เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านชักมดลูกเพื่อการขยายพันธุ์[1]

In Vitro Propagation of *Curcuma xanthorrhiza* Roxburg

ชยานิจ ดิษฐบรรจง กษิดิศ ดิษฐบรรจง

เสาวนี เขตสกุล

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Tissue culture of *Curcuma xanthorrhiza Roxburg* was studied to conduct a mass propagation. Bulbs of *C. xanthorrhiza* were collected from Kanchanaburi and Maha Sarakham provinces. The bulbs were planted for emerging of new shoots. Young shoots of 5 - 10 cm. length were cultured on Murashige and Skoog (MS) media, having 0, 10, 20, 30, 40 and 50 μM of 6-benzylaminopurine (BA) and 0, 10, 20, 30, 40 and 50 μM of kinetin. Experiment was conducted in Completely Randomized Design. The result indicated that BA 30 - 50 μM were the most effective for microshoot induction (3.6 - 4.5 shoots/explant) which obtained in 2 months. In vitro microshoots obtained from base of primary shoot were then cultured for proliferation, having 0, 20, 40, 60 and 80 μM of BA. The result revealed that BA 40 - 60 μM were most effective for in vitro microshoot induction and 3.6 - 4.1 shoots/microshoot were obtained within also 2 months. Concentration of 80 μM caused discoloration and death of the microshoots. Young plants were further planted on MS medium without plant growth regulator for 3 months until roots emerged. When the young plants were 8 months old, they were planted in pots in experimental greenhouse for acclimatization. It was found that survival rate was 92%.

รหัสกิจกรรม 05-01-47-05

รหัสการทดลอง 05-01-47-0506

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านชักมดลูก *Curcuma xanthorrhiza* เพื่อขยายพันธุ์ในปริมาณมาก ได้รวบรวมหัวพันธุ์ว่านชักมดลูกจาก จ.กาญจนบุรี และมหาสารคาม มาปลูกเพื่อรอให้แทงหน่อ หลังจากนั้นจะได้นำหน่ออ่อนยาวประมาณ 5 - 10 ซม. มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่มี 6 - benzylaminopurine (BA) 6 ระดับคือ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 μM และ kinetin 6 ระดับคือ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 μM ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) พบว่า BA ที่ระดับ 30 - 50 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด 3.6 - 4.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ภายในเวลา 2 เดือน ต่อจากนั้นนำส่วนยอดอ่อน (*in vitro* microshoot) ของว่านชักมดลูกที่เกิดจากการชักนำจากส่วนโคนของหน่อ มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 20, 40, 60 และ 80 μM เพื่อหาอัตราความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ *in vitro* microshoot พบว่า ความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 40 - 60 μM สามารถชักนำให้เกิดการแตกยอดสูงสุด คือ 3.6 - 4.1 ยอดต่อ microshoot ภายในเวลา 2 เดือนเช่นกัน ส่วนความเข้มข้นที่ระดับ 80 μM มีผลทำให้ยอดอ่อนซีดและตาย และหลังจากที่เลี้ยงต้นอ่อนต่อไปอีก 3 เดือนในอาหาร MS ที่ไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตจนมีขนาดโตพอสมควรพบว่ามีการแตกรากได้เอง เมื่อต้นอ่อนมีอายุ 8 เดือนย้ายปลูกลงกระถาง ในโรงเรือนทดลองเพื่อปรับสภาพและบันทึกอัตราการอยู่รอด หลังย้ายปลูก 3 เดือน พบว่ามีอัตราการอยู่รอดสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

ว่านชักมดลูก *Curcuma xanthorrhiza* Roxburg เป็นสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์เดียวกับขิงและข่า คือวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้ล้มลุกประเภทขิงข่า สูงได้ถึง 2 เมตร เหง้ายาวได้ถึง 10 ซม. ผิวนอกสีส้มอ่อน เนื้อในสีส้มหรือส้มแดง เหง้าใต้ดินของว่านชักมดลูกเป็นส่วนของพืชที่นำมาใช้ประโยชน์มาก มีผู้นำมาศึกษาและแยกสารที่เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ กลุ่มเบนซีนอยส์ สารสำคัญในกลุ่ม คือ curcumin เป็นสารที่ให้สีเหลืองซึ่งมีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด กลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ (Monoterpenes) กลุ่มเซสควิเทอร์ปีนส์ (Sesquiterpemse) กลุ่มฟีนิลโพรพานอยส์ (Phenylpropanoids) ซึ่งสารสกัดว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิตัวกลม กระตุ้นการหลั่งน้ำดี ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เพิ่มน้ำหนักมดลูก และปริมาณไกลโคเจน เหนี่ยวนำให้เกิดการหนาตัวของเยื่อบุช่องคลอด ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง keratin ในเยื่อบุช่องคลอด และลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด

การขยายพันธุ์ว่านชักมดลูก ใช้ชิ้นส่วนของเหง้าซึ่งเป็นส่วนที่ต้องนำมาใช้ประโยชน์ ปลูกในช่วงปลายฝนในหลุมห่างกัน 60 ซม. ภายใต้สภาพร่มเงาเล็กน้อย การปลูกโดยใช้เหง้าหลัก ต้องใช้วัตถุดิบในปริมาณมาก แต่สามารถเก็บเกี่ยวได้หลังปลูก 8 - 12 เดือน ในขณะที่ทำการปลูกด้วยหน่อที่แตกออกมาเหง้า ต้องใช้เวลานานถึง 2 ปี จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ให้ได้ในปริมาณมาก แต่ยังไม่มีการศึกษาในพืชชนิดนี้มาก่อน มีเพียงการศึกษาในพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกันซึ่งได้แก่ขมิ้น (*C. longa*) มีการขยายพันธุ์ขมิ้นจากช่อดอกอ่อนโดยใช้ส่วนผสมระหว่าง BA 5-10 mg/l และ 2, 4-D 0.2 mg/l หรือ NAA 0.1 mg/l และส่วนผสมระหว่าง TDZ 1 – 2 mg/l และ IAA 0.1 mg/l เพื่อให้เกิดยอด

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการ

1. การขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ

<u>การทดลองที่ 1</u> การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของพืช

1.1 รวบรวมเหง้าของว่านชักมดลูกจากจังหวัดมหาสารคาม และกาญจนบุรี มาล้างให้สะอาด ใส่ไว้ในตะกร้าโดยไม่ต้องนำลงปลูกในดิน ทิ้งไว้จนกระทั่งมีการแตกหน่อ ตามปกติว่านชักมดลูกจะมีการพักตัวในฤดูหนาว และจะเริ่มแตกหน่อประมาณเดือนมีนาคม - เมษายน โดยเหง้าของว่านชักมดลูก 1 เหง้า จะแตกหน่อประมาณ 2-6 หน่อ ขึ้นอยู่กับขนาดของเหง้า

1.2 ตัดแยกหน่ออ่อนซึ่งมีตาอยู่ด้วย ที่มีขนาดยาวประมาณ 5-10 นิ้ว ออกจากเหง้า นำมาล้างให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Haiter® Bleach (sodium hypochlorite as available chlorine 6% w/w) ความเข้มข้น 20% (v/v) นาน 15 นาที

1.3 ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 - 4 ครั้ง

1.4 นำหน่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดแต่งบริเวณโคนหน่อที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ รวมทั้งตัดส่วนกาบใบทิ้ง

1.5 ตัดแบ่งโคนหน่ออ่อนออกเป็น 4 ชิ้น ตามแนวตั้ง (ภาพที่1) โดยที่แต่ละชิ้น symmetry กันแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ Kinetin ความเข้มข้นชนิดละ 6 ระดับ คือ 0, 10 , 20, 30, 40 และ 50 μM เปลี่ยนอาหารใหม่โดยใช้สูตรเดิมทุกๆ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำประกอบด้วยชิ้นส่วนพืช 20 ชิ้น ต่อ 1 สิ่งทดลอง (treatment)

<u>การทดลองที่ 2</u> การเพิ่มปริมาณ *in vitro* microshoot

นำ *in vitro* microshoot ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงหน่ออ่อน (การทดลองที่ 1.1) มาเพิ่มปริมาณดังนี้

2.1 นำส่วนยอดของ *in vitro* microshoot ยาวประมาณ 3 - 4 นิ้ว ที่เกิดจากการชักนำจากหน่ออ่อนมา ตัดแต่งส่วนกาบใบตอนบนของยอด และส่วนฐานของหน่อที่เป็นสีดำ หรือเนื้อเยื่อที่ตายแล้วทิ้งไป

2.2 นำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 20, 40, 60 และ 80 μM เลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิ 25$\pm$2°C เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดรวม วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ แต่ซ้ำประกอบด้วยชิ้นส่วนพืชหรือ microshoot 20 microshoot ต่อ 1 สิ่งทดลอง (treatment) เปลี่ยนอาหารใหม่โดยใช้สูตรเดิมทุกๆ 4 สัปดาห์

2. การย้ายปลูกต้นกล้า

นำขวดที่เพาะเลี้ยงว่านชักมดลูก มาเลี้ยงไว้ในที่มีแสง และอุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้น จึงนำต้นว่านชักมดลูกออกจากขวดล้างน้ำให้ อาหารวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมดนำมาปลูกในโรงเรือน เพาะชำ ในกระบะขนาด 2 x 2 นิ้ว วัสดุปลูก ทราย แกลบ ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 2 : 2 : 1 นาน 1 เดือน แล้วย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 10 นิ้ว ใช้ ดิน ขุยมะพร้าว ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2 : 2 : 1 บันทึกข้อมูล อัตราการเลี้ยงรอด

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ

<u>การทดลองที่ 1</u> การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของพืช

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนของหน่ออ่อน (young sprout) ในสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ในกลุ่ม cytokinin 2 ชนิด คือ 6-benzylaminopurine (BA) และ Kinetin พบว่าสารกระตุ้นการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิด สามารถชักนำให้เกิดยอดรวม(microshoot) ได้ภายในระยะเวลา 2 เดือน การใช้ BA ที่ระดับ 30 - 50 μM สามารถชักนำให้เกิดยอด 3.6 - 4.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ BA ที่ระดับ 30 และ 40 μM ให้จำนวนยอดรวมสูงสุดเท่ากันที่ 4.5 ยอด/ชิ้นส่วนพืช (ภาพที่2) ส่วนการใช้ kinetin ในทุกระดับของความเข้มข้น ชักนำให้เกิดยอดได้น้อยกว่าการใช้ BA Kinetin ที่ระดับ 20-50 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 0.8 - 1.1 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชโดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1)

การใช้หน่ออ่อนมาขยายพันธุ์นั้น พบว่ามีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราและบักทีเรียค่อนข้างสูงถึง 30 เปอเซนต์ ซึ่งถือเป็นเรื่องปกติของชิ้นส่วนพืชที่สัมผัสอยู่กับดิน การใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตในกลุ่ม cytokinin ให้ผลดีกับพืชในสกุล *Curcuma* เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longar*) สามารถใช้หน่ออ่อน ซึ่งงอกจากหัวขมิ้นชันมาขยายพันธุ์ และการใช้ BA ในการขยายพันธุ์พืชที่มีเหง้า (rhizome) นี้สามารถทำได้กับขิงได้เช่นเดียวกัน (*Zingiber officinale*) (Balachandran *et al*., 1900)

<u>การทดลองที่ 2</u> การเพิ่มปริมาณ *in vitro* microshoot

หลังจากที่ใช้ BA ที่ระดับ 30 - 50 μM ในการชักนำให้เกิดยอดจากหน่ออ่อนของว่านชักมดลูกแล้ว นำ *in vitro* microshoot ที่เกิดขึ้นมาทำการเพิ่มปริมาณ ในสารกระตุ้นการเจริญเติบโตชนิดเดิม พบว่าBA ที่ระดับ 0 - 80 μM สามารถชักนำให้ *in vitro* microshoot เกิดยอดรวมได้ แต่การเกิดยอดรวมในครั้งนี้แตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญในทุกระดับ การใช้ BA ที่ระดับ 40 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงถึง 4.1 ยอด/microshoot (ภาพที่ 3) รองลงมาคือ 60 และ 80 μM ชักนำให้เกิดยอดรวม 3.6 และ 3.5 ยอด/ microshoot ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ภายในเวลา 2 เดือน แต่ความเข้มข้นที่ 80 μM จะมีผลทำให้ยอดมีอาการเหลืองซีด และตาย ซึ่งเป็นผลของความเข้มข้นที่สูงเกินไป นอกจากนี้ จากการทดลอง พบว่าในการเกิดยอดรวม จะมีหน่อใหญ่ซึ่งเจริญขึ้นมาก่อน และมีหน่อเล็กๆ ที่แตกออกมาทางด้านข้างซึ่งเกิดขึ้นมาภายหลัง ซึ่งจะต้องแยกหน่อเหล่านั้นออกจากกัน หากทิ้งไว้การเจริญเติบโตจะช้า ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการที่หน่อใหญ่มีการข่มการเจริญเติบโตของหน่อเล็กๆ ที่เกิดภายหลัง และเมื่อแยกหน่ออ่อนมาเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือน พบว่าหน่ออ่อนสามารถแตกรากได้เอง ในอาหาร MS ที่มีและไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต แต่จะมีการแตกรากได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Balachandran, 1990 ใน *Curcuma* spp. และ *Zingiber officinale* Rosc. ที่สามารถแตกรากได้เอง และ Nadgauda *et al*., 1978 ในพืชสกุล *Zingiber* sp. ที่อ้างโดย Balachandran ว่าอัตราการเกิดรากจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น

2. การย้ายปลูกต้นกล้า

หลังจากย้ายปลูกต้นอ่อนว่านชักมดลูกลงกระถาง พบว่ามีอัตราการรอดตายสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการปรับสภาพของพืชก่อนที่จะนำออกปลูก โดยนำต้นอ่อนที่อยู่ภายในขวดทั้งขวดมาไว้ในอุณหภูมิห้องและในที่มีแสงจากธรรมชาติ จึงทำให้ต้นอ่อนมีอัตราการรอดตายสูงและมีอัตราการเจริญเติบโตดี (ภาพที่ 4)

สรุปผลการทดลอง

1. ในการชักนำให้เกิดยอดจากหน่ออ่อนของว่านชักมดลูก การใช้ BA ที่ระดับ 30 - 50 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดสูง 3.6 – 4.5 ยอด /ชิ้นส่วนพืช ส่วน kinetin ที่ระดับ 20 – 50 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 0.8 - 1.1 ยอด/ชิ้นส่วนพืช

2. การเพิ่มปริมาณจากส่วนที่ปลอดเชื้อ (*in vitro* microshoot) การใช้ BA ที่ระดับ 40 - 60 μM สามารถชักนำให้ *in vitro* microshoot เกิดยอดรวมได้ 3.6 - 4.1 ยอดต่อ microshoot

เอกสารอ้างอิง

Balachandran, S.M., S.R. Bhat, and K.P.S. Chandel. 1990. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Plant Cell Reports. 8:521-524.

Salvi, N.D., L. George, and S. Eapen. 2001. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 66: 113-119.

ตารางที่ 1 ผลของ BA และ kinetin ต่อจำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วนพืช) ของว่าชักมดลูก

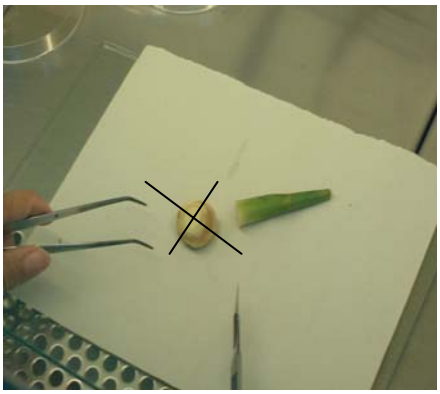
ความเข้มข้นของสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (μM)	จำนวนยอด [1]	
	BA	kinetin
0	0.4 a	0.2 a
10	1.1 ab	0.6 ab
20	2.1 b	1.1 c
30	4.5 c	1.2 c
40	4.5 c	0.8 bc
50	3.6 c	1.1 bc

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

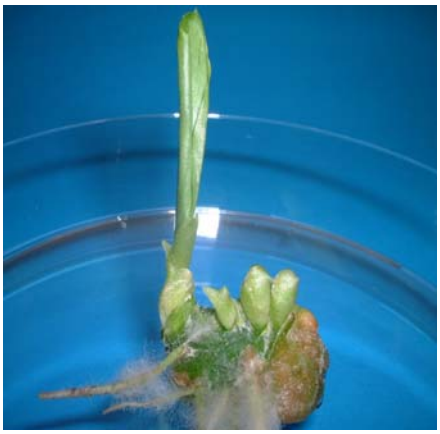
ตารางที่ 2 ผลของ BA ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวม โดยใช้ *in vitro* microshoot เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น

ความเข้มข้นของ BA (μM)	จำนวนยอดรวม[1] (ยอด/microshoot)
0	1.0 a
20	2.7 b
40	4.1 d
60	3.6 cd
80	3.5 c

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 1 การตัดแบ่งหน่ออ่อนเป็น 4 ส่ว
เพื่อใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดจาก 1/4
ของหน่ออ่อนที่งอกจากหัวว่านชัก
มดลูก บนอาหาร MS ที่มี BA 30 µM

ภาพที่ 3 ยอดรวมที่เกิดจาก
in vitro microshoot บน
อาหาร MS ที่มี BA 40 µM

ภาพที่ 4 ต้นว่านชักมดลูกซึ่งเกิดจากการ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายปลูกใน
โรงเรือนทดลอง