รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. **ชุดโครงการวิจัย**
2. **โครงการวิจัย** **โครงการการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (โครงการเดี่ยว)**
3. **ชื่อการทดลอง** **เทคนิคการขยายพันธุ์ชาฤๅษีดอยตุง (*Paraboea doitungensis*) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์**

   Micropropagation Technique of *Paraboea doitungensis* for Conservation

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง พัชร ปิริยะวินิตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน พัฒน์นรี รักษ์คิด[1], ปัณฑารีย์ กาญจนวัฒนาวงศ์[1]

5. **บทคัดย่อ**

ชาฤๅษีดอยตุง เป็นพืชหายากถิ่นเดียวของไทย วงศ์ Gesneriaceae จำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ โดยนำตัวอย่างต้นชาฤๅษีดอยตุงจากแหล่งธรรมชาติมาศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อฝักของชาฤๅษีดอยตุง 3 วิธี คือจุ่มฝักในแอลกอออล์ 95 % แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ, บิดฝักเคาะเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และบิดฝักเคาะเมล็ดใส่ในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 5% พบว่าวิธีจุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วผ่านไฟฆ่าเชื้อบิดฝักเคาะเมล็ดใส่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 5% และเขี่ยเมล็ดเลี้ยงบนอาหารเป็นวิธีที่เหมาะสม ทำให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 50 % การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกรดแนพทาลีนแอซิติก (NAA) ร่วมกับสารเบนซิลอะดีนิน (BA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 mg/l พบว่าใบชาฤๅษีดอยตุงที่เลี้ยงบนอาหารเติมสาร NAA เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ย 2.48 ยอด และสามารถเพิ่มขนาดกลุ่มเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการใช้สาร BA ร่วมด้วยซึ่งจะทำให้เกิดเป็นพุ่มยอดขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ สำหรับการเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์บนอาหารสูตร MS และ ½ MS ร่วมกับการเติมสาร NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 mg/l พบว่าการเลี้ยงยอดบนอาหาร ½ MS จะชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าเลี้ยงบนอาหาร MS หรือการใช้ NAA ความเข้มข้นต่างๆ

Abstract

Paraboea doitungensis, an endemic species categorized in Gesneriaceae family, can be found only in Chiangmai province of Thailand. The study on germplasm multiplication by using *in vitro* propagation technique was done in this research. The result showed that appropriate sterilization for this species is immersing mature seed capsules in 95% ethanol followed by burning the outer surface of the capsules. Seeds inside capsule can be sterilized by dipping them in 5% hydrogen peroxide (H_2O_2) and excised seeds were aseptically transferred to MS

---

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ปทุมธานี, ประเทศไทย, 12110

medium. It was found that this sterilization method can prevent materials from contamination up to 50%. Apart from sterilization technique, shoot multiplication was also conducted in this research. The microplants from leave culture were transferred to MS medium supplemented with Naphthalene acetic acid (AAA) and Benzyladenine (BA). The result showed that adding only 0.1 mg/L NAA induced average number of vigorous shoots at 3.48. Root induction from cultures of those vigorous shoots was also done by transferring them to MS and ½ MS medium supplemented with NAA. The result showed that ½ MS medium supplemented with NAA better induced average number of root and average root length namely 7.29 and 6.62 cm. respectively.

6. **คำนำ**

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศหนึ่งที่ยังมีความสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีพันธุ์พืชอยู่เป็นจำนวนมากกว่า 10,000 ชนิด (ราชันย์, 2547) ความหลากหลายของพืชวงศ์ Gesneriaceae ในโลกพบกว่า 3,000 ชนิด เป็นสกุล *Paraboea* ประมาณ 90 ชนิด และมีรายงานพบในประเทศจีนประมาณ 20 ชนิด (Wentsai *et al.*, 1998) จากการสำรวจ รวบรวม และศึกษาทบทวนด้านอนุกรมวิธานพรรณไม้ในประเทศไทยของนักวิชาการเกษตร สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร พบพันธุ์พืชชนิดใหม่ของโลก (new species) คือ *Paraboea doitungensis* Triboun & D.J.Middleton จัดอยู่ในวงศ์ Gesneriaceae พืชชนิดนี้เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี 10-30 ซม. แต่อาจสูงได้ถึง 70 ซม. ลำต้นส่วนล่างมีเนื้อไม้แข็ง ใบเดี่ยว 4-10 คู่ เรียงตรงข้ามสลับตั้งฉากและเรียงชิดกันที่ปลายยอด ก้านมีปีกแคบๆ ใบยาว 6-12 ซม. แผ่นใบเรียว รูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ปลายแหลม โคนรูปลิ้น ใต้ใบปกคลุมด้วยขนสีน้ำตาลอ่อน ช่อดอกเป็นช่อกระจุกสั้น ก้านช่อดอกสีแดงเข้มหรือเขียว ยาว 8-35 ซม. ใบประดับเป็นรูปหัวใจหรือเป็นเส้นตรง ออกดอกเป็นคู่ ก้านดอกย่อยยาว 0.6-1.5 ซม. กลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ กลีบดอกเป็นรูประฆัง สีชมพู โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาว 7-9 มิลลิเมตร และมีสีชมพูซีดแต้มสีเหลืองจางที่ฐาน เกสรเพศผู้ 2 อันติดอยู่ใกล้ฐานภายในหลอดกลีบดอก ก้านชูอับละอองเรณูสีขาวนวลรูปร่างงอ ยาว 7-10 ซม. อับละอองเรณูสีเหลืองนวล เกสรเพศผู้เป็นหมัน 2-3 อัน ลดรูปจนมีขนาดเล็ก รังไข่เป็นรูปกรวยทรงกระบอกสีเขียวยาว 4-6 มม. ยอดเกสรเพศเมียเป็นตุ่มมีขนปกคลุม ผลแห้งแตกเป็นรูปทรงกระบอกแคบ ยาว 5-6.8 ซม.กว้าง 1.8 มม. ออกดอกและติดฝักช่วงเดือน กรกฎาคมถึงพฤศจิกายน (Triboun and Middleton, 2012)

พืชชนิดนี้อาจมีโอกาสนำมาพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพในด้านการแพทย์โดยการทำเป็นยา เนื่องจากมีรายงานของ Batugal (2004) พบว่ามีการใช้ทุกส่วนของต้น *Paraboea elegans* หรือเรียกว่า Capa batu laut ทำเป็นยารักษาอาการปวดประจำเดือน การใช้ *Paraboea harroviana* หรือ อัมหิน (ชาฤๅษีเล็ก) ใช้ทั้งต้นนำมาตำแล้วพอกแก้อาการปวดเมื่อยได้ (วงศ์สถิต, 2553) รวมถึงการพบสาร *Phenylpropanid glycosides* ใหม่ 5 ชนิดใน *Paraboea glutinosa* ซึ่งในประเทศจีใช้พืชชนิดนี้ทำยามีสรรพคุณในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Wang *et al.*, 2011) นอกจากนี้อาจจะเป็นประโยชน์ในด้านเศรษฐกิจ โดยนำมาทำเป็นเครื่องดื่ม เช่นเดียวกับ *Paraboea*

albida (Barnett) Puglisi ที่มีรายงานว่ายอดอ่อนเมื่อตากแห้งสามารถนำไปชงดื่มได้แทนใบชา (กรมวิชาการเกษตร, 2554) นอกจากนี้พืชชนิดนี้ยังเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากเป็นพืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทย ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในบริเวณจำกัดไม่เกิน 100 ตร.กม. และต้องอาศัยปัจจัยแวดล้อมที่มีความเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโต จะพบได้บริเวณยอดเขาหินปูน บริเวณดอยตุง อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,100-1,450 เมตร มักถูกบุกรุกพื้นที่ในบริเวณที่พืชเจริญเติบโต ทำให้จำนวนประชากรที่มีความสมบูรณ์ลดลง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมอย่างกะทันหัน การขาดจิตสำนึกและความเข้าใจในการรักษาทรัพยากรเหล่านี้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการขยายพันธุ์พืชเหล่านี้ มิให้สูญหายไป เพื่อการใช้ประโยชน์เป็นแหล่งทรัพยากรทางชีวภาพในการศึกษาและพัฒนาพันธุ์พืชต่อไป

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช เนื่องจากใช้พื้นที่น้อยในการขยายพันธุ์ และเหมาะกับพืชที่มีคุณลักษณะที่เฉพาะ ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อและปลอดจากภัยธรรมชาติ (Engelmann, 1997) มีการศึกษาการขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน Gloxinia โดยใช้ ใบ ลำต้น และปลายยอด เลี้ยงบนอาหารพบว่าเกิดผลใน 3 ลักษณะได้แก่ การพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากใบโดยใช้ NAA ร่วมกับ BA การเกิด callus จากการใช้ 2,4-D และการชักนำให้เกิดรากโดยใช้ NAA, IAA และ IBA (Wuttisit and Kanchanapoom, 1996) มีรายงานใน *Metabriggsia ovalifolia* พบว่าการชักนำให้เกิดยอดจากใบหรือก้านใบ โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปริมาณน้อย (NAA, IBA และ IAA) ร่วมกับกลุ่มไซโตไคนิน (BA และ TDZ) ในปริมาณมากดีกว่าการใช้สารกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเพียงชนิดเดียว (Ma *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังมีการรวบรวมข้อมูลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ African Violets โดย Jungnickel และ Zaid ในปี 1992 พบว่าสามารถขยายพันธุ์ได้จากชิ้นส่วนหลายชนิด ได้แก่ ใบ ก้านใบ ตา อับละอองเรณู และเมล็ด เป็นต้น ซึ่งจะเหมาะสมกับสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ จึงต้องมีการทำการศึกษาให้เหมาะสมในแต่ละชนิดพืช และชิ้นเนื้อเยื่อที่จะนำมาทำการขยายพันธุ์ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ต้นชาฤๅษีดอยตุง
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และสารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA (Naphthalene acetic acid) กลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA (Benzyladenine)

- วิธีการ

1. สำรวจและรวบรวม ตัวอย่างชาฤๅษีดอยตุง จากแหล่งธรรมชาติ

พบว่าต้นชาฤาษีดอยตุงมีการเจริญเติบโตบนพื้นที่ยอดเขาหินปูน บริเวณดอยตุง อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย ซึ่งมีช่วงฤดูการออกดอกและติดฝักระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน

2. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤาษี โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเผาฝักแบ่งเป็น 3 วิธีการดังนี้

2.1 โดยการนำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดออกเลี้ยงบนอาหาร โดยเพาะใส่อาหารเคาะให้เมล็ดลงบนอาหารให้มีปริมาณเมล็ดต่อขวดใกล้เคียงกัน

2.2 โดยการนำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (จิตราพรรณ, 2536) โดยฝักชาฤาษีดอยตุง 1 ฝักต่อน้ำ 2.5 มล. หลังจากนั้นดูดน้ำออกแล้วเขี่ยเมล็ดเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้

2.3 นำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (H_2O_2) 5 % อัตราส่วน 2:1 (จิตราพรรณ, 2536) โดยฝักชาฤาษีดอยตุง 1 ฝักต่อสารละลาย 2.5 มล. หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเขี่ยเมล็ดเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้

นำมาเพาะบนอาหารสูตร MS โดยทำ 5 ซ้ำ เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียส ชั้นติดตั้งไฟสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความสว่างประมาณ 2,000 ลักซ์ ควบคุมเวลาปิดเปิดไฟกำหนดระยะเวลาการให้ความสว่าง 16 ชั่วโมง และบันทึกจำนวนการปลอดการปนเปื้อนของเชื้อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

3. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อใบ โดยนำชิ้นส่วนที่เตรียมไว้มาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างน้ำประปาแบบไหลผ่านให้สะอาด จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 % นาน 5, 10, 15 และ 20 นาที วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in completely randomized design; CRD) แล้วนำใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อตัดให้มีขนาด 1 × 1 ตร.ซม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS จำนวน 4 ซ้ำ และบันทึกจำนวนการปลอดการปนเปื้อนของเชื้อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ของต้นชาฤาษีดอยตุง

เลือกต้นกล้าชาฤาษีดอยตุงจากการฟอกฆ่าเชื้อที่มีขนาดเท่ากันมาศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ในขวดขนาด 115 มล.

4.1 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของต้นชาฤาษีดอยตุง โดยเลือกใบระยะและขนาดเดียวกันตัดให้มีขนาด 1 × 1 ตร.ซม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in completely randomized design; CRD) จำนวน 6 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนยอดที่สมบูรณ์ และขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P \leq 0.05$)

4.2 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินต่อการเจริญเติบโตของต้นชาฤๅษีดอยตุง โดยนำยอดสมบูรณ์ความสูง 4 ข้อ เลี้ยงบนอาหารลดปริมาณ MS ได้แก่ ½ MS และ MS ร่วมกับการเติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 5 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนยอดที่สมบูรณ์ และขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P \leq 0.05$)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง	เริ่มตั้งแต่ ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558
สถานที่ดำเนินการ	ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

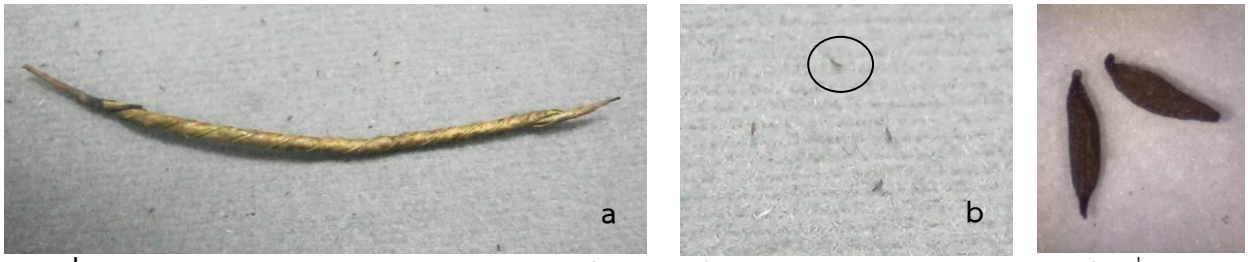
1. สำรวจและรวบรวม ตัวอย่างชาฤๅษีดอยตุง จากแหล่งธรรมชาติ

ชาฤๅษีดอยตุงเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นส่วนล่างมีเนื้อไม้แข็ง ใบเรียงตรงข้ามสลับตั้งฉากและเรียงชิดกันที่ปลายยอด ก้านมีปีกแคบๆ แผ่นใบเรียว รูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ปลายแหลม โคนรูปลิ่น ใต้ใบปกคลุมด้วยขนสีน้ำตาลอ่อน ช่อดอกเป็นช่อกระจุกสั้น ผลแห้งแตก ต้นชาฤๅษีดอยตุงพบบนยอดเขาหินปูน อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย ต้นมักขึ้นตามซอกของหินปูน เนื่องจากเป็นไม้ล้มลุกเมื่อถึงอายุออกดอกติดฝักต้น

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นชาฤๅษีดอยตุงในสภาพธรรมชาติ ขึ้นตามซอกหิน (a) ลักษณะต้นที่ติดฝัก (b) และลักษณะของช่อฝัก (c)

2. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤๅษีดอยตุง

ฝักของพืชสกุลชาฤๅษีดอยตุงเป็นฝักแห้งแตกรูปทรงกระบอกแคบ ยาว 5-6.8 ซม. กว้าง 1.8 มม. มีลักษณะบิดเป็นเกลียว ภายในฝักประกอบด้วยเมล็ดจำนวนมาก และเมล็ดมีขนาดเล็กเป็นผง (Triboun and Middleton, 2012) ขั้นตอนการล้างฝักด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาดนั้น ต้องระวังไม่ให้ฝักแตก และไม่ควรแช่น้ำอยู่นาน เพราะจะทำให้เมล็ดภายในได้รับความเสียหาย เนื่องจากน้ำซึมผ่านเข้าภายในฝัก ทำให้เมล็ดชื้นและติดกันเป็นก้อน ดังนั้นวิธีการฟอกด้วยคลอร็อกซ์เป็นวิธีที่เสี่ยงต่อการทำให้เมล็ดได้รับความเสียหาย



ภาพที่ 2 ลักษณะของฝักของชาฤๅษีดอยตุง (a) เมล็ดขนาดเล็กภายในฝัก (b) และ ลักษณะเมล็ดเมื่อใช้กล้องกำลังขยาย 4x (c)

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 1) พบว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤๅษีดอยตุง คือการจุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (H_2O_2) 5 % อัตราส่วน 2:1 หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเขี่ยเมล็ดเพาะบนอาหารสูตร MS ซึ่งวิธีการฟอกเมล็ดด้วยการใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ถือได้ว่าเป็นการฟอกฆ่าเชื้อวิธีหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดพันธุ์ เช่น เมล็ดต้น *Aconitum heterophyllum* (Srivastava *et al*., 2010) และเมล็ดกล้วยไม้ (จิตราพรรณ, 2536) แต่การฟอกฆ่าเชื้อฝักนครินทรา แม้จะเป็นพืชวงศ์เดียวกันจะใช้เพียงการผ่านไฟฆ่าเชื้อแล้วบิดฝักให้แตกและเคาะเอาเมล็ดออกเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสม (พัชร และคณะ, 2555) อาจเนื่องจากลักษณะของฝักชาฤๅษีดอยตุงเป็นรูปทรงกระบอกแคบเมื่อได้รับความร้อนทำให้ฝักปริแตกหรือได้รับความเสียหายได้ง่ายกว่าฝักนครินทราซึ่งเป็นทรงกระบอกกว้างทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อง่ายกว่าฝักนครินทรา โดยเมื่อเพาะเมล็ดบนอาหาร MS นานประมาณ 1 เดือนเมล็ดจะเริ่มงอก

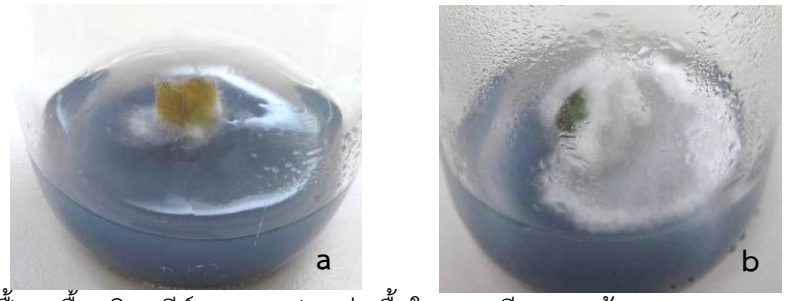
ตารางที่ 1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤๅษีดอยตุง

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝัก	**จำนวนการปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ** (%)
เผาฝัก	0
เผาฝัก + น้ำ (H_2O)	0
เผาฝัก + สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (H_2O_2) อัตราส่วน 2:1	50

ภาพที่ 3 ลักษณะของเมล็ดที่เพาะบนอาหาร MS (a) ต้นอ่อนชาฤษีดอยตุงเมื่อเพาะเมล็ดบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 เดือน (b) และ 2 เดือน (c)

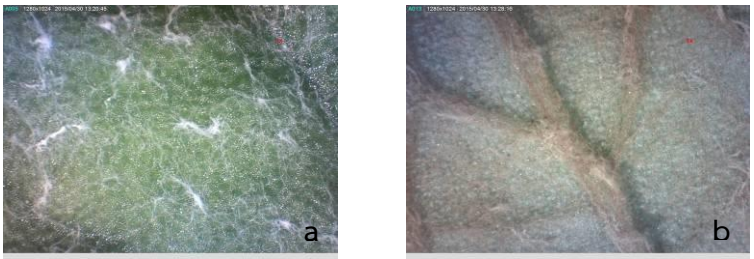
3. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อใบชาฤษีดอยตุง

จากผลการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อใบชาฤษีดอยตุงด้วยคลอร็อกซ์ที่แปรผันความเข้มและเวลา พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเชื้อราที่พบมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวปนดำ เกิดจากบริเวณที่เป็นรอยตัดของเนื้อเยื่อใบก่อน



ภาพที่ 4 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากการฟอกฆ่าเชื้อใบชาฤษีดอยตุงด้วย Clorox ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ (a และ b)

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบจากการทดลอง เนื่องจากใบของชาฤษีดอยตุงมีการปกคลุมด้วยขนทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยพื้นใบด้านบนเป็นสีเขียวเรียบปกคลุมด้วยขนสีขาวคล้ายใยแมงมุง ส่วนใบด้านล่างปกคลุมด้วยขนสีน้ำตาลอ่อนยาวนุ่มและหนาทอดราบกับพื้นคล้ายขนแกะ (Triboun and Middleton, 2012) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะเพิ่มความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งทำให้การทำความสะอาดและการฟอกฆ่าเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น โดยมีงานวิจัยการฟอกฆ่าเชื้อในพืชวงศ์ชาฤษี โดยใช้สารละลาย Clorox ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ ผลการทดลองยังพบการป่นเปื้อนของเชื้อ 100% (ธีรภัทร ศรีรัตนโชติ, มมป.) และมีรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการการขยายพันธุ์พืชวงศ์ชาฤษี ซึ่งมีการศึกษาพืชสกุลต่างๆ ของวงศ์ชาฤษีมาเพราะลี้ยงเนื้อเยื่อ พบเพียงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Aeschynanthus* หรือ สกุลไก่แดง ที่สามารถฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบและทำให้ได้ต้นพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อได้ (ปราณี นางงาม และคณะ, 2555)



ภาพที่ 5 ลักษณะขนบนใบ (a) และขนใต้ใบ (b) เมื่อใช้กล้องกำลังขยาย 1x

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ของต้นชาฤๅษีดอยตุง

หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤๅษีดอยตุงและเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหาร MS เลือกต้นกล้าชาฤๅษีดอยตุงที่ได้จากการเพาะบนอาหารที่มีขนาดเท่ากันมาศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์

4.1 การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) ร่วมกับกลุ่มไซโตไคนิน (BA) โดยเลือกใบระยะและขนาดเดียวกันตัดให้มีขนาด 1 × 1 ตร.ซม.

จากการทดลองพบว่า เริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อเลี้ยงบนอาหารนาน 1 เดือน พบการพัฒนาของกระจุกเนื้อเยื่อบนแผ่นใบ ลักษณะคล้ายยอดที่มีใบเล็กๆ จำนวนมาก โดยตำแหน่งที่เกิดการพัฒนามักเกิดบริเวณรอยตัดด้านก้านของใบ (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 กระจุกเนื้อเยื่อบนแผ่นใบที่เลี้ยงบนอาหาร MS เติม NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงนาน 1 เดือน

จากการทดลองพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างสาร NAA และ BA (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3) โดยเมื่อเลี้ยงใบของชาฤๅษีดอยตุงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีการแตกยอดเล็กปริมาณมากเกิดเป็นกลุ่มยอดที่ไม่แข็งแรงและมีการพัฒนาเป็นยอดสมบูรณ์ต่ำกว่าที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งเนื้อเยื่อต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงจะสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี แม้จะเพิ่มปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งกลุ่มออกซิน (NAA) และ ไซโตไคนิน (BA) เกินกว่าที่ต้องการก็ไม่ช่วยให้ยอดมีความสมบูรณ์แข็งแรงขึ้น

ตารางที่ 2 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA และ BA ต่อการเกิดยอดที่สมบูรณ์และความสูงของยอดที่สมบูรณ์ เมื่อใช้ใบของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 6 เดือน

NAA (mg/l)	**จำนวนยอดที่สมบูรณ์ (ยอด)**					**ความสูงของยอดที่สมบูรณ์ (cm)**				
	BA (mg/l)				mean	BA (mg/l)				mean
	0	0.1	0.5	1		0	0.1	0.5	1	
0	0.82 ab y	2.30 a x	2.00 a x	2.11 a x	1.81	0.90 b y	2.22 a x	2.45 a x	2.28 a x	1.96
0.1	2.48 a x	1.73 ab x	1.14 bc x	0.45 c y	1.45	2.05 a x	1.98 a x	2.17 a x	1.22 b x	1.85
0.5	1.42 ab y	1.70 a x	1.81 a x	0.45 b y	1.34	1.17 b y	1.62 a xy	2.10 a x	0.97 b y	1.46
1	0.42 ab y	1.53 a x	1.20 ab x	0.25 b y	0.86	0.60 b y	1.67 a x	1.55 ab x	1.15 b xy	1.24
mean	1.29	1.81	1.54	0.81		1.18	1.87	2.07	1.40	
CV (%)	32.43					35.2				

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้อักษร a, b, c
- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (NAA) ใช้อักษร x, y, z

ตารางที่ 3 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA และ BA ต่อขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อของต้นชาฤๅษีดอยตุง เมื่อใช้ใบของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 6 เดือน

NAA (mg/l)	**ขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อ (cm)**				
	BA (mg/l)				mean
	0	0.1	0.5	1	
0	2.63 a y	1.73 b x	2.82 a x	2.78 a x	2.49
0.1	3.42 a x	1.88 b x	1.80 b y	1.42 b y	2.13
0.5	1.85 a z	1.85 a x	2.18 a xy	1.67 a y	1.89
1	1.35 a z	1.88 a x	1.83 a y	1.27 ay	1.58
mean	2.31	1.84	2.16	1.78	
CV (%)		32.4			

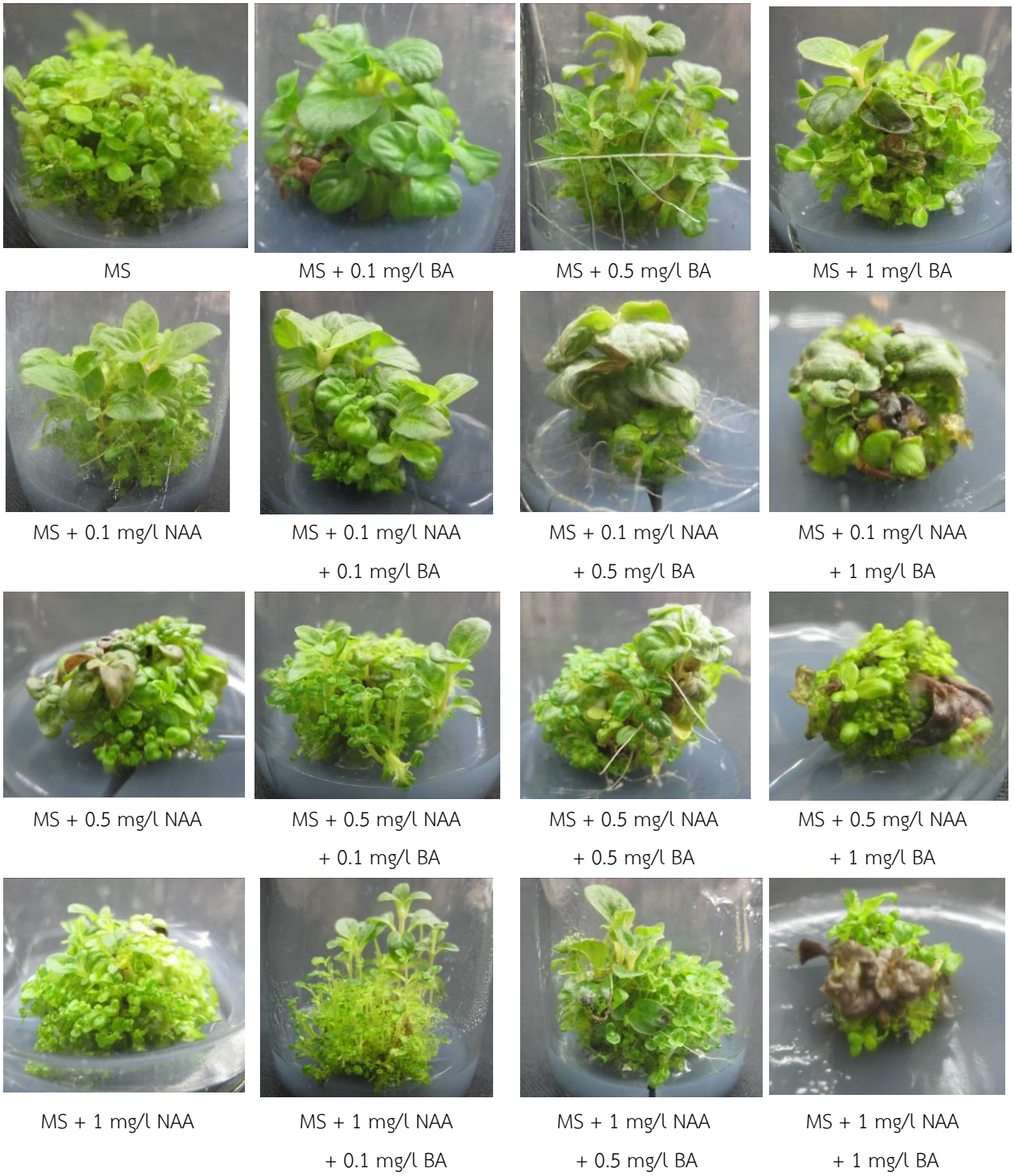
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้อักษร a, b, c
- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (NAA) ใช้อักษร x, y, z

โดยเมื่อเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวเกิดยอดขนาดใหญ่ที่สมบูรณ์สูงสุด 2.48 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติมสาร BA เพียงอย่างเดียว ส่วนขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อต้นชาฤๅษีดอยตุงพบว่าเมื่อเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวเกิดการขยายของกลุ่มเนื้อเยื่อสูงสุด 3.42 ซม. และไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติมสาร BA เพียงอย่างเดียว แต่พบว่าต้นชาฤๅษีดอยตุงที่ได้รับ NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการขยายของเนื้อเยื่อและการเกิดยอดที่สมบูรณ์ลดลง ซึ่งมีรายงานการศึกษาการขยายพันธุ์แอฟริกันไวโอเล็ตและกล็อกซิเนียอยู่จำนวนมาก พืชดังกล่าวเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับชาฤๅษี โดยใช้ก้านใบแอฟริกันไวโอเล็ตเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเพียง 0.01 มก./ล. เพื่อชักนำการเกิดต้น ได้ดีกว่าการใช้ BA ความเข้มข้นสูงๆ (Bilkey *et al*., 1978) แต่บางรายงานว่าควรเติม BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว หรือ NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ช่วยชักนำการเกิดยอด (Sunpui and Kanchanapoom, 2002) ส่วนการชักนำการเกิดยอดโดยใช้ใบของกล็อกซิเนียพบว่า BA มีผลในการชักนำตายอดมากกว่า NAA แต่จะไม่มีการพัฒนาและเจริญเติบโตของตายอดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้นสูงจะเกิดยอดลดลงและมีลักษณะเป็นต้นขนาดเล็กใบเล็กเกิดเป็นกระจุกของยอด (Wuttisit and Kanchanapoom, 1996) Rout *et al*. (2006) ได้สรุปรายงานการทดลองเกี่ยวกับการพัฒนาเนื้อเยื่อของแอฟริกันไวโอเล็ต โดยพบว่าการพัฒนายอดโดยตรงจากผิวหน้าโดยไม่ผ่าน callus ให้เลี้ยงใบบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. แต่ถ้าจะพัฒนาเนื้อเยื่อจาก callus ของใบให้เลี้ยงบน อาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.2 มก./ล.

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการชักนำการเกิดยอดเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของแอฟริกันไวโอเล็ตบนอาหาร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA พบว่า ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งผลในการพัฒนาเป็นโครงสร้างตายอด

หรือโครงสร้างตาดอก โดยโครงสร้างดอกทั้งหมดเกิดจาก Somatic cell อัตราส่วนของทั้งออกซินและไซโตไคนินส่งผลต่อกระบวนการพัฒนาดอก เมื่อให้ความเข้มข้นของ NAA มากกว่า 1.5 มก./ล. ทำให้แคลลัสของแอฟริกันไวโอเล็ตพัฒนาเป็นตาดอกมากกว่าตายอด (Daud and Taha, 2008) และพบว่า NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเป็นยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Khan *et al*., 2007)



ภาพที่ 5 ลักษณะของกลุ่มเนื้อเยื่อเมื่อใช้ใบของต้นชาฤๅษีดอยตุงเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ NAA และ BA เป็นเวลา 6 เดือน

4.2 การปรับลดปริมาณ MS ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) โดยเลือกใช้ยอดสมบูรณ์ตัดให้สูง 4 ข้อ

การทดลอง (ตารางที่ 4 และภาพที่ 6) พบว่าระดับความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเกิดรากและไม่พบปฏิสัมพันธ์ของการปรับลดปริมาณ MS กับระดับความเข้มข้นของ NAA ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองที่ทราบโดยทั่วไปว่าการชักนำการเกิดรากจะถูกกระตุ้นโดยความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ซึ่งมีรายงานในกล็อกซิเนียเมื่อเลี้ยงยอดบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA, IAA และ IBA) พบว่าจำนวนรากถูกกระตุ้นเมื่อเพิ่มออกซินความเข้มข้น 3.0 มก./ล. แต่จะลดลงเมื่อความเข้มข้น 5.0 มก./ล. (Wuttisit and Kanchanapoom, 1996) และรายงานในแอฟริกันไวโอเล็ตเมื่อเลี้ยงยอดบนอาหาร ½ MS ที่เติมสาร IAA ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. กระตุ้นการชักนำการเกิดรากได้ดี (Ghorbanzade and Ahmadabadi, 2014)

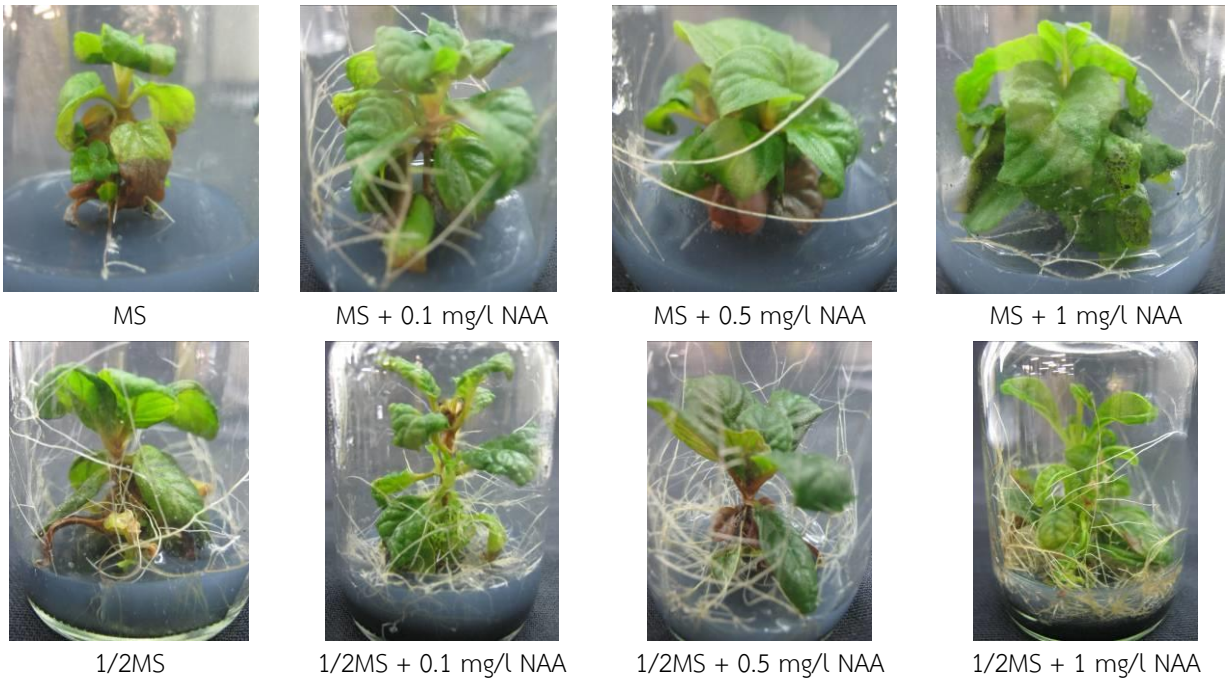
แต่พบว่าการปรับลดปริมาณ MS ส่งผลต่อการเกิดรากของยอดชาฤๅษีดอยตุง โดยเมื่อลดปริมาณ MS เป็น ½ MS สามารถชักนำการเกิดรากของยอดชาฤๅษีดอยตุงได้ดีกว่าเลี้ยงบนอาหาร MS และชักนำได้จำนวน 7.29 ราก ยาวประมาณ 6.6 ซม. เช่นเดียวกับการทดลองการกระตุ้นรากโดยเลี้ยงบนอาหาร ½ MS หรือการเลี้ยงบนอาหาร WPM ในพืช *Camptotheca acuminate* ซึ่งมีลักษณะเป็นพืชมีเนื้อไม้และยืนต้น (Huimei *et al.*, 2007) ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีส่วนคล้ายกับต้นชาฤๅษีดอยตุงเนื่องจากต้นชาฤๅษีดอยตุงมีลักษณะลำต้นส่วนล่างที่เป็นเนื้อไม้แข็ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการชักนำรากในแอฟริกันไวโอเล็ต ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับชาฤๅษี พบว่าสามารถชักนำรากโดยใช้ชิ้นส่วนยอดเลี้ยงบนอาหาร ½ MS และสามารถย้ายปลูกในโรงเรือนได้สำเร็จ (Sunpui and Kanchanapoom, 2002; Rout *et al*., 2006)

ตารางที่ 4 ผลของการปรับลดปริมาณ MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA ต่อการเกิดรากและความยาวของราก เมื่อใช้ยอดของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 3 เดือน

NAA (mg/l)	**จำนวนราก (ราก)**			**ความยาวของราก (cm)**		
	MS		mean	MS		mean
	MS	½ MS		MS	½ MS	
0	0.59	6.98	3.78	2.00	10.84	6.42
0.1	1.44	6.54	3.99	2.70	4.14	3.42
0.5	0.90	8.26	4.58	2.36	5.84	4.10
1	1.2	7.38	4.29	4.32	5.64	4.98
mean	1.03 b	7.29 a		2.845 b	6.615 a	
CV (%)	29.98			32.1		

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

- ความแตกต่างระหว่างการปรับลดปริมาณ MS ใช้อักษร a, b, c



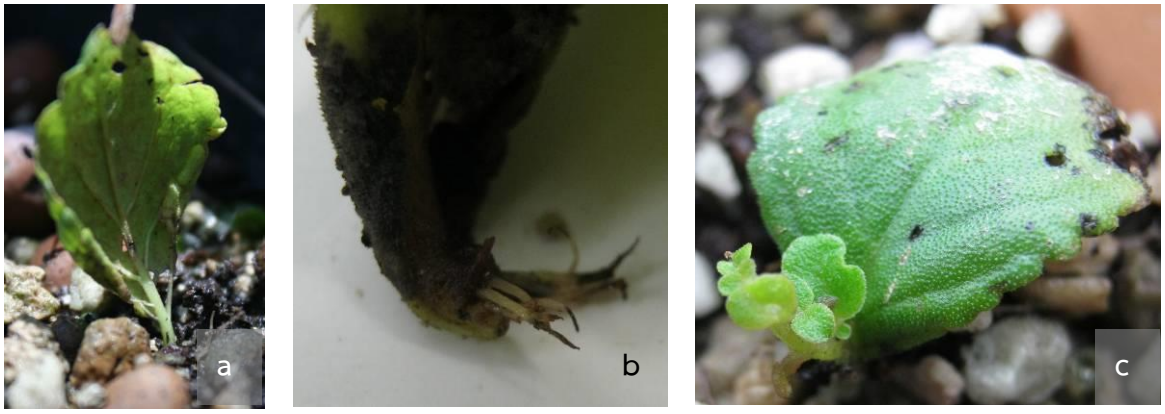
ภาพที่ 6 ลักษณะของกลุ่มเนื้อเยื่อเมื่อใช้รากของต้นชาฤๅษีดอยตุงเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ NAA เป็นเวลา 3 เดือน

5. ศึกษาลักษณะของต้นชาฤๅษีดอยตุงที่เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือน

การเพาะเมล็ดชาฤๅษีดอยตุงโดยใช้วัสดุปลูก พีทมอส (peat moss) : หินอัคนีพุ (pumice stone) : หินเพอร์ไลต์ (perlite stone) : เม็ดดินเผา (popper) อัตราส่วน 3:1:1:1 ต้นอ่อนเริ่มงอกเมื่อเพาะนาน 1 เดือน และเริ่มเห็นการปกคลุมด้วยขนบนแผ่นใบเมื่ออายุ 4 เดือน (ภาพที่ 8) บางต้นไม่สามารถเติบโตต่อไปได้ในเรือนเพาะชำ และบางต้นเมื่อเลี้ยงถึงอายุประมาณ 1 ปี ต้นจะเหี่ยวและทรุดอาจเนื่องจากพืชชนิดนี้มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก (Triboun and Middleton, 2012) ซึ่งมีรายงานของ ปราณี นางงาม และคณะ (2555) ศึกษาการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดในพืชวงศ์ชาฤๅษี 4 สกุล 7 ชนิด ได้แก่ *Didymocarpus dongrakensis* B.L. Burtt, *D. biserratus* Barnett, *D. kerrii* Craib, *Ornithoboea arachnoidea* (Diels) Craib, *O. flexuosa* (Ridl.) B.L. Burtt, *Rhynchoglossum obliquum* Bleme และ *Chirita micromusa* B.L. Burtt พบการงอกของเมล็ดเป็นต้นอ่อนได้ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในเรือนเพาะชำ เนื่องจากลักษณะลำต้นเล็กเรียวและตายในที่สุด

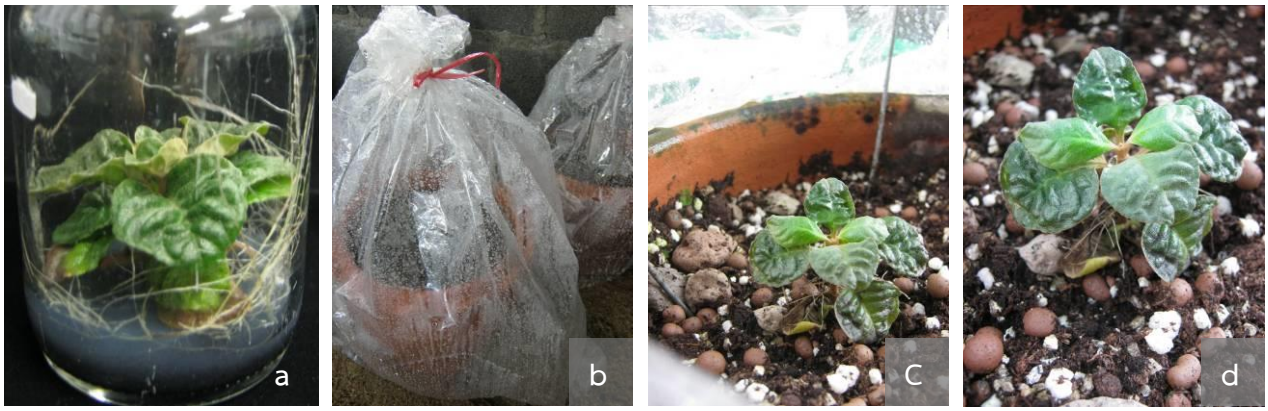
ภาพที่ 8 ลักษณะต้นของต้นชาฤๅษีที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือน เมื่อเพาะนาน 1 เดือน (a) 4 เดือน (b) และ 10 เดือน (c)

จากการสังเกตต้นชาฤษีดอยตุงในโรงเรืองอนุบาลเชื้อพันธุ์พบว่าชาฤษีดอยตุงสามารถขยายพันธุ์ด้วยใบได้ โดยเมื่อคว่ำไปและกลบดินบนแผ่นใบที่ติดกับก้านใบพบการเกิดรากบริเวณก้านใบที่ติดกับแผ่นใบเมื่อทิ้งไว้นาน 1 เดือน และสังเกตเห็นต้นอ่อนเมื่อเลี้ยงนาน 3 เดือน



ภาพที่ 9 ใบชาฤษีดอยตุงที่เลี้ยงในสภาพโรงเรือนเกิดรากบริเวณก้านใบที่ติดกับแผ่นใบ (a และ b) อายุประมาณ 1 เดือน ต้นอ่อนชาฤษีดอยตุงที่ได้ขยายพันธุ์ด้วยใบ เมื่อเลี้ยงนาน 3 เดือน (c)

สำหรับการย้ายปลูกต้นชาฤษีดอยตุงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวิธีการดัดแปลงจาก มณฑา และคณะ (2553) จะเลือกใช้ต้นที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงและมีรากจำนวนมาก โดยต้องมีการปรับสภาพก่อนการย้ายอนุบาล โดยการนำออกจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ต้นชาฤษีเคยชิน และคลายฝาขวดเพื่อลดความชื้นสัมพัทธ์ในขวดและมีการถ่ายเทอากาศมากขึ้น ประมาณ 5-7 วัน หลังจากนั้น ล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด จุ่มยากันเชื้อรา แล้ววางพักบนตะกร้าให้แห้งเล็กน้อย แล้วปลูกโดยใช้วัสดุปลูก พีทมอส (peat moss) : หินอัคนีพุ (pumice stone) : หินเพอร์ไลต์ (perlite stone) : เม็ดดินเผา (popper) อัตราส่วน 3:1:1:1 นำต้นที่ปลูกลงในกระถางคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นโดยระวังไม่ให้ใบโดนถุง ว่างไว้ในที่ร่ม นานประมาณ 1-2 เดือน ค่อยๆ ปรับความชื้นโดยค่อยๆ เปิดปากถุง แต่ยังพบอัตราการรอดชีวิตต่ำ เนื่องจากเกิดการเหี่ยวของต้นชาฤษีดอยตุง



ภาพที่ 10 ต้นชาฤษีดอยตุงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปรับสภาพสำหรับเตรียมย้ายมาอนุบาลในโรงเรือน (a) สภาพการเพาะเลี้ยงต้นในโรงเรือง (b) ต้นที่ย้ายมาปลูกในโรงเรือนนาน 3 เดือน (c และ d)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเผาฝักชาฤๅษีดอยตุงทำได้โดยการนำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วผ่านไฟฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (H_2O_2) 5 % อัตราส่วน 2:1 หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเขี่ยเมล็ดเพาะบนอาหารสูตร MS
2. การขยายพันธุ์ชาฤๅษีดอยตุงมีการแตกยอดจำนวนมากเมื่อเพาะใบบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ยอดที่ได้มีปริมาณมากเกิดเป็นกลุ่มยอดแต่ไม่แข็งแรง
3. การขยายพันธุ์โดยการการชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จากใบชาฤๅษีดอยตุงใช้สูตรอาหาร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. หรือการเติม BA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวทำให้ได้ยอดที่สมบูรณ์กว่าการใช้ฮอร์โมน 2 ชนิดร่วมกัน
4. สามารถชักนำการเกิดรากจากยอดของต้นชาฤๅษีดอยตุงได้ด้วยการเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนชาฤๅษีดอยตุง โดยใช้ฝักเพื่อใช้เป็นแนวทางในการฟอกฆ่าเชื้อพืชชนิดอื่นในสกุลนี้ต่อไป
2. ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ต้นชาฤๅษีดอยตุงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อใช้เป็นแนวทางในขยายพันธุ์พืชในสกุลเดียวกันต่อไป
3. สามารถนำข้อมูลที่ได้จัดทำเอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ

11. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ ผู้ค้นพบต้นชาฤๅษีดอยตุง เป็นอย่างยิ่งที่ให้การสนับสนุนเรื่องข้อมูลและคำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับพืชชนิดนี้ ตลอดจนขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงานจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2554. *พรรณไม้พื้นเมืองไทย* : จากเขาใหญ่สู่ลำน้ำโขง. กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช, กองคุ้มครองพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. 182 น.

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. *การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้*. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 82 หน้า.

ปราณี นางงาม, อนุพันธ์ กงบังเกิด และจรัส ช่วยนะ. 2555. *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการการขยายพันธุ์พืชวงศ์ชาฤาษี (Gesneriaceae)*. กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร. สืบค้นจาก: http://doi.nrct.go.th/?page=resolve_doi&resolve_doi=10.14457/NU.res.2012.1 [8 ม.ค. 58]

ธีรภัทร ศรีรัตนโชติ, อนุพันธ์ กงบังเกิด และปราณี นางงาม. มมป. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงพืชวงศ์ชาฤๅษี ของประเทศไทย ในสภาพปลอดเชื้อ. ปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. *สืบค้นจาก*: http://www.scimath.org/project/search [8 ม.ค. 59]

มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รงรอง หอมหวน, สุลักษณ์ แจ่มจำรัส และ กมลศรี สระทองพรม. 2553. เทคนิคการย้ายปลูกต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. งานครบรอบ 30 ปี ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง "สามทศวรรษเซ็นทรัลแล็บ กับการบริการชุมชน". หน่วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช งานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเกษตร ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลองสถาบันวิจัยและพัฒนากำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

ราชันย์ ภู่มา. 2547. การสำรวจพันธุ์พืชเฉพาะถิ่นหายากใกล้จะสูญพันธุ์ในพื้นที่อนุรักษ์ทั่วประเทศ. *มติชน* 27 (9558): 7

พัชร ปิริยะวินิตร, พัฒน์นรี รักษ์คิด, ปราโมทย์ ไตรบุญ และ ปาริฉัตร สังข์สะอาด. 2555. ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์นครินทรา (*Trisepalum sangwaniae*) พืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทยในสภาพปลอดเชื้อ. *ประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย ครั้งที่ 2*: 395-400.

วงศ์สถิต ฉั่วกุล. 2553. สมุนไพรพื้นบ้านแก้ปวดเมื่อย. *ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ* 5(1): 1-13.

Batugal, P.A., Kanniah, J., Lee, S.Y. and J.T. Oliver. 2004. *Medicinal Plants Research in Asia, Volume 1*. The Framework and Project Workplans. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Malaysia

Bilkey, P.C., B.H. McCown and A.C. Hildebrandt. 1978. Micropropagation of african violet from petiole cross-sections. *HortScience* 13(1): 37-38.

Daud, N. and R.M. Taha. 2008. Plant regeneration and floral bud formation from intact floral parts of African violet (*Saintapaulia ionantha* H. Wendl.) cultured *in vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(7): 1055-1058.

Engelmann F. 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. *Acta Hort*. 447: 471-475

Ghorbanzade, Z. and M. Ahmadabadi. 2014. An improved system for rapid *in vitro* regeneration of *Saintpaulia ionantha*. *Plant Tissue Cult. & Biotech*. 24(1): 37-45.

Huimei, W., Z. Yuangang and L. Hongmei. 2007. Efficient rooting and root development after transfer of regenerated plantlets of *Comptotheca acuminate*. *Eurasian J. For. Res*. 10-2: 179-184.

Khan, S., Naseeb, S. and K. Ali. 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimatization of African violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. *Pak. J. Bot*. 39(4) : 1263-1268.

Ma, G., A. Jaima., T. da SilvaJ. Lü , X. Zhang and J. Zhao. 2010. Shoot organogenesis and plant regeneration in *Metabriggsia ovalifolia. Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* doi: 10.1007/s11240-010-9875-5.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-496.

Rout, G.R., A. Mohapatra and S. Mohan Jain. 2006. Tissue future of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.

Srivastava, N., B. Kamal, V. Sharama, Y.K. Negi, A.K. Dovriyal, S. Gupta and V.S. Jadon. 2010. Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum hererophyllum* - An endangered medicinal herb. *Academic Arena* 2(6): 62-66.

Sunpui, W. and K. Kanchanapoom. 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 24(3): 358-364.

Triboun, P. and D.J. Middleton. 2012. Twenty new species of *Paraboea* (Gesneriaceae) from Thailand. *Gardens' Bulletin Singapore* 64(2): 333-370.

Wang, X., Li, L., Bai. Z., Peng, Y., Xiao, P. and Y. Liu. 2011. Five new phenylpropanoid glycosides from *Paraboea glutinosa* (Gesneriaceae). *J Nat Med*. 65: 301-306.

Wentsai, W., P. Kaiyu, L. Zhenyu, A.L. Weitzman and L.E. Skog. 1998. Gesneriaceae. *Flora of China* 18: 244-401.

Wuttisit, M. and K. Kanchanapoom. 1996. Tissue culture propagation of Gloxinia. *Suranaree J. Sci. Technol*. 3: 63-67.

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดเมื่อใช้ใบของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA และ BA เป็นเวลานาน 6 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Arcsine(Sqr(X/100)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	15	417.878352	27.858557	3.27 **
NAA (A)	3	88.762809	29.587603	3.47 *
BA (B)	3	120.205986	40.068662	4.70 **
A×B	9	208.909557	23.212173	2.72 **
ERROR	80	682.596169	8.532452	
TOTAL	95	1100.474520		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$; * = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.05}$

ตารางภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดของความสูงของยอดที่สมบูรณ์เมื่อใช้ใบของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA และ BA เป็นเวลานาน 6 เดือน

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	15	29.46739583	1.96449306	5.97 **
NAA (A)	3	8.15197917	2.71732639	8.25 **
BA (B)	3	12.07031250	4.02343750	12.22 **
A×B	9	9.24510417	1.02723380	3.12 **
ERROR	80	26.33500000	0.32918750	
TOTAL	95	55.80239583		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$

ตารางภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อเมื่อใช้ใบของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA และ BA เป็นเวลานาน 6 เดือน

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	15	32.01958333	2.13463889	4.96 **
NAA (A)	3	10.62208333	3.54069444	8.23 **
BA (B)	3	4.65541667	1.55180556	3.61 *
A×B	9	16.74208333	1.86023148	4.32 **
ERROR	80	34.41000000	0.43012500	
TOTAL	95	66.42958333		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$; * = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.05}$

ตารางภาคผนวกที่ 6 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากเมื่อใช้ยอดของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนสูตรอาหารปรับลดปริมาณ MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA เป็นเวลานาน 3 เดือน

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	7	912.153295	130.307614	3.48 **
AUX (A)	3	33.258877	11.086292	<1 ns
MS (B)	1	792.964426	792.964426	21.17 **
AxB	3	85.929993	28.643331	<1 ns
ERROR	32	1198.718508	37.459953	
TOTAL	39	2110.871803		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 7 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวรากเมื่อใช้ยอดของต้นชาฤๅษีดอยตุงเลี้ยงบนสูตรอาหารปรับลดปริมาณ MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA เป็นเวลานาน 3 เดือน

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	7	285.4960000	40.7851429	2.70 *
AUX (A)	3	50.3160000	16.7720000	1.11 ns
MS (B)	1	142.1290000	142.1290000	9.42 **
AxB	3	93.0510000	31.0170000	2.06 ns
ERROR	32	482.6880000	15.0840000	
TOTAL	39	768.1840000		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$; * = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.05}$, ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ