รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2556

1. ชุดโครงการวิจัย

2. โครงการวิจัย โครงการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (โครงเดี่ยว)

3. ชื่อการทดลอง ศึกษาเทคนิคการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมชมพูสิริน (*Impatiens sirindhorniae*) และไอยริศ (*Zingiber sirindhorniae*) ในสภาพปลอดเชื้อ

Study on *in vitro* Conservation Technique of *Impatiens sirindhorniae* and *Zingiber sirindhorniae*

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	พัฒน์นรี รักษ์คิด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	พัชร ปิริยะวินิตร[1], ปาริฉัตร สังข์สะอาด[1], ปราโมทย์ ไตรบุญ[2], ปัณฑารีย์ กาญจนวัฒนาวงศ์[1]	

5. บทคัดย่อ

ชมพูสิรินและไอยริศเป็นพืชชนิดใหม่ของโลก ได้รับพระราชทานนามจากสมเด็จพระเทพฯ ในการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ ซึ่งพืชทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นพืชเฉพาะถิ่นและพืชหายาก จึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณและอนุรักษ์พันธุกรรมพืชทั้งสองชนิด งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มปริมาณต้นชมพูสิรินและไอยริศในสภาพปลอดเชื้อและทำการเพาะเลี้ยงไอยริศบนอาหารสำหรับชะลอการเจริญเติบโต โดยทดลองแปรผันปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลซูโครส พบว่าต้นชมพูสิรินสร้างจำนวนยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 5.9 ยอด/ข้อ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. โดยที่การเติมสาร NAA กับไม่เติมให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกัน ส่วนต้นไอยริศสร้างจำนวนยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 9 ยอด/หน่อ เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ IAA 2 มก./ล. และสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของไอยริศ คือ 1/4 MS และ 1/8 MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล. ซึ่งให้อัตราการมีชีวิตรอดเท่ากันเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน โดยไม่ต้องทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

[2]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ABSTRACT

Impatiens sirindhorniae and *Zingiber sirindhorniae*, two new species whose names were given by Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, are classified as rare and endemic species of Thailand. Therefore, this research tried to apply tissue culture techniques to multiply and conserve the two species. *In vitro* multiplication of *I. sirindhorniae* and multiplication and growth minimization of *Z. sirindhorniae* was studied using various concentrations of factors such as plant growth regulators (auxin and cytokinin), media and sucrose. The results indicated that the highest shoot number of *I. sirindhorniae* (5.9 shoots per explant) was obtained from MS basal medium supplemented with 3 mg/L BA and 1 mg/L NAA but no difference found between NAA added and non-NAA media. Shoot multiplication of *Z. sirindhorniae* showed the highest shoot number (9 shoots per explant) in MS basal medium contained 5 ml/L BA and 2 mg/L IAA. 1/4 MS and 1/8 MS, both contained 15 g/L of sucrose, were found as suitable media for *in vitro* growth minimization of *Z. sirindhorniae* as they gave the same survived rate after 12 months of culture without subculturing.

6. คำนำ

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศหนึ่งที่ยังมีความสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีพันธุ์พืชอยู่เป็นจำนวนมากกว่า 10,000 ชนิด (ราชันย์, 2547) เนื่องจากตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นจึงเป็นที่อยู่อาศัยของพืชหลายชนิด บางชนิดเป็นพืชเฉพาะถิ่นหายาก และใกล้สูญพันธุ์ พืชเฉพาะถิ่นเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในบริเวณจำกัดโดยต้องการปัจจัยแวดล้อมที่เฉพาะสำหรับการเจริญเติบโตต่อพืชนั้นๆ (ธวัชชัย, 2547) พืชเหล่านี้อาจมีโอกาสซึ่งพืชเหล่านี้มักถูกคุกคามถิ่นกำเนิดและลักลอบนำออกจากป่า หรือจากภัยธรรมชาติจนไม่สามารถแพร่กระจายในธรรมชาติได้ทัน ทำให้มีประชากรของพืชพันธุ์เหล่านี้ลดน้อยลงอย่างรวดเร็วและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งพืชเหล่านี้อาจมีโอกาสที่จะนำมาพัฒนาเพิ่มศักยภาพ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไปในอนาคต เป็นที่ทราบกันดีว่ามีพืชหลายชนิดที่อยู่ในประเทศไทยแต่ไม่ทราบถึงประโยชน์และสรรพคุณทำให้ประเทศอื่นๆ ที่มีอำนาจในการลงทุน ในการศึกษาค้นคว้าพัฒนาจนสามารถนำไปจดสิทธิบัตรทำให้ประเทศไทยเสียผลประโยชน์ (ธวัชชัย, 2543) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชเหล่านี้มิให้สูญหายไป เพื่อใช้เป็นแหล่งทรัพยากรทางชีวภาพในการศึกษาและพัฒนาเชื้อพันธุ์พืชต่อไป

จากการสำรวจ รวบรวมพันธุ์พืชตามพื้นที่ต่างๆ และศึกษาทบทวนด้านอนุกรมวิธานพรรณไม้ในประเทศไทยของนักวิชาการเกษตร สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร เมื่อปี พ.ศ. 2550 พบพืชชนิด

ใหม่ของโลกเป็นพืชวงศ์เทียน และวงศ์ขิง อย่างละ 1 ชนิด และ ได้ขอพระราชทานนามของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เป็นชื่อวิทยาศาสตร์เพื่อเฉลิมพระเกียรติ ในโอกาสที่ทรงเจริญพระชนมายุครบ 55 พรรษา ในปี พ.ศ. 2553 คือ *Impatiens sirindhorniae* และ *Zingiber sirindhorniae* เนื่องจากมีความสวยงานตามธรรมชาติมากและเหมาะที่จะพัฒนาเป็นไม้ประดับต่อไปในอนาคตและทรงได้พระราชทานทั่วไปว่า ชมพูสิริน และไอยริศ (ปราโมทย์ และคณะ, 2555)

พืชสกุลเทียน (*Impatiens*) จัดอยู่ในวงศ์ BALSAMINACEAE เกือบทั้งหมดเป็นพืชล้มลุก มีบางชนิดที่จัดว่าเป็นพืชไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นอวบน้ำ พืชสกุลเทียนมีการนำมาสกัดสารใช้รักษาแผลติดเชื้อเรื้อรังในสัตว์ซึ่งพบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และมีแนวโน้มจากแพทย์ทางเลือกนำมาใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือแผลเรื้อรังที่เกิดจากการติดเชื้ออีกด้วย (กลุ่มนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาแพทย์แผนไทย รุ่นที่6, ม.ม.ป.)

ชมพูสิริน เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์เทียน (FAMILY BALSAMINACEAE) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Impatiens sirindhorniae* สำรวจพบเฉพาะบริเวณหน้าผาเขาหินปูน ที่ระดับความสูง 20-150 เมตร ในเขต อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ และ อ. คีรีรัฐนิคม จ.สุราษฎร์ธานี จัดเป็นพืชหายาก (rare) และเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) ของประเทศไทย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายฤดู ลำต้นฉ่ำน้ำ แตกกอที่ส่วนโคน มียอดมากได้ถึง 15 ยอด ลำต้นสีเขียวอมเทา ผิวนวลเรียบ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงเวียนแตกใบมากเฉพาะส่วนปลายยอด แผ่นใบหนาคล้ายแผ่นหนังรูปไข่ปลายแหลม โคนตัดหรือคล้ายรูปหัวใจ ขอบหยัก ก้านใบยาว 6 – 7.5 ซม. ใกล้โคนใบมีต่อม 2 อัน ดอกเกิดตามปลาย กิ่ง มี 1 – 2 ดอก ก้านดอกโค้ง ยาว 3 – 6.5 ซม. ดอกสีชมพู ใบประดับมีขนาดเล็ก กลีบส่วนใหญ่อยู่ในแนวระนาบเดียว กลีบเลี้ยง 5 กลีบ อยู่เป็น 2 คู่ คู่นอกสีขาวอมเขียวรูปไข่ คู่ในลดรูปกลีบล่างสุดเป็นรูปคล้ายเรือ และค่อย ๆ คอดเป็นเดือยโค้งยาวได้ถึง 6 ซม. กลีบดอก 5 กลีบ กลีบบนเป็นรูปไข่กลับ ปลายพับขึ้น อยู่เป็นคู่ 2 คู่ กลีบบนเชื่อมติดกับกลีบล่าง รังไข่เกลี้ยง มีผลแบบผลแห้งแตกภายในมีเมล็ดสีน้ำตาลเกือบดำ

พืชวงศ์ขิง (ZINGIBERACEAE) เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีนวลมีกลิ่นหอมเฉพาะ ในประเทศไทยมีประมาณ 200 ชนิด ส่วนมากนิยมใช้เป็นเครื่องเทศและสมุนไพร เช่น ไพล กระทือ บางชนิดมีความสำคัญในฐานะเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เช่น ไพลเหลือง และยังมีอีกหลายชนิดที่หายากและยังรอการพิสูจน์ชื่อวิทยาศาสตร์

ไอยริศ เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ขิง (FAMILY ZINGIBERACEAE) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zingiber sirindhorniae* สำรวจพบบนยอดเขาหินปูนในเขตอำเภอหนองหินและอำเภอผาขาว จังหวัดเลย จัดเป็นพืชหายาก (rare) และเป็นพืชถิ่นเดียว (endemic) ของประเทศไทย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุกหลายฤดู ลำต้นเป็นเหง้ากลม รากสะสมอาหารทรงกระบอก1 – 3 ราก เนื้อในสีเหลืองมีกลิ่นเช่นเดียวกับขิง มีลำต้นส่วนเหนือดินแตกกอ 3 – 6 ยอด แต่ละยอดยาว 40 – 70 ซม. ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับระนาบเดียว 5 – 12 ใบ แผ่นใบรูปขอบขนาน กว้าง 3.5 – 4.5 ซม. ยาว 8 – 14 ซม. ปลายแหลม โคนสอบรูปลิ่ม ผิวใบเกลี้ยงทั้งสองด้าน ลิ้นใบสีแดง ยาว 7 – 8 มม. แยกเป็น 2 แฉกอิสระ ก้านใบยาว 3 – 6 มม. ช่อดอกเป็นช่อเชิงลดเกิดที่ปลายลำต้นส่วนเหนือดิน กว้างประมาณ 1 ซม. ยาว 5.5 – 7.5 ซม. ก้านช่อดอกยาว 1 – 2 ซม. ใบประดับสี

เขียว มีขอบสีม่วงแดง ใบประดับย่อยขนาดเล็ก กลีบเลี้ยง 3 กลีบ โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอดปลายแยกด้านเดียว ขอบเป็นหยัก 3 แฉก กลีบดอกสีขาว โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 3 แฉก เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 5 อันสีม่วงเข้มมีลายประสีขาวเปลี่ยนรูปร่างไปมีลักษณะคล้ายกลีบดอก 2 อัน เชื่อมติดกันเป็นกลีบปากรูปคล้ายไข่กลับ กว้างและยาวประมาณ 2 ซม. อับเรณูมี 2 พู ยาวประมาณ 1 ซม. ผลแบบผลแห้งแตก เมล็ดสีดำรูปกระสวย มีเยื้อหุ้มเมล็ดสีขาว (ประภาส, 2553)

การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชโดยใช้พื้นที่น้อยในการอนุรักษ์ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อและปลอดจากภัยธรรมชาติ (อรดี, 2539) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่ทำให้มีอัตราในการเจริญเติบโตต่ำเพื่อลดการย้ายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนถ่ายอาหารบ่อยๆ อาจใช้วิธีการลดอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยง เช่น การศึกษากล้วยโดยการเก็บรักษาที่ 8 องศาเซลเซียส ช่วยยืดเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารได้นาน 2-3 เดือน (Kulkarni and Ganapathi, 2009) หรือการใส่สารที่มีผลในการชะลอการเจริญเติบโต เช่น การใช้ sorbitol หรือ manitol ในการเพาะเลี้ยงสตรอเบอรี่ (Hassan and Bekheet, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถลดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตบางชนิดเพื่อช่วยในการชะลอการเจริญเติบโต (Sahavacharin, n.d)

การศึกษาเทคนิคการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชให้ปลอดภัยจากธรรมชาติ เพื่อลดความเสี่ยงในการสูญหายของเชื้อพันธุกรรมพืช (genetic loss) ในขณะเดียวกันเป็นการสนับสนุนการวางแผนการอนุรักษ์ทรัพยากรพืชและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับชนิดพันธุ์พืชเฉพาะถิ่นหายากและใกล้สูญพันธุ์ รวมทั้งการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเหล่านี้ในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เพื่อให้สายพันธุ์นั้นคงอยู่และสามารถนำกลับมาใช้เมื่อต้องการ เช่น การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มคุณค่าของพันธุ์ไม้ในเชิงเศรษฐกิจ ในขณะเดียวกันเป็นการสนับสนุนการวางแผนการอนุรักษ์ทรัพยากรพืชและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน และเป็นการรองรับการให้สัตยาบัญของอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยด้วย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเทคนิคที่ใช้ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมชมพูสิรินและไอยริศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ และเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรพืชทั้งสองชนิดนี้ให้มีปริมาณมากก่อนที่จะดำเนินการคืนพืชสู่ถิ่นธรรมชาติต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นชมพูสิริน
2. ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นไอยริศ
3. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
4. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

5. อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. สำรวจ รวบรวม ตัวอย่างต้นชมพูสิริน จากแหล่งธรรมชาติ ที่บริเวณเขาหินปูน อ.คีรีรัฐนิคม จ.สุราษฎร์ธานี และสำรวจ รวบรวม ตัวอย่างต้นไอยริศ จากแหล่งธรรมชาติ ที่บริเวณยอดเขาหินปูนในเขต อ. ผาขาว จ.เลย บันทึกลักษณะและแหล่งที่พบ

2. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนต้นชมพูสิริน และไอยริศ

- ชมพูสิริน ทำความสะอาดชิ้นส่วนของต้นชมพูสิรินด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที ตัดชิ้นส่วนข้อก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ 0.1 และ 0.2% หยดสาร Tween 20 1-2 หยด ฟอกนาน 3 และ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนข้อให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ศึกษา

- ไอยริศ ทำความสะอาดชิ้นส่วนของต้นไอยริศด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 2 นาที ตัดชิ้นส่วนหน่ออ่อนก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ 0.1 และ 0.2% หยดสาร Tween 20 1-2 หยด ฟอกนาน 5 และ 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกชิ้นส่วนรอบนอกของหน่ออ่อนออก และตัดให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนที่เตรียมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ทดลอง

3. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงชมพูสิริน และไอยริศ

- ชมพูสิริน นำชิ้นส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาเลี้ยงทดสอบบนอาหารสูตรต่างๆ ดังนี้

1. MS + BA 0 มก./ล. + NAA 0 มก./ล.
2. MS + BA 0 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล.
3. MS + BA 0 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.
4. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 0 มก./ล.
5. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล.
6. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.
7. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 0 มก./ล.
8. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล.
9. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.

- ไอยริศ นำชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงทดสอบบนอาหารต่างๆ ดังนี้

1. MS + BA 0 มก./ล. + IAA 0 มก./ล.
2. MS + BA 0 มก./ล. + IAA 1 มก./ล.
3. MS + BA 0 มก./ล. + IAA 2 มก./ล.
4. MS + BA 1 มก./ล. + IAA 0 มก./ล.
5. MS + BA 1 มก./ล. + IAA 0 มก./ล.
6. MS + BA 1 มก./ล. + IAA 0 มก./ล.

7. MS + BA 3 มก./ล. + IAA 0 มก./ล.

8. MS + BA 3 มก./ล. + IAA 1 มก./ล.

9. MS + BA 3 มก./ล. + IAA 2 มก./ล.

10. MS + BA 5 มก./ล. + IAA 0 มก./ล.

11. MS + BA 5 มก./ล. + IAA 1 มก./ล.

12. MS + BA 5 มก./ล. + IAA 2 มก./ล.

- การทดลองเพาะเลี้ยงข้อชมพูสิริน วางแผนการทดลองแบบ 3x3 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้สิ่งทดลองคืออาหารทั้ง 9 สูตรข้างต้น โดยปัจจัยที่ 1 คือระดับความเข้มข้นของ BA 3 ระดับได้แก่ 0, 1 และ 3 มก./ล. ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ NAA 3 ระดับได้แก่ 0, 0.5 และ 1 มก./ล. เก็บข้อมูลโดยนับจำนวนยอดและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

- สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนไอยริศนั้น วางแผนการทดลองแบบ 4x3 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ สิ่งทดลองคืออาหารทั้ง 12 สูตรข้างต้น โดยปัจจัยที่ 1 คือระดับความเข้มข้นของ BA 4 ระดับได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ IAA 3 ระดับได้แก่ 0, 1 และ 2 มก./ล. เก็บข้อมูลโดยนับจำนวนยอด ความสูง และตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของไอยริศในสภาพปลอดเชื้อ

นำหน่ออ่อนไอยริศที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจนได้ต้นที่เจริญสมบูรณ์ ตัดให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร และนำชิ้นส่วนที่เตรียมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่จะทดสอบ

1. MS + sucrose 0 ก./ล.

2. MS + sucrose 15 ก./ล.

3. MS + sucrose 30 ก./ล.

4. MS + sucrose 45 ก./ล.

5. 1/2 MS + sucrose 0 ก./ล.

6. 1/2 MS + sucrose 15 ก./ล.

7. 1/2 MS + sucrose 30 ก./ล.

8. 1/2 MS + sucrose 45 ก./ล.

9. 1/4 MS + sucrose 0 ก./ล.

10. 1/4 MS + sucrose 15 ก./ล.

11. 1/4 MS + sucrose 30 ก./ล.

12. 1/4 MS + sucrose 45 ก./ล.

13. 1/8 MS + sucrose 0 ก./ล.

14. 1/8 MS + sucrose 15 ก./ล.

15. 1/8 MS + sucrose 30 ก./ล.

16. 1/8 MS + sucrose 45 ก./ล.

- แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 4x4 Factorial in CRD จำนวน 7 ซ้ำ ใช้สิ่งทดลองคืออาหารทั้ง 16 สูตรข้างต้น โดยปัจจัยที่ 1 คือระดับความเข้มข้นของอาหาร MS 4 ระดับ ได้แก่ MS, 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ sucrose 4 ระดับได้แก่ 0, 15, 30 และ 45 ก./ล. เก็บข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชะลอการเจริญเติบโตสูตรต่างๆ

เวลาและสถานที่

เริ่มการทดลองปี 2553 ถึง 2556

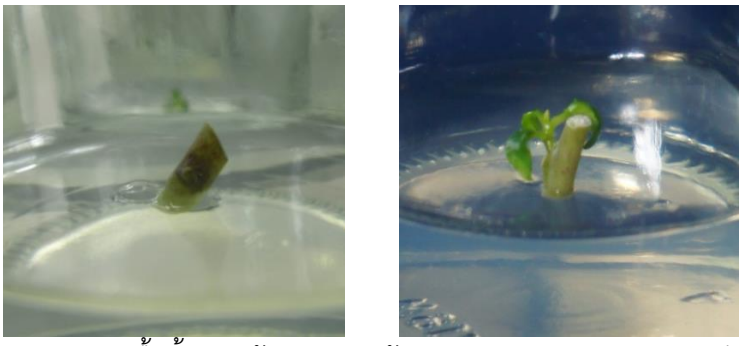
ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนต้นชมพูสิริน และไอยริศ

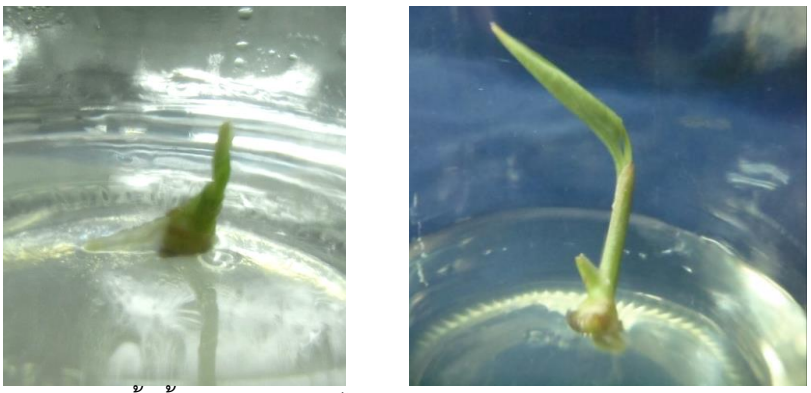
เมื่อได้ตัวอย่างพืชจากแหล่งธรรมชาติทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 1) ต้นชมพูสิรินและไอยริศมีปริมาณในแหล่งธรรมชาติจำกัด ดังนั้นจึงได้ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชมาศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อปริมาณไม่มาก จึงใช้ $HgCl_2$ สำหรับฟอกฆ่าเชื้อพืชทั้ง 2 ชนิด จากการศึกษาพบว่าชมพูสิรินต้องใช้ชิ้นส่วนข้อในการฟอกฆ่าเชื้อ เมื่อใช้ $HgCl_2$ 0.2 % นาน 3 และ 5 นาที พบว่าใช้เวลาในการฟอก 5 นาที (ภาพที่ 2) ได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อแต่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ หากลดเวลาในการฟอกเหลือ 3 นาทีจะได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ และสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 15 % ในขณะที่ใช้ $HgCl_2$ 0.1 % นาน 3 และ 5 นาทีได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ และสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 33 และ 60 % ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกันกับการทดลองของ Nikolova และคณะ (1996) ที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ *Impatiens flanaganae* ด้วย $HgCl_2$ 0.1 % นาน 5 นาที พบว่าได้ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 52 %

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกและต้นของชมพูสิริน (a, b) และไอยริศ (c, d) ในแหล่งธรรมชาติ



ภาพที่ 2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อชมพูสิรินด้วย $HgCl_2$ 0.1 % นาน 5 นาที

การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนไอยริศด้วย $HgCl_2$ 0.1 % นาน 5 และ 10 นาที ได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 17 และ 32 % ตามลำดับ 83.33 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้น $HgCl_2$ เป็น 0.2 % นาน 5 และ 10 นาที ได้ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อและสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ 56.4 และ 83.33 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหน่ออ่อนไอยริศควรฟอกด้วย $HgCl_2$ 0.2 % นาน 10 นาที (ภาพที่ 3) ได้ผลการฟอกดีที่สุดอาจเป็นเพราะชิ้นส่วนที่ได้จากแหล่งธรรมชาติอยู่ใต้ดินค่อนข้างลึก และอยู่ในบริเวณที่เป็นป่าบนภูเขาหินปูน จึงชิ้นส่วนไอยริศที่ได้จึงค่อนข้างมีการปนเปื้อนสูง ในขณะที่การทดลองของ Kavyashree (2009) ฟอกฆ่าเชื้อ *Zingiber officinale* ที่พบบริเวณทั่วไปมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ 0.1 % นาน 5 นาที ได้ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อและสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ 75 %



ภาพที่ 3 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหน่ออ่อนไอยริศด้วย $HgCl_2$ 0.2 % นาน 10 นาที

2. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนชมพูสิริน และไอยริศ

จากการทดลอง (ตารางที่ 1) พบว่าการเกิดยอดของชมพูสิรินเกิดจากอิทธิพลผลสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน โดยที่ออกซินและปฏิสัมพันธ์ระหว่างออกซินกับไซโตไคนินนั้นไม่มีผลต่อการเกิดยอด ซึ่งเมื่อให้ปริมาณไซโตไคนินเพิ่มขึ้น จึงมีแนวโน้มในการชักนำการเกิดยอดเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Veluchmay และคณะ (2009) ทำการชักนำให้เกิดยอดของ *Impatiens campanklata* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 60 % BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 85 % ในขณะที่เพิ่มปริมาณ BA

เป็น 4-8 มก./ล. จะทำให้การชักนำให้เกิดยอดลดลง เช่นเดียวกับผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Impatiens balsamina* บนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดสูตรต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้ 6.8 ยอด ชิ้นส่วนและอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 7.2 ยอด (Taha *et al*., 2009)

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม NAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดของต้นชมพูสิริน เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 เดือน

สูตรอาหาร	NAA			
BA	0 มก./ล.	0.5 มก./ล.	1 มก./ล.	mean
0 มก./ล.	1.2 b	0.9 c	0.9 c	1.0 c
1 มก./ล.	3.2 a	3.5 b	3.2 b	3.3 b
3 มก./ล.	4.7 a	5.7 a	5.9 a	5.5 a
mean	3.1	3.4	3.4	3.3
CV (%)	11.43			

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้ตัวอักษร a, b, c

ตารางที่ 2 ผลของของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม IAA และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนยอดของต้นไอยริศ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน

สูตรอาหาร	IAA			
BA	0 มก./ล.	1 มก./ล.	2 มก./ล.	mean
0 มก./ล.	1.2 c x	1.2 d x	1.0 d x	1.2
1 มก./ล.	1.7 c y	3.0 c x	3.0 c x	2.6
3 มก./ล.	4.7 b x	5.5 b x	5.5 b x	5.2
5 มก./ล.	6.7 a y	7.7 a y	9.0 a x	7.8
mean	3.6	4.4	4.6	4.2
CV (%)	6.10			

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้ตัวอักษร a, b, c
- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (IAA) ใช้ตัวอักษร x, y, z

ตารางที่ 3 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม IAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของต้นไอยริศ เมื่อเลี้ยงนาน 3 เดือน

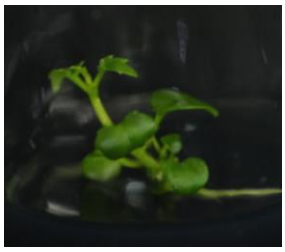
สูตรอาหาร	IAA			
BA	0 มก./ล.	1 มก./ล.	2 มก./ล.	mean
0 มก./ล.	5.95 c y	7.392 c x	7.24 c x	6.86
1 มก./ล.	9.54 b y	10.72 b x	11.21 b x	10.48
3 มก./ล.	9.57 b y	11.22 b x	11.68 b x	10.82
5 มก./ล.	15.13 a y	14.26 a y	16.60 a x	15.33
mean	10.05	10.90	11.68	10.88
CV (%)	5.8			

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้ตัวอักษร a, b, c
- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (IAA) ใช้ตัวอักษร x, y, z

MS

MS + BA 1 มก./ล.



MS + BA 3 มก./ล.

MS + NAA 0.5 มก./ล.

MS + NAA 0.5 มก./ล.
+ BA 1 มก./ล.

MS + NAA 0.5 มก./ล.
+ BA 3 มก./ล.

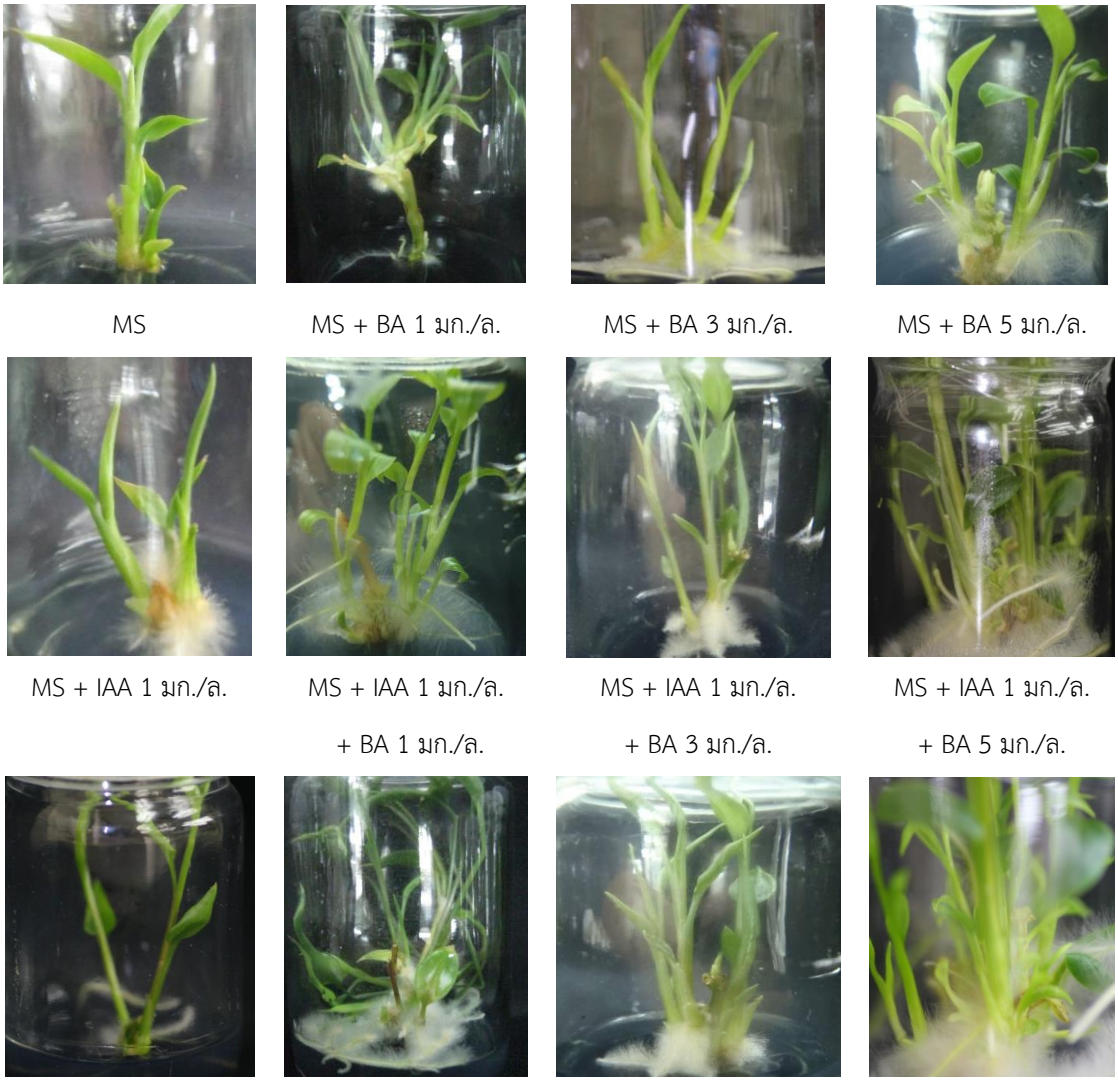
MS + NAA 1 มก./ล

MS + NAA 1 มก./ล.
+ BA 1 มก./ล.

MS + NAA 1 มก./ล.
+ BA 3 มก./ล.

ภาพที่ 4 ลักษณะของต้นชมพูสิรินที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA และ BA เป็นเวลา 5 เดือน

จากการทดลอง (ตารางที่ 2 และ 3) พบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ BA ต่างมีผลต่อความสูงของต้นไอยริศ โดยเมื่อเติมไซโตไคนินยิ่งสูงมีผลให้ต้นไอยริศมีความสูงยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับผลของการเติมสารออกซินยิ่งความเข้มข้นสูงยิ่งส่งผลให้ต้นไอยริศยิ่งสูง แสดงว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดมีปฏิสัมพันธ์กัน จากการทดลองของ Hamirah และคณะ (2010) เพาะเลี้ยง red ginger พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอดคือ MS ร่วมกับการเติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ IAA 2 มก./ล. โดยให้ยอดจำนวนเฉลี่ย 8.14 ยอด และจากการรายงานของ Anish และคณะ (2008) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Boesenbergia pulcherrima* บนอาหาร MS ที่เติมออกซิน (IAA) ร่วมกับไซโตไคนิน (BA) ที่มีความเข้มข้นยิ่งสูง จะพบการเพิ่มจำนวนยอดยิ่งมีเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อถึงจุดสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 สาร เช่นเดียวกับการทดลองพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์ Zingiberaceae เช่น *Curcuma aromativa* (Nayak, 2000) และ *Nlpinia calcarata* (Agretious *et al*., 1996)



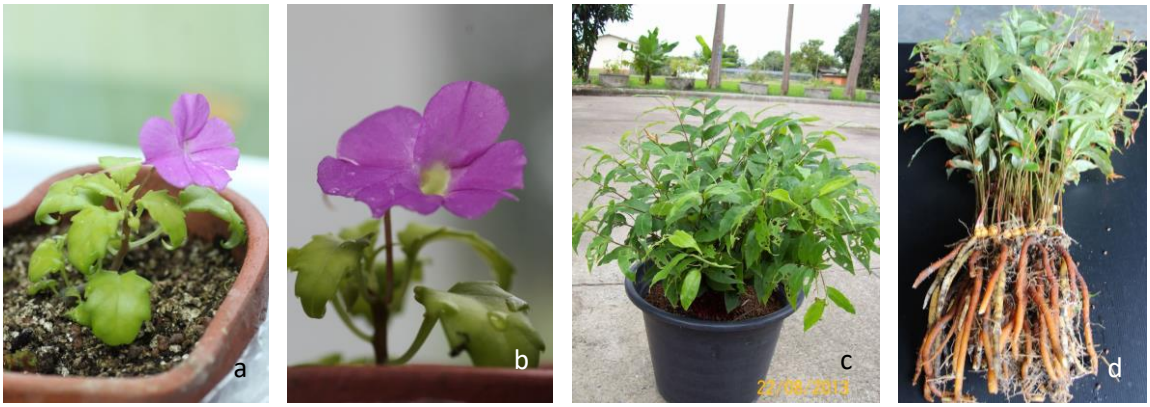
ภาพที่ 5 ลักษณะของต้นไอยริศที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ IAA และ BA เป็นเวลา 3 เดือน

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของไอยริศในสภาพปลอดเชื้อ

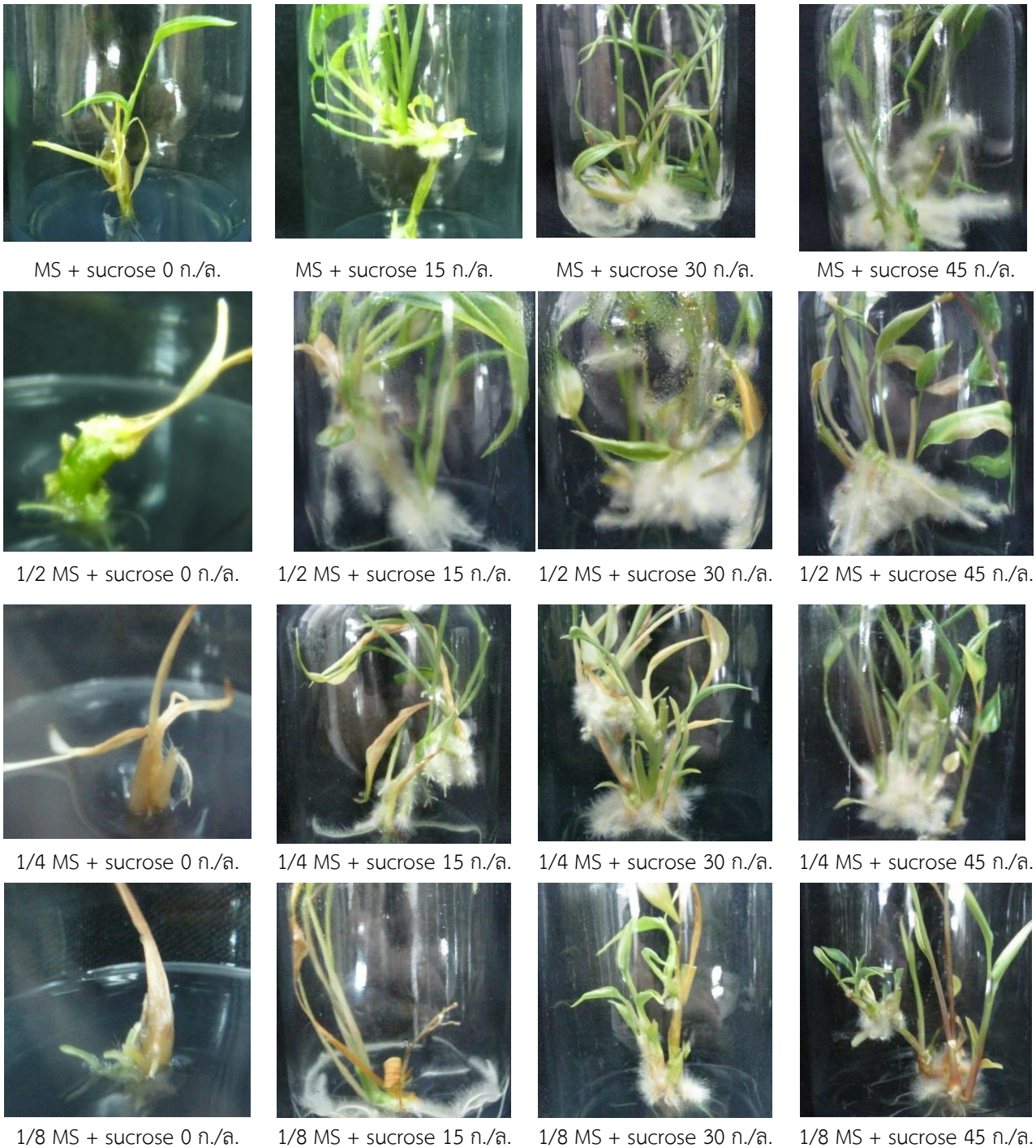
เริ่ม culture โดยใช้ชิ้นส่วนหน่ออ่อนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาด 3 ซม. และเพาะเลี้ยงบนอาหารชะลอการเติบโตสูตรต่างๆ ทั้ง 16 สูตร โดยปักลงไปบนอาหารประมาณ 4 มม. ทำการทดลองจำนวน 7 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด

จากการทดลอง (ภาพที่ 6) พบว่าน้ำตาลซูโครส มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดไอยริศอย่างชัดเจน โดยเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 0 ก./ล. ไม่พบการแตกยอดของไอยริศและมีร้อยละการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำ ส่วนการลดปริมาณ MS ทำให้ยืดระยะเวลาการ subculture ส่งผลต่อร้อยละการรอดชีวิตบนอาหารชะลอการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อนาน 12 เดือน อาหารสูตร MS ที่เหมาะสำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของไอยริศคืออาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 45 ก./ล. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สนธิชัย (2548) เนื่องจากการเติมซูโครสจะทำให้ไอยริศมีการดึงสารอาหารที่นำไปเลี้ยงต้นได้น้อยเพราะอาหารเพาะเลี้ยงมี osmotic potential สูงจึงมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงและสามารถอยู่รอดได้ 1 ปี เมื่อลดปริมาณสารอาหารลงก็มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมคือ 15 ก./ล. เมื่อลดปริมาณอาหารลงเป็น 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS หากเติมน้ำตาลซูโครสที่มากขึ้นจะทำให้การดึงสารอาหารได้น้อยลงกว่าเดิม เช่นเดียวกับการชะลอการเจริญเติบโตของขิงคือ 1/2 MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล. ได้นาน 12 เดือน (Nirmal Babu *et al*., 2000; Peter *et al*., 2002)

การนำชมพูสิรินและไอยริศออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปลูกในสภาพโรงเรือน โดยใช้ พีชมอส : ดินผสม : เพอร์ไลท์ : หินภูเขาไฟ อัตราส่วน 3 : 2 : 1 : 1 มีอัตราการรอดชีวิต 50 และ 100 % ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงต้นชมพูสิริน (a, b) และไอยริศ (c, d) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 7 ลักษณะของต้นไอยริศที่เพาะเลี้ยงบนอาหารลดปริมาณ MS ร่วมกับปรับปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็นเวลา 12 เดือน

ตารางที่ 4 ร้อยละการรอดชีวิตของต้นไอยริศบนอาหารลดปริมาณ MS ร่วมกับปรับปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็นเวลา 12 เดือน

สูตรอาหาร		ร้อยละการรอดชีวิตบนอาหารชะลอการเจริญเติบโต
MS	Sucrose 0 ก./ล.	14.29
	Sucrose 15 ก./ล.	14.29
	Sucrose 30 ก./ล.	14.29
	Sucrose 45 ก./ล.	28.57
1/2 MS	Sucrose 0 ก./ล.	0
	Sucrose 15 ก./ล.	28.57
	Sucrose 30 ก./ล.	14.83
	Sucrose 45 ก./ล.	14.83
1/4 MS	Sucrose 0 ก./ล.	28.57
	Sucrose 15 ก./ล.	85.71
	Sucrose 30 ก./ล.	42.86
	Sucrose 45 ก./ล.	42.86
1/8 MS	Sucrose 0 ก./ล.	14.29
	Sucrose 15 ก./ล.	85.71
	Sucrose 30 ก./ล.	42.86
	Sucrose 45 ก./ล.	72.86

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชมพูสิรินได้เทคนิคที่เหมาะสม คือ ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 % นาน 5 นาที และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อชมพูสิริน เพื่อเพิ่มปริมาณต้นในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก/ล. สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อไอยริศได้เทคนิคที่เหมาะสมคือ ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหน่ออ่อนด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.2 % นาน 10 นาที สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนยอดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ IAA 2 มก/ล. และสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของไอยริศในสภาพปลอดเชื้อคือ 1/4 MS และ 1/8 MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล. สามารถเพาะเลี้ยงได้นานอย่างน้อย 12 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองนี้ได้เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชสกุลขิง (*Zingiber*) และ สกุลเทียน (*Impatiens*) และได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์ชมพูสิรินและไอยริศในสภาพปลอดเชื้อ สำหรับการอนุรักษ์ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และเพื่อการวิจัยต่อไปในอนาคต ตลอดจนเป็นการลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ จากแหล่งธรรมชาติเนื่องจากพืชทั้งสองเป็นพืชหายากและพืชเฉพาะถิ่นของไทย

11. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนงบวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สถานที่ทำการวิจัย และขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สนับสนุนและร่วมงานวิจัยอย่างเต็มที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ ผู้ค้นพบพืชทั้งสองชนิดและเอื้ออำนวยข้อมูลสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาแพทย์แผนไทย รุ่นที่ 6. มมป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยรุ่นที่ 6. *กลุ่มพืชถอนพิษ*. แหล่งที่มา: http://www.thehow2.com/กลุ่มพืชถอนพิษ.php, 4 กันยายน 2552.

ธวัชชัย สันติสุข. 2547. *พืชถิ่นเดียวและพืชหายากของประเทศไทย*. กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 119 น.

ธวัชชัย สันติสุข. 2543. *พืชถิ่นเดียวและพืชหายากของประเทศไทย.* สำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี.

ประภาส ทรงหงษา. 2553. ย้อนอดีตพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ...แหล่งเรียนรู้ใจกลางกรุง. *จดหมายข่าวผลิใบ*. 13(11): 12-15

ปราโมทย์ ไตรบุญ, บดินทร สอนสุภาพ, พงษ์ศักดิ์ พลตรี, วินัย สมประสงค์, วัชรี ประชาศรัยสรเดช, ประนัย เพ็ญจิตร และ จารุวรรณ จาติเสถียร. 2555. *การศึกษาพรรณไม้วงศ์ Balsaminaceae และ Gesneriaceae บริเวณเทือกเขาหินปูน*. ใน: เอกสารการประชุมวิชาการกรมวิชาการเกษตรประจำปี 2555 “จับประเด็นงานวิจัยก้าวใหม่สู่การเปลี่ยนแหลง”. วันที่ 14-16 พฤษภาคม 2555, ณ. โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ซิตี้ จอมเทียน จ.ชลบุรี.

ราชันย์ ภู่มา. 2547. การสำรวจพันธุ์พืชเฉพาะถิ่น หายาก ใกล้จะสูญพันธุ์ในพื้นที่อนุรักษ์ทั่วประเทศ. *มติชน* 27 (9558): 7

อรดี สหวัชรินทร์.2539. *หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 73 หน้า.

Anish N.P., M. Dan and M. Bejoy. 2008. Conservation using *in vitro* Progenies of the threatened Ginger-*Boesenbergia pulcherrima* (Wall.) Kuntze. *International Journal of Botany*. 4(1): 93-98.

Hamirah, M.N., H.B. Sani, P.C. Boyce and S.L. Sim. 2010. Micropropagation of red ginger (*Zingiber mantanum* Koenig), a medicinal plant. *NsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*. 18(1): 127-130.

Hassan, N.A. and S.A. Bekheet. 2008. Mid-term storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. *Research Journal of Agriculture and biological Sciences* 4(5): 505-511.

Kavyashree, R. 2009. An efficient *in vitro* protocol for clonal multiplication of Ginger var. Varada. *Indian Journal Biotechnology*. 8: 328-331.

Kulkarni, V.M. and T.R. Ganapathi. 2009. A simple procedure for slow growth maintenance of banana (*Musa* spp.) embryogenic cell suspension cultures at low temperature. *Current Science* 96(10): 1372-1377.

Nayak, S. 2000. *In vitro* multiplication and Microrhizome induction in *Curcuma aromatic* Salisb. *Plant Growth Regul*. 32: 41-47.

Nikolova, R.V., N. Lall and A.J.N. Bosa. 1996. An assessment of the conditions for the rapid propagation of *Impatiens flanaganae in vivo* and *in vitro*. *Acta-hortic*., 440: 633-638.

Nirmal Babu, K., P.N. Ravindran and K.V. Peter. 2000. *Biotechnology of Spices*. In: Chadha K.L., P.N. Ravindran and L. Sahigram (eds.) Biotechnology of Horticulture and Plantation Crops, Malhotra Publishing House, New Delhi, pp. 487-527.

Peter, K.V., P.N. Ravindran, K. Nirmal Babu, B. Sasikumar, D. Minoo, S.P. Geetha and K. Rajalakshmi. 2002. *Establishing in vitro conservatory of spices germplasm*. ICAR Project Report, Indian Institute of Spices Research, Calicut, Kerala India, p. 131.

Sanhavacharin, O. n.d. Kasetsart Journal. *Tissue culture for conseration of perennial crops*. Available source: hrrp://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj_files/2008/A0806172155107343.pdf [September 9, 2009].

Taha, A., A. Wagiran, H. Ghazali, F. Huyop and G.K.A. Parveez. 2009. *In vitro* regeneration of garden Balsam, *Impatians balsamina* Using cotyledons derived from seeding. Biotechnology 8(1): 44-52.

Veluchmay, B., C. R. Konganapuram and P.R. Jayachandran. 2009. Effect regeneration of *Impatiens campanalata* wight a valuable medicinal plant from Western Ghats of tamil Nadu, India, *Global Journal of Pharamocology* 3(1): 41-49.

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของชมพูสิรินที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน NAA และ BA เป็นเวลานาน 5 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Sqr(X+1)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	8	7.68439518	0.96054940	18.15 **
CYTO (C)	2	0.01793305	0.00896653	<1
AUX (A)	2	7.51562483	3.75781242	70.99 **
CxA	4	0.15083729	0.03770932	<1
ERROR	27	1.42916861	0.05293217	
TOTAL	35	9.11356379		

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

ตารางภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของไอยริศที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน IAA และ BA เป็นเวลานาน 3 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Sqr(X+1)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	11	16.44623014	1.49511183	83.43 **
CYTO (C)	2	0.36922525	0.18461263	10.30 **
AUX (A)	3	15.76442865	5.25480955	293.21 **
CxA	6	0.31257623	0.05209604	2.91 *
ERROR	36	0.64517669	0.01792157	
TOTAL	47	17.09140683		

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

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนความสูงของยอดไอยริศที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน IAA และ BA เป็นเวลานาน 3 เดือน

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	11	464.9238500	42.2658045	105.50 **
CYTO (C)	2	21.3482625	10.6741312	26.64 **
AUX (A)	3	433.0064167	144.3354722	360.29 **
CxA	6	10.5691708	1.7615285	4.40 **
ERROR	36	14.4219500	0.4006097	
TOTAL	47	479.3458000		

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