การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อพลูคาวในสภาพหลอดทดลองเพื่อการผลิตพืชสมุนไพรอย่างมีคุณภาพ
In Vitro Multiple Shoot Induction from Nodal Explants of *Houttuynia cordata* Thunb to Improve Medicinal Plant Production Quality

วรารัตน์ ศรีประพัฒน์[1*] ประกาย อ่อนวิมล[1] ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์[1] สุพินญา บุญมานพ[2]
Sriprapat, W.[1*], Onwimol, P.[1], Wanichananan, P.[1] and Boonmanop, S.[2]

Abstract

Plant tissue culture technique for medicinal plant; *Houttuynia cordata* Thunb, is considered to be the most efficient technology for large scale plant multiplication for improving the production process as in pharmaceutical industry. In this work, the most effective treatment for sterilization of *H. cordata* was evaluated and the effect of plant growth regulators on shoot multiplication was also studied. Among four sterilizing processes used in this experiment, the results showed that the maximum percentage of clean and alive nodal (95%) was observed when using 95% ethanol for 1 minute, followed by 15% Clorox for 15 minutes, and then followed by 5% Clorox for 5 minutes. Furthermore, after cultured the sterilized explants on MS medium supplemented with 0–4.0 mg·L^{-1} BA for 45 days. The highest number of shoots regenerated (4.15±0.90 shoots/explant) were observed on MS medium supplemented with 1.0 mg·L^{-1} BA.

Keywords: *Houttuynia cordata* Thunb, Plant tissue culture, Sterilization, Plant growth regulator

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์สมุนไพรพลูคาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอต่อความต้องการเพื่อรองรับอุตสาหกรรมการผลิตสมุนไพรอย่างมีคุณภาพ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลูคาว ซึ่งพบว่าวิธีการฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อที่เหมาะสม คือ การใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และตามด้วยคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำให้ได้ข้อที่ปลอดเชื้อและสามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ความเข้มข้น 0–4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าการใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด (4.15±0.90 ยอดต่อข้อ)

คำสำคัญ: พลูคาว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การฟอกฆ่าเชื้อ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช

คำนำ

พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) เป็นสมุนไพรที่มีความสำคัญซึ่งในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง รวมทั้งอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้ให้ความสนใจ เนื่องจากพลูคาวสามารถแปรรูปเป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น ยายับยั้งแบคทีเรียและไวรัส ยาขับปัสสาวะ ยาลดอาการบวมน้ำ ยาแก้โรคผิวหนัง และแก้ผื่นคัน เป็นต้น (Chen และคณะ, 2011) สารพฤกษ์เคมีหรือสารสำคัญที่พบในพลูคาว ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ กรดอินทรีย์ กรดไขมัน กรดอะมิโน และน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น (Fu และคณะ, 2013) ซึ่งสารพฤกษ์เคมีที่พบในพลูคาวนี้มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัส ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันหลอดเลือดฝอยแตก และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Wangchauy และ Chanprasert, 2012) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่าปริมาณสารพฤกษ์เคมีหรือสำคัญในพืชมักแปรผันตามสภาพแวดล้อมหรือพื้นที่เพาะปลูก ในปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตสารสำคัญในพืช ซึ่งทำให้การผลิตสารสำคัญสามารถทำได้อย่างต่อเนื่องเพื่อทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกพืชตาม

[1] กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เลขที่ 85 หมู่ 1 ถ.รังสิต-นครนายก ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110
[1] Agricultural Biotechnology Research Group, Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 85 Sirindhorn plant genetic resources building, rangsit-nakhon nayok Rd., Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand
[2] กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[2] Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Rd., Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

ธรรมชาติ (วราภรณ์, 2551) อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสามารถขยายพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็ว แต่การจะทำให้ชิ้นส่วนพืชบางชนิดปลอดจุลินทรีย์ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงนั้นทำได้ยาก เนื่องจากชิ้นส่วนตาข้างอาจมีซอกระหว่างก้านใบกับลำต้นหรือมีขนปกคลุม การฟอกฆ่าเชื้อ (surface sterilization) จึงเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสารฟอกฆ่าเชื้อจะกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของเนื้อเยื่อเพื่อไม่ให้มีการเจริญเติบโตและสร้างความเสียหายแก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมักมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้จำนวนมากและรวดเร็วขึ้น (Phetkhong และคณะ, 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จะพัฒนากระบวนการผลิตพืชสมุนไพรพลูคาวสายพันธุ์ไทยในสภาพปลอดเชื้อเพื่อให้ได้พืชสมุนไพรที่มีคุณภาพ ปราศจากการปนเปื้อนสารพิษและสิ่งเจือปน ซึ่งจะเป็นทางเลือกในการปลูกพืชที่มีประสิทธิภาพเพื่อการวิจัยและพัฒนารวมทั้งควบคุมคุณภาพมาตรฐานในการผลิตสมุนไพรพลูคาวในเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลูคาว

คัดเลือกต้นพลูคาวก้านม่วงสายพันธุ์ไทยที่มีความสมบูรณ์ปราศจากโรคและศัตรูพืชที่มีอายุ 6 เดือน จากนั้นตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอดและข้อออกมาจากกระถางเพาะเลี้ยง นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดได้มาล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ตัดใบส่วนเกินแล้วนำมาล้างทำความสะอาดเอาเศษดินที่ติดมาออกด้วยน้ำยาล้างจาน จำนวน 1 ครั้ง และล้างน้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาตัดเป็นท่อนสั้นๆ ทำความสะอาดชิ้นส่วนข้อและยอดพลูคาวโดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อและเวลาในการทำความสะอาดแตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 4 กรรมวิธี 20 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ได้แก่

<u>กรรมการวิธีที่ 1</u> ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที

<u>กรรมการวิธีที่ 2</u> ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที

<u>กรรมการวิธีที่ 3</u> ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที

<u>กรรมการวิธีที่ 4</u> ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที

ซึ่งทุกทรีตเมนต์เติมสาร Tween20 เพื่อลดแรงตึงผิว จากนั้นเมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำชิ้นส่วนไปล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ตายออกแล้วตัดชิ้นส่วนข้อให้ได้ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนชิ้นที่ปราศจากการปนเปื้อนและสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test

การทดสอบประสิทธิภาพของ BA ในการชักนำให้เกิดยอด

นำต้นพลูคาวที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS อายุ 2 เดือน มาตัดใบและปลายยอดออกให้หมดแล้วตัดแยกเป็นข้อเดี่ยว ๆ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1.0, 2.0, 3.0, และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ RCBD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ 7 ขวดเพาะเลี้ยง ในทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2.5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน บันทึกผลโดยนับจำนวนยอดและบันทึกลักษณะยอดที่เกิดขึ้น จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การฟอกฆ่าเชื้อสมุนไพรพลูคาวก้านม่วงสายพันธุ์ไทยด้วยกรรมวิธีต่างๆ พบว่าแต่ละกรรมวิธีส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชมีเปอร์เซ็นการปลอดเชื้อและการพัฒนาที่แตกต่างกัน โดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อข้อพลูคาวที่เหมาะสมคือการใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะทำให้ได้ข้อที่ปลอดเชื้อและสามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พืชจะมีจำนวนใบต่อต้นเท่ากับ 3.80±1.01 ใบ (Figure 1) เทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมัน

95% (Table 1) อย่างไรก็ตามหากใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จะมีผลให้ได้ข้อที่ปลอดเชื้อถึง 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน แต่เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงได้จะมีการพัฒนาที่ต่ำกว่า โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พืชจะมีจำนวนใบต่อต้นเพียง 1.75±1.29 ใบ ดังนั้นประสิทธิภาพของการฟอกฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ เนื่องจากใบต้นพลูคาวมีลักษณะซ้อนกันมีซอกใบจำนวนมากทำให้น้ำยาที่ใช้ฟอกเข้าไปไม่ทั่วถึง ถ้าใช้เวลาในการฟอกน้อยเกินไปทำให้มีจุลินทรีย์ จำพวกแบคทีเรียและเชื้อราหลงเหลืออยู่ ทำให้อัตราการปราศจากเชื้อค่อนข้างต่ำ แต่ถ้าใช้เวลาในการฟอกนานเกินไปทำให้ยอดอ่อนจะเกิดสีน้ำตาลและตายได้จึงส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำหรืออาจส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อของพลูคาวได้ นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อพืชเองก็มีอาจมีเชื้อเอนโดไฟต์ที่เป็นแบคทีเรียหรือเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคพืช โดยเชื้อเอนโดไฟต์เหล่านี้มักก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Ulrich และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการจัดการที่เหมาะสมเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของชิ้นส่วนหรือต้นพืช

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสมุนไพรพลูคาวก้านม่วงสายพันธุ์ไทยให้เกิดยอดจานวนมากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ได้ยอดจำนวนมากที่สุด เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมัน 95% (Table 2) โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 4.15±0.90 ยอดต่อข้อ (Table 2 และ Figure 2A) อย่างไรก็ตามเมื่อชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจำนวนยอดจะลดลง และที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะลำต้นจะแคระแกร็นไม่สูงและบางตัวอย่างไม่สามารถเกิดยอดได้อย่างชัดเจน พืชไม่สามารถพัฒนาใบและรากที่สมบูรณ์ได้ (Figure 2B) รากมีลักษณะผิดปกติคือสั้นเป็นปุ่มปม ดังนั้นการใช้ BA ที่ความเข้มข้นสูงอาจส่งผลเกิดสารตกค้างภายในเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยพบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินต่ำในช่วงของการชักนำให้เกิดยอดมีผลทำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้ดีกว่าการใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงในการชักนำยอด (Saunders และ Bingham, 1975; นัฏฐา และคณะ, 2561)

สรุปผล

เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อต้นพลูคาวที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือการใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด เท่ากับ 4.15±0.90 ยอดต่อข้อ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริม ววน. ทะเบียนวิจัยกรมวิชาการเกษตร 03-10-59-03-00-00-07-64

เอกสารอ้างอิง

วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, สำนักพิมพ์ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น, 120 หน้า.

นัฏฐา นิตย์วัฒนกุล นิภาวัลย์ แหมไธสง และอารักษ์ ธีรอาพน, 2561, ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กุหลาบเหลืองโคราช (*Aerides houlletiana* Rchb.f.), วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 49: 1 (พิเศษ) : 291-293.

Chen, X., Wang, Z., Yang, Z., Wang, J., Xu, Y., and Tan, R.X., 2011, *Houttuynia cordata* blocks HSV Infection Through Inhibition of NF-kB Activation, Antiviral Research., 92: 341-345.

Fu, J., Dai, L., Lin Z. and Lu, H., 2013, *Houttuynia cordata Thunb.*: A review of Phytochemistry and Pharmacology and Quality Control, Chinese Medicine, 4: 101-123.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

Phetkhong, S., Sumochitraporn, S., and Makkasab, C., 2010, Surface Sterilization Study and Growth Regulators Effect in Tissue Culture of Aquatic plant *Cryptocoryne albida*, In Technical Paper No.9/2010, Pathumthani: Aquaculture Animal Genetics Research and Development Institute. (in Thai)

Saunders, J.W. and Bingham, E.T., 1975, Growth Regulator Effects on Bud Initiation in Callus Cultures of *Medicago sativa*, American Journal of Botany, 62: 850-855.

Ulrich, K., Stauber, T. and Ewald, D., 2008, *Paenibacillus*—A Predominant Endophytic Bacterium Colonising Tissue Cultures of Woody Plants, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93: 347–351.

Wangchauy, C., and Chanprasert, S., 2012, Effects of Houttuynia *cordata* Thunb. Extract, Isoquercetin and Rutin on Cell Growth Inhibition and Apoptotic Induction in K562 Human Leukemic Cells, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(5): 2590-2598.

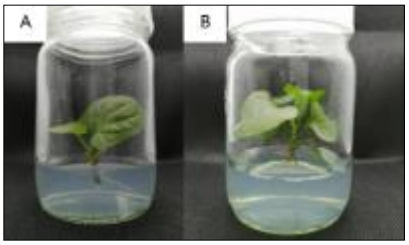

Figure 1 *In vitro* propagation of *H. cordata* on MS medium for (A) 4 weeks and (B) 8 weeks.

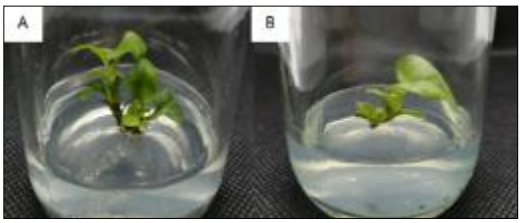

Figure 2 Multiple shoot regenerated of *H. cordata* after cultured on MS medium supplement with BA (A) 1 mg·L^{-1} and (B) 4 mg·L^{-1} for 6 weeks.

Table 1 Effectiveness of different sterilization schemes and leaf development of sterilized *H. cordata* after cultured on MS medium for 8 weeks.

Sterilizing agents	Percentage of sterilized buds (%)	Number of leaves per shoot
Clorox 15% for 15 min	30	1.10±1.74 ^{c}
Clorox 15% for 15 min and Clorox 5% for 5 min	75	2.35±1.42 ^{b}
Alcohol 95 % for 1 min, Clorox 15% 15 min and Clorox 5% 5 min	95	3.80±1.01 ^{a}
Alcohol 95 % for 5 min, Clorox 15% 15 min and Clorox 5% 5 min	95	1.75±1.29 ^{b}

Different superscript letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$.

Table 2 Morphogenetic responses of nodal explants of *H. cordata* cultured on MS medium supplemented with different concentrations of BA for 45 days.

BA (mg·L^{-1})	0	1	2	3	4
Number of shoots per explant	1.10±0.30^{b}	4.15±0.90^{a}	1.25±0.53^{b}	1.15±0.36^{b}	1.40±0.58^{b}

Different superscript letters in the same row indicate significant differences at $p < 0.05$.