การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro Conservation of Chettamuun Phloeng Daeng (*Plumbago indica* L.)

สุกัลยา ศิริฟองนุกูล[1]
Sirifongnukul, S.[1]

Abstract

In vitro conservation of Chettamuun Phloeng Daeng (*Plumbago indica* L.) was explored for multiple shoot inductions, root regeneration, and slow growth technique. For shoot multiplication, the highest number of shoots occurred on MS medium containing 2 mg/L BA with an average of 18.01 shoots per node. Shoots rooted on half-MS medium showed 100% of rooting rate. The average length of induced roots was 2.24 cm. The slow growth technique was examined by culturing the shoot explants on MS medium supplemented with 2% or 3% sucrose and was found to extend the average storage period to 10 months.

Keywords: Red Plumbago, *Plumbago indica* L., *In vitro* conservation, Minimal growth

บทคัดย่อ

การศึกษาการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทดสอบอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและเกิดราก และการชะลอการเจริญเติบโตในขวดเพาะเลี้ยง พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล. สามารถชักนำต้นเจตมูลเพลิงแดงให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 18.01 ยอดต่อตา และอาหารสูตร half-MS ชักนำให้เกิดรากได้ดีโดยมีอัตราการเกิดราก 100% และรากมีความยาวเฉลี่ย 2.24 ซม. เมื่อทดสอบสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า สามารถยืดอายุการเพาะเลี้ยงได้นานที่สุดเฉลี่ย 10 เดือน บนอาหารสูตร MS ที่เติม Sucrose 2% หรือ 3%

คำสำคัญ: เจตมูลเพลิงแดง การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ การชะลอการเจริญเติบโต

คำนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เป็นพืชสมุนไพรอยู่ในวงศ์ PLUMBAGINACEAE พบกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในประเทศเขตร้อน มีการนำรากมาใช้เป็นยาโดยมีสรรพคุณรักษาโรคทางโลหิตในสตรี กระตุ้นการทำงานของลำไส้และกระเพาะอาหาร ช่วยระงับอาการปวดฟัน ทาแก้กลากเกลื้อน (วิทย์, 2542) ในรากของเจตมูลเพลิงแดงมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม naphthoquinone ชื่อ plumbagin มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (Didry และคณะ, 1994; Nakornchai และคณะ, 1995) ต้านมะเร็ง (Parimala และ Sachdanandam, 1993) และยับยั้งการลอกคราบของหนอนผีเสื้อได้ (Kubo *et al*., 1983) การนำรากมาใช้จะต้องมีขนาดเหมาะสมและมีคุณภาพดีใช้เวลาในการปลูกหลายปีทำให้มีผู้นิยมขุดเก็บรากออกมาจากป่ากันมาก อาจทำให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ จึงสมควรหาทางอนุรักษ์พืชชนิดนี้ไว้ไม่ให้สูญพันธุ์

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชที่มีศักยภาพสูงวิธีหนึ่ง การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากหรือการชักนำให้เกิดรากเพื่อการนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยเติมสารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) หรือออกซิน (auxin) ในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ (รังสฤษดิ์, 2540) สารในกลุ่มไซโตไคนินนิยมใช้ BA หรือ KN เป็นส่วนใหญ่ ส่วน TDZ ซึ่งเป็น cytokinin-like compound ก็มีรายงานว่าให้ผลที่ดีในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีในไม้ยืนต้น (Huetteman และ Preece, 1993). มีรายงานการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ และชิ้นส่วนตาข้างของเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica* L.) โดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้อาหารสูตร MS เป็นพื้นฐานกับสูตรที่ใช้ธาตุอาหารหลัก NPK ร่วมกับน้ำสกัดจาก *Citrus sinensis* โดยอาหารทั้งสองกลุ่มจะเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BAP พบว่าการใช้ MS เป็นอาหารพื้นฐานนั้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่า (Gbadamosi และ Egunyomi, 2010) และ สุภาภรณ์ (2546) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยใช้ตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1-4 มก./ล. พบว่า อาหารสูตรที่เติม BA 3 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด โดยลักษณะของยอดที่เกิดมีขนาดเล็กเกาะกันแน่นเป็นกระจุก ยอดเหล่านี้เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+BA 1 มก./ล. พบว่า สามารถชักนำให้มีลักษณะสมบูรณ์ได้ จากนั้นจึงนำไปชักนำให้

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน) กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร 10900
Biotechnology Research and Development Office (Bangkhaen), 50 Phaholyothin Rd., Ladyao, Chatuchack, Bangkok, 10900

เกิดรากก่อนนำออกปลูกอาหารสูตร MS และ half-MS สำหรับการศึกษาสูตรอาหารชะลอการเจริญเติบโตเพื่อควบคุมให้พืชเจริญช้าลงและสามารถเก็บรักษาพืชในหลอดทดลองได้นานมากขึ้นอันจะช่วยลดขนาดพื้นที่ในการเก็บรักษาและลดจำนวนครั้งในการเปลี่ยนถ่ายอาหารได้ มีรายงานว่าการเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ sucrose 30 ก./ล. เปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่เติม mannitol ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60 ก./ล. และเติมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต (BA 0.5 มก./ล. + IAA 0.16 มก./ล.) หรือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เก็บรักษาไว้ที่ความเข้มแสง 50 μmol/m^2/s ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่เปลี่ยนอาหาร พบว่า mannitol สามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เจริญจากตาของข้อได้ โดยต้นเจตมูลเพลิงแดงสามารถเก็บรักษาได้ถึง 8 เดือน และยังคงมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง (รมณีย์ และ ศาลักษณ์, 2547) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนยอดอย่างรวดเร็ว ชักนำให้เกิดราก และเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมต้นเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

1.) การชักนำให้เกิดยอด ตัดชิ้นส่วนตาข้างจากชิ้นพืชในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลอง 10 สูตร คือ MS+sucrose 3% ที่เติม BA (6-benzyladenine) หรือ KN (Kinetin) หรือ TDZ (Thidiazuron) ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 mg/l ต่อชนิด และ MS+sucrose 3% ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำๆละ 1 ขวดๆละ 2 ชิ้น บันทึกผลจำนวนยอด ความสูงของทรงพุ่ม และการเกิดราก

2.) การชักนำให้เกิดราก นำยอดที่ได้จากข้อ 1. ยาว 2 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 สูตร ได้แก่ สูตร MS เป็นสูตรควบคุม (Control) สูตร ½ MS ที่เติม NAA หรือ IAA ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/l หรือ 0.50 mg/l (½ MS คือสูตรที่ลดธาตุอาหารลง ½ ของสูตร MS ปกติ) ทุกสูตรเติม sucrose 3% เลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำๆละ 1 ขวดๆ ละ 2 ชิ้น บันทึกผลร้อยละการเกิดราก จำนวนราก (ที่สามารถนับได้) และความยาวราก

3.) การชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ นำยอดที่ได้จากข้อ 1. ยาว 2 ซ.ม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลสองชนิดคือ sucrose และ mannitol วางแผนการทดลองแบบ 2x4 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1) ปริมาณ sucrose 2 ระดับ ได้แก่ 2% และ 3% และปัจจัยที่ 2) ปริมาณ mannitol 4 ระดับ ได้แก่ 0% 1% 2% และ 4% คิดเป็น 8 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น ทรีทเมนต์ละ 10 ซ้ำๆ ละ 2 ขวดๆ ละ 1 ชิ้น โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต บันทึกผลการทดลองที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2, 4, 6, 8 และ 10 เดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร บันทึกข้อมูล ระยะเวลาความมีชีวิต จำนวนยอด และการเกิดราก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การชักนำให้เกิดยอด</u>

จากการทดลอง พบว่า ทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าสูตรควบคุม (TS10) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เนื่องจากเป็นสารในกลุ่มไซโตไคนินที่กระตุ้นการเกิดยอดหรือสร้างตาข้าง (รังสฤษดิ์, 2540) การเติมหรือไม่เติมสารจึงให้ผลแตกต่างอย่างชัดเจน โดยสูตร TS3 ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด (18.01 ยอดต่อชิ้น) รองลงมาคือ TS7 (17.14 ยอดต่อชิ้น) (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ Sivanesan และ Jeong (2009) ที่เพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงขาว และรายงานของสุภาภรณ์ (2546) ที่เพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดง พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วน shoot tip และ node เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ KN สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าสูตร MS ที่ไม่เติมสารและสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นบนสูตรที่เติม BA และ KN มีลักษณะเป็นยอดสมบูรณ์ ในขณะที่ยอดที่เกิดบนสูตรที่เติม TDZ นั้น มีขนาดเล็ก ใบเรียวแหลม และเกิดแคลลัสเป็นปมเกาะกันหนาแน่น อาจเนื่องจาก TDZ มีความเข้มข้นสูงเกินไปจึงทำให้กระตุ้นการเกิดแคลลัสและโซมาติกเอมบริโอมากกว่า (Huetteman และ Preece, 1993) เมื่อดูลักษณะความสูงทรงพุ่ม พบว่า เจตมูลเพลิงแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA และ KN (TS1-TS6) ให้ความสูงของทรงพุ่มแตกต่างจากสูตรที่เติม TDZ (TS4-TS5) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (Table 1) อนึ่ง สูตรที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรที่เติม BA KN ที่ความเข้มข้นไม่สูงมากสามารถทำให้เจตมูลเพลิงแดงออกรากได้ (Table 1)

<u>การชักนำให้เกิดราก</u>

จากการทดลอง พบว่า ทุกสูตรสามารถชักนำให้เจตมูลเพลิงแดงเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้เจตมูลเพลิงแดงเกิดรากได้ดีที่สุด คือ สูตร TR2 และ TR6 เกิดรากได้ 100% สูตรที่ใช้ NAA มีอัตราการเกิดรากน้อยกว่า IAA (Table 2) รากที่เกิดบนอาหารสูตร MS half-MS และ half-MS ที่เติม IAA นั้น มีลักษณะเป็นเส้นยาวและแข็งแรง มีรากแขนงพอสมควรทำให้มีแนวโน้มในการนำออกปลูกทำได้ง่าย ส่วนสูตรที่เติม NAA นั้น นอกจากยอดที่เจริญเติบโตช้าและเกิดรากน้อยรากที่ปรากฏก็เป็นรากขนอ่อนสั้นๆ เกาะเป็นกระจุก ฉ่ำน้ำ และเกิดแคลลัส สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุภาภรณ์ (2546) และ

รศนา และสุภวรรณ (2543) ซึ่งเพาะเลี้ยงยอดเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA พบว่า มักเกิด callus สีเทา มีลักษณะฉ่ำน้ำ เกิดรากจำนวนน้อย ขนาดสั้น

<u>การชะลอการเจริญเติบโต</u>

จากการทดลอง พบว่า สูตร T1 และ T5 เป็นสูตรที่เพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดงได้เป็นเวลานานที่สุดโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร (10 เดือน) รองลงมาคือสูตร T2 (7.7 เดือน) (Table 3) เมื่อความเข้มข้นของ sucrose และ mannitol เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อาหารมีแรงดันออสโมซิสสูงขึ้นด้วยทำให้เจตมูลเพลิงแดงมีการเจริญเติบโตลดลงจนถึงกับหยุดชะงักและอยู่ได้นานเพียง 2-4 เดือนเท่านั้น ต่างจากรายงานของ รมณีย์และศาลักษณ์ (2547) ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงต้นเจตมูลเพลิงแดงในอาหารสูตร MS+3%sucrose+2%manitol ได้นาน 8-14 เดือน อาจเนื่องจากความแตกต่างของการให้แสงในระหว่างเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชม.ต่อวัน ในขณะที่การทดลองนี้ให้แสง 16 ชม. ต่อวัน แสดงว่าแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตบนอาหารที่เพิ่มแรงดันออสโมซิสอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผล

1. สูตรที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล.
2. สูตรที่ชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์และเหมาะแก่การย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้ คือ อาหารสูตร MS และ half-MS
3. สูตรที่อนุรักษ์ต้นเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 7-10 เดือน ได้แก่ อาหารสูตร MS+sucrose 2-3%

เอกสารอ้างอิง

รมณีย์ เจริญทรัพย์ และศาลักษณ์ พรรณศิริ, 2547, การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ: ผลของ mannitol ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา, การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร, หน้า 553-559.

รศนา ชุมแสง และสุภวรรณ สุขสว่าง, 2543, การคัดเลือกต้นเจตมูลเพลิงแดงที่มีการสร้างสารในปริมาณสูงและการขยายพันธุ์, โครงงานนักศึกษา, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542, พจนานุกรมสมุนไพรไทย, อักษรพิทยา, กรุงเทพฯ, 233 หน้า.

สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์, 2546, การขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ, ปัญหาพิเศษปริญญาโท, ภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 28 หน้า.

Didry, N., Dubrevil, L. and Pinkas, M., 1994, Activity of Anthroquinonic and Naphthoquinonic Compounds on Oral Bacteria, Pharmazie, 49: 681-683.

Gbadamosi, I.T. and Egunyomi, A., 2010, Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. (Plumbaginaceae) in Ibadan, Southwestern, Nigeria, Journal of Medicinal Plants Research, 4(4): 293-297.

Huetteman, A. and Preece, E. J., 1993, Thidiazuron: A Potent Cytokinin for Woody Plant Tissue Culture, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 33: 105-119.

Kubo, I., Uchida M., and Klocke J. A., 1983, An Insect Ecdysis Inhibitor from The African Medicinal Plant, *Plumbago capensis* (Plumbaginaceae), Agriculturaland Biological Chemistry, 47: 911-913.

Mok, M.C., Mok, D.W.S., Armstrong, D.J., Shudo, K., Isogai, Y. and Okamoto, T., 1982, Cytokinin Activity of N-phenyl-N′-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron), Phytochemistry, 21:1509–1511

Nakornchai, S., Anantavara, S. and Yodsnaha, S., 1995, Synergism Between Tetracycline and Naphthoquinone Antimalarial Drug Against Chloroquine Resistant *Plumbago falciparum,* Mahidol University Annual Research Abstracts, 23: 296-297.

Nasiruddin, M. and Rafiul Islam, A.K.M., 2018, *In Vitro* Slow-Growth Conservation for Two Genotypes of *Solanum tuberosum L.* Bangladesh Journal of Botany, 47(3): 369-380.

Parimala, R. and Sachdanandam, P. 1993. Effect of Plumbagin on Some Glucose Metabolizing Enzymes Studied in Rats in Experimental Hepatoma, Molecular and Cellular Biochemistry, 125: 59-63.

Sivanesan, I. and Jeong, B. R., 2009, Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L., African Journal of Biotechnology, 8(16): 3761-3768.

Table 1 Average number of shoots, average of shoot length and percentage of rooting were recorded after 90 days

Treatment		Average number of shoots	average of shoot length (cm.)	Percentage of rooting
TS1	MS + BA 0.50 mg/l	3.43c	2.99ab	14.3
TS2	MS + BA 1.00 mg/l	6.50c	3.67a	14.3
TS3	MS + BA 2.00 mg/l	18.01a	2.39bc	0.0
TS4	MS + KN 0.50 mg/l	1.71c	3.06ab	28.6
TS5	MS + KN 1.00 mg/l	1.14c	3.41ab	100.0
TS6	MS + KN 2.00 mg/l	1.57c	3.37ab	57.1
TS7	MS + TDZ 0.50 mg/l	17.14a	0.51d	0.0
TS8	MS + TDZ 1.00 mg/l	15.67ab	0.52d	0.0
TS9	MS + TDZ 2.00 mg/l	7.40bc	0.36d	0.0
TS10	MS (control)	1.00d	1.49cd	14.3
	F-value	**	**	

Mean values marked with the same letter vertically showed no statistical difference at the 5% level DMRT.

Table 2 Percentage of rooting were cultured on experimental medium after 60 days.

Treatment		Percentage of Rooting	Average number of roots (countable)	Average of root length (cm.)
TR1	MS (control)	87.5	4.38	2.11
TR2	1/2MS	100.0	5.00	2.24
TR3	1/2MS+NAA 0.25 mg/l	75.0	n/a[1]	n/a[1]
TR4	1/2MS+NAA 0.50 mg/l	62.5	n/a[1]	n/a[1]
TR5	1/2MS+IAA 0.25 mg/l	87.5	6.25	2.96
TR6	1/2MS+IAA 0.50 mg/l	100.0	8.16	2.32

n/a[1] **= no data**

Table 3 Survival of Chettamuun Phloeng Daeng (*Plumbago indica* L.) under *in vitro* in different treatment.

Treatment		Average duration* (months)	Average number of shoots**	Percentage of rooting
T1	MS+2%sucrose+0%manitol	10.0a	1.1	100
T2	MS+2%sucrose+1%manitol	7.7a	1.0	90
T3	MS+2%sucrose+2%manitol	4.4b	0.7	0
T4	MS+2%sucrose+4%manitol	2.4b	0.8	20
T5	MS+3%sucrose+0%manitol	10.0a	1.0	100
T6	MS+3%sucrose+1%manitol	4.4b	1.0	40
T7	MS+3%sucrose+2%manitol	4.1b	1.1	10
T8	MS+3%sucrose+4%manitol	3.2b	0.9	10

* Mean values marked with the same letter vertically showed no statistical difference at the 5% level DMRT.

** The average number of shoots was recorded in the last month for each treatment.