cancers, AIDS, septicemia and lymphatic diseases. The demand for medicinal purposes have been increased therefore propagation using plant tissue culture technique is required. The objective of this study was to investigate suitable media for in vitro shoot multiplication and root induction of Hao-Khao-Yen (*S. glabra*). The experiments were arranged in completely randomized design. For shoot multiplication, single-nodes from *in vitro* shoots were cultured on MS medium containing 0.5 and 1.0 mg/l BA in combination with 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/l IAA, IBA or NAA comparing to MS medium without plant growth regulator (PGR) as control. The results showed that multiple shoots were induced on all tested media in the experiment. Number of shoots (4.6 and 4.9) and nodes/shoot (4.4 and 4.5) were high on MS medium containing 1.0 mg/l BA in combination with 0.1 mg/l IAA or IBA, respectively. Then, shoots were cultured on ½ MS (half strength) or MS medium supplemented with 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l NAA or IBA for root induction. Root formation occurred on ½ MS and MS media supplemented with NAA or IBA at all concentrations while ½ MS and MS media without PGR could not induce root. The ½ MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/l NAA or IBA were the suitable media for root induction of Hao-Khao-Yen (*S. glabra*). Rooted shoots were acclimatized and grown under 70 % shading greenhouse. Survival percentage of 77.5 was recorded after transplanting for 2 weeks.

Keywords: *Smilax glabra* Roxb.; shoot multiplication; root induction; plant tissue culture

1. บทนำ

หัวข้าวเย็น (*Smilax glabra* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Smilacaceae เป็นไม้เถาเลื้อย มีลำต้นใต้ดินสะสมอาหารในเหง้า (rhizome) พบ

บริเวณป่าเขา ป่าดงดิบ ป่าเบญจพรรณ และป่าโปร่งทั่วทุกภาค [1] ส่วนมากมีทางภาคเหนือ จึงถูกเรียกชื่อว่าข้าวเย็นเหนือ หรือมีชื่อเรียกอื่น ๆ ตามภาษาท้องถิ่นหลายชื่อ เช่น ข้าวเย็นโคกแดง ยาหัวข้อ ค้อนกระแต

(อุบลฯ) หัวยาจีนปักขะเหนือ (ใต้) และเลียมโถ่ฮก (จีน) [2] ส่วนเหง้านิยมใช้ร่วมกับหัวข้าวเย็นอีก 4 ชนิด คือ *Pygmaeopremna herbacea* (Roxb.) Mold., *Dioscorea membranacea* Pierre, *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill และ *Smilax corbularia* Kunth เพื่อรักษาโรคมะเร็ง เอตส์ เลือดเป็นพิษ และ น้ำเหลืองเสีย [3] จากการที่ความต้องการใช้มีมากขึ้น แต่การขยายพันธุ์หรือเพิ่มจำนวนต้นให้ได้ปริมาณมาก นั้น ค่อนข้างใช้ระยะเวลาอันนานจึงจะสามารถผลิตต้นให้เพียงพอความต้องการ ดังนั้น จึงได้นำวิธีการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อเพิ่มจำนวนต้นของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*)

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีส่วนประกอบของธาตุอาหาร สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน กรดอะมิโน และวิตามินที่คล้ายกัน แต่ต้องการในปริมาณที่ต่างกัน โดยเฉพาะชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดต้น ราก หรือแคลลัสนั้น จะแตกต่างกันตามชนิดพืช อายุพืช ชิ้นส่วนพืช เป้าหมายของการเพาะเลี้ยงและสถานะของอาหาร [4] ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) นั้นยังไม่มีรายงาน แต่มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในสกุลเดียวกัน เช่น *Thirugnanasampandan* และ คณะ [5] ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *S. zeylanica* Vent. โดยนำส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ภายใน 7-10 วัน ทำการเพิ่มจำนวนยอดโดยนำส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ L-Glu ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านความ

เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ภายใน 3 สัปดาห์ Yamamoto และ Oda [6] สามารถชักนำให้ตาข้างพัฒนาเป็นยอดได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ส่วนใน *S. discotis* Warb. พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้มากถึง 177.8 % เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ถึง 93.3 % เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน [7] จากการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากของพืชแต่ละชนิด (species) จะแตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ศึกษาผลของ BA ร่วมกับ IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอด และ (2) ความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดรากของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำเหง้าพันธุ์หัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ลงปลูกในกระบะพลาสติกที่มีทรายผสมถ่านกลบอัตรา 1 : 1 วางในโรงเรือนหลังคาพลาสติก เมื่อเหง้าเริ่มงอกจึงย้ายปลูกลงกระถางขนาด 20 นิ้ว ที่มีวัสดุปลูกผสมดังนี้ ดิน : ทรายหยาบ : กาบมะพร้าวสับ : ปุ๋ยคอก : และถ่านกลบ 1.0 : 1.0 : 1.0 : 0.5 : 0.5 และวางในโรงเรือน

พรางแสง 50 % เมื่อต้นมีการเจริญเติบโต (รูปที่ 1A) จึงนำกิ่งมาตัด ให้ส่วนข้อมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แต่ละข้อมีตาข้าง 1 ตา ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างออกด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นนำขึ้นส่วนข้อแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % นาน 2 นาที แล้วนำไปแช่ในสารละลาย tetracycline ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ฟอกกำจัดเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ที่ความเข้มข้น 30 % นาน 45 นาที และ 25 % นาน 30 นาที โดยหยด Tween 20 ประมาณ 1-2 หยด ลงในสารละลายคลอโรกซ์ทั้งสองความเข้มข้น และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่กักจัดฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด และนำไปทดลอง

2.1 การทดลองที่ 1 การเพิ่มจำนวนยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตัดให้แต่ละท่อนมี 1 ข้อ เพาะเลี้ยงแต่ละข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 21 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 8 ข้ำ ข้ำละ 2 ขวด แต่ละขวดมี 1 ข้อ นำข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ชนิด cool white 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกการเกิดยอด (%) จำนวนยอดที่พัฒนา จำนวนข้อต่อยอด และความยาวยอด (เซนติเมตร)

2.2 การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดรากของยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และมีความยาวประมาณ 2.0-2.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS (half strength) และ MS ที่เติม NAA และ IBA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 14 สูตรอาหาร แต่ละสูตรอาหารมี 7 ข้ำ ข้ำละ 2 ขวด แต่ละขวดมี 1 ยอด นำยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ชนิด cool white 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ บันทึกการเกิดราก (%) จำนวนราก ความยาวราก (เซนติเมตร) และระยะเวลาการเกิดราก เมื่อรากมีความยาว 1 มิลลิเมตร

จากนั้นนำต้นที่มีรากแล้วออกปลูก โดยล้างวันที่รากออกแล้วนำมาเพาะในถาดพลาสติกขนาด 17.5×25 เซนติเมตร และมีขุยมะพร้าวเป็นวัสดุปลูก ปิดด้วยฝาถาดพลาสติกใสเพื่อควบคุมความชื้นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงค่อย ๆ เปิดฝาดอก และเปิดเต็มเมื่อออกปลูกแล้ว 2 สัปดาห์ ย้ายต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ปลูกลงในถุงพลาสติกที่มีวัสดุปลูกผสม ดังนี้ ดิน : ทรายหยาบ : กาบมะพร้าวสับ : ปุ๋ยคอก : ถ่านกลบ 1.0 : 1.0 : 1.0 : 0.5 : 0.5 บันทึกการรอดชีวิต (%) หลังออกปลูกในโรงเรือนพรางแสง 70 % แล้ว 2 สัปดาห์

วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของทั้ง 2 การทดลอง โดยวิเคราะห์ตามวิธีของการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ statistical analysis system

3. ผลการวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 การเพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ

ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ มีการพัฒนาของยอดใหม่ โดยมีการเกิดยอด 100 % บนอาหารทุกสูตร ส่วนจำนวนยอดที่พัฒนา จำนวนข้อต่อยอด และความยาวยอด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดที่พัฒนาเท่ากับ 4.9 และ 4.8 ยอดตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอด 4.6, 3.9 และ 4.3 ยอด ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว หรือเติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดพัฒนาน้อยเพียง 1.0-1.3 ยอด (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่ายอดที่พัฒนามบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือเติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนข้อต่อยอดสูงอยู่ในช่วง 5.6-6.9 ข้อ/ยอด ส่วนยอดที่พัฒนามบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุม

การเจริญเติบโต มีจำนวนข้อต่อยอดน้อยที่สุด 3.0 ข้อ/ยอด (ตารางที่ 1)

ความยาวยอดพบว่า ยอดที่พัฒนามบนอาหารทุกสูตรมีความยาวยอดในระดับที่เหมาะสมที่สามารถนำไปชักนำให้เกิดรากได้โดยไม่ต้องย้ายเปลี่ยนอาหาร โดยมีความยาวยอดยาวอยู่ในช่วง 1.79-3.70 เซนติเมตร ยอดที่มีความยาวมากที่สุดเท่ากับ 3.70 เซนติเมตรเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) ในขณะที่ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสั้นประมาณ 1.79-1.89 เซนติเมตร

3.2 การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ

จากการทดลองพบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้ยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) เกิดรากได้ ส่วนอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่เติม NAA และ IBA ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100 % (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนรากที่พัฒนา ความยาวราก และระยะเวลาในการเกิดรากของยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากใหม่ที่พัฒนาสูงสุด (21.3, 23.7 และ 20.8 ราก ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนรากที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของการเติม BA ร่วมกับ IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

BA	IAA	IBA	NAA	จำนวนยอดที่พัฒนา	จำนวนข้อ/ยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)
(มิลลิกรัมต่อลิตร)						
-	-	-	-	1.3 ^{i 1/}	3.0 ^h	1.79 ^h
0.5				1.1 ⁱ	6.0 ^{abc}	1.89 ^{gh}
0.5	0.1			3.1 ^{cd}	4.6 ^{defg}	2.93 ^{bcd}
0.5	0.5			3.3 ^{cd}	4.9 ^{cdefg}	2.94 ^{bcd}
0.5	1.0			3.0 ^{cdef}	5.0 ^{cdefg}	2.88 ^{cd}
0.5		0.1		3.1 ^{cd}	5.4 ^{bcdef}	2.91 ^{cd}
0.5		0.5		2.5 ^{defg}	6.5 ^{ab}	3.61 ^{ab}
0.5		1.0		2.0 ^{gh}	6.9 ^a	3.70 ^a
0.5			0.1	2.1 ^{fg}	5.6 ^{abcd}	3.16 ^{abc}
0.5			0.5	1.8 ^h	6.0 ^{abc}	2.58 ^{cdef}
0.5			1.0	1.0 ⁱ	6.2 ^{abc}	1.89 ^{gh}
1				1.2 ⁱ	6.8 ^a	2.01 ^{fgh}
1	0.1			4.6 ^{ab}	4.4 ^{defg}	2.62 ^{cdef}
1	0.5			4.8 ^a	3.7 ^{gh}	2.12 ^{efgh}
1	1.0			3.9 ^{abc}	4.1 ^{efgh}	2.44 ^{defg}
1		0.1		4.9 ^a	4.5 ^{defg}	2.54 ^{cdef}
1		0.5		3.7 ^{bc}	4.9 ^{cdefg}	2.67 ^{cde}
1		1.0		3.0 ^{cde}	5.0 ^{cdefg}	2.36 ^{defgh}
1			0.1	4.3 ^{ab}	4.1 ^{fgh}	2.35 ^{defgh}
1			0.5	2.6 ^{defg}	5.1 ^{cdef}	2.03 ^{fgh}
1			1.0	2.3 ^{efgh}	5.5 ^{bcde}	2.34 ^{defg}
F-test				**	**	**
C.V. (%)				10.4	9.6	8.61

^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ความยาวรากพบว่าอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความ

ยาวรากมากที่สุด 1.86 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความยาวรากที่พัฒนามาจากอาหารสูตร

½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่ารากที่พัฒนามน

อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ทุกความเข้มข้น มีความยาวรากที่ค่อนข้างสั้น โดยมีความยาวรากตั้งแต่ 0.61-1.00 เซนติเมตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเกิดราก (%) จำนวนราก ความยาวราก (เซนติเมตร) และระยะเวลาในการเกิดราก เมื่อเพาะเลี้ยงยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) บนอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่เติม NAA และ IBA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ อาหารสูตร MS	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	IBA	การเกิดราก (%)	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร)	ระยะเวลาในการ เกิดราก (วัน)
½	-	-	0	0.0 ^{h1/}	0.00 ^e	0.0 ^d
½	0.5		100	7.0 ^f	1.63 ^{ab}	35.0 ^c
½	1.0		100	13.7 ^b	1.86 ^a	35.0 ^c
½	2.0		100	21.3 ^a	1.63 ^{ab}	41.1 ^a
½		0.5	100	14.3 ^{bc}	1.59 ^{ab}	35.0 ^c
½		1.0	100	12.7 ^{bc}	1.52 ^{ab}	35.0 ^c
½		2.0	100	23.7 ^a	1.25 ^{bc}	35.0 ^c
1	-	-	0	0.0 ^h	0.00 ^e	0.0 ^d
1	0.5		100	7.6 ^{ef}	0.92 ^{cd}	35.0 ^c
1	1.0		100	10.4 ^{cd}	1.20 ^{bc}	35.7 ^{bc}
1	2.0		100	20.8 ^a	1.15 ^{bc}	36.8 ^{bc}
1		0.5	100	4.3 ^g	1.00 ^{cd}	35.0 ^c
1		1.0	100	9.3 ^{de}	0.85 ^{cd}	35.7 ^{bc}
1		2.0	100	7.3 ^{ef}	0.61 ^d	39.5 ^{ab}
F-test			-	*	*	*
C.V. (%)			-	10.1	11.32	5.5

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

*มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระยะเวลาในการเกิดราก พบว่าอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ใช้ระยะเวลาในการเกิดรากนานที่สุด คือ 41.1 และ 39.5 วัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับระยะเวลาในการเกิดรากเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหาร

สูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้ระยะเวลาในการเกิดราก 35 วัน (ตารางที่ 2)

เมื่อนำต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ที่พัฒนายอดและรากในสภาพปลอดเชื้อ (รูปที่ 1B และ 1C)

ออกปลูกในขุยมะพร้าว และย้ายลงในถุงพลาสติกที่มีวัสดุปลูกผสมดิน : ทรายหยาบ : กาบมะพร้าวสับ : ปุ๋ยคอก : และถ่านแกลบ 1.0 : 1.0 : 1.0 : 0.5 : 0.5 พบว่ามีการรอดชีวิต 77.5 % หลังออกปลูกลานาน 2 สัปดาห์ และต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในโรงเรือนพรางแสง 70 % (รูปที่ 1D)



รูปที่ 1 A: ลำต้นเหนือดินที่พัฒนาจากเหง้า และนำมาใช้ในการทดลอง B: การพัฒนาของยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร C: การพัฒนาของรากหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ D: ต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ที่นำออกปลูกในโรงเรือนพรางแสง 50 %

4. วิจารณ์

การเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ตาข้างพัฒนาไปเป็นยอดได้ ถึงแม้ว่าในอาหารเพาะเลี้ยงจะไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้งนี้เนื่องจากโดยทั่วไปการเจริญของตาข้างมักถูกข่มโดยอิทธิพลของยอด (apical dominance) และเมื่อตัดปลายยอดทิ้ง ตาข้างของพืชก็จะพัฒนาเป็นยอดได้ [8] ดังนั้นจากการทดลองเมื่อนำชิ้นส่วนที่มีตาข้างของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) มาเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมจึงทำให้พัฒนาเป็นยอดได้ อย่างไรก็ตาม อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม BA เพียงอย่างเดียว มีจำนวนยอดที่พัฒนาน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดร่วมกันในสัดส่วนที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญทั้งไซโทไคนินและออกซิน มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนยอดของพืชชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับอาหารเพาะเลี้ยงในการเพิ่มจำนวนยอดของ *Smilax* ชนิดอื่น เช่น *S. zeylanica* Vent. ที่ใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร [5] หรือการเพิ่มจำนวนยอดของ *S. discotis* Warb. บนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเพิ่มจำนวนยอด [7] นอกจากนี้ Bhojwani และ Razdan [9] และรังสฤษฎ์ [4] ได้รายงานไว้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของชิ้นส่วนพืชไปเป็นอวัยวะ โดย

ขึ้นอยู่กับสัดส่วนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม พืชบางชนิดอาจต้องการไซโทไคนินเพียงอย่างเดียว ซึ่งพืชจะมีการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดพืช สายพันธุ์ ชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยง อายุของชิ้นส่วนพืช ระยะเวลาการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง และสถานะของอาหารเพาะเลี้ยง [4] เมื่อพิจารณาถึงอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดเนื่องจากพืชชนิดนี้ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อด้วยการตัดส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ ดังนั้นอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ เพราะมีอัตราการเพิ่มจำนวนยอดสูงโดยคำนวณจากจำนวนยอด x จำนวนข้อ/ยอด ส่วนความยาวของยอดบนอาหารสูตรดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ดี ไม่สั้นหรือยาวจนเกินไป คือ อยู่ในช่วง 2.54-2.62 เซนติเมตร ซึ่งสามารถนำยอดที่พัฒนานี้ไปชักนำให้เกิดรากได้โดยไม่ต้องย้ายลงอาหารใหม่เพื่อเพิ่มความยาวยอด ดังเช่นที่ Bhojwani และ Razdan [9] ได้แนะนำให้ใช้ยอดขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ในการชักนำให้เกิดราก

จากการชักนำให้เกิดรากของยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารสูตร ½ MS และ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ แสดงให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีผลต่อการพัฒนารากของพืชชนิดนี้ โดยบุญยืน [10] ได้กล่าวว่า การชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อของพืชหลายชนิดนั้นจำเป็นต้องเติม

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เช่น IAA IBA และ NAA ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยสารเหล่านี้มีสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดราก เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA หรือ IBA ต่อการชักนำให้เกิดราก พบว่า ½ MS และ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้ยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) เกิดรากได้ 100 % โดยรากที่พัฒนามาจากอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรากจำนวนมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นที่ใช้สูง แต่ความยาวรากที่พัฒนามาจากอาหารสูตรดังกล่าวก็ใกล้เคียงกับที่ใช้ NAA หรือ IBA ความเข้มข้นต่ำกว่า และหากพิจารณาในแง่ของต้นทุนการผลิต ควรเลือกใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการทดลองใน *S. zeylanica* Vent. ที่สามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร [5] หรือยอดของ *S. discotis* Warb. ที่สามารถเกิดรากได้บนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร [7] อย่างไรก็ตาม ยอดของ *S. oldhami* สามารถชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต [11] จากการทดลองนี้เมื่อนำต้นหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อออกปลูก พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตค่อนข้างสูง และต้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพธรรมชาติ

5. สรุป

5.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) คือ อาหารสูตร MS

ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 การชักนำให้ยอดหัวข้าวเย็น (*S. glabra*) เกิดราก ควรใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540, สารานุกรมสมุนไพร, โอ. เอส. พรินต์ติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ, 380 น.
- [2] นายเกษตร, 2542, สมุนไพร ไม้ประดับหายาก เล่ม 2, แปลนพรินต์ติ้ง, กรุงเทพฯ, 299 น.
- [3] Itharat, A., Jaiarree, N. and Kumpava, K., 2010, Cytotoxic saponin against lung cancer cells from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, J. Med. Assoc. Thai. 93: 192-197.
- [4] รังสฤษฎ์ กาวีตะ, 2545, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค, พิมพ์ครั้งที่ 3, ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 219 น.
- [5] Thirugnanasampandan, R., Muthaiaian, V. N. and Bai, V.N., 2009, *In vitro* propagation and free radical studies of *Smilax zeylanica* Vent, Afr. J. Biotechnol. 8: 395-400.
- [6] Yamamoto, T. and Oda, H., 1992, Various methods for seedling production of *Smilax oldhami* Miq. By tissue culture, Acta Hort. 319: 143-148.

- [7] Liu, Y.T., Huang, C.M., Yao, D.Y., Li, L. and Hu, M.F., 2006, Tissue culture of *Smilax discotis* Warb, Chin. Forest. Sci. Tech. 20(3): 42-45.
- [8] Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.F., 1992, Biology of Plants, 5th Ed., Worth Publishers, New York, 791 p.
- [9] Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K., 1996, Plant Tissue Culture: Theory and Practice, A Revised Edition, Elsevier, Amsterdam, 767 p.
- [10] บุญยืน กิจวิจารณ์, 2547, เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช, โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น, 168 น.
- [11] Tazawa, K., Abe, T. and Sasahara, T., 1996, Efficient *in vitro* mass-propagation of Shiode (*Smilax oldhami* Miq.) through liquid culture, Plant Tissue Cult. Lett. 13: 7-14.