รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. ชุดโครงการวิจัย

2. โครงการวิจัย โครงการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (โครงเดี่ยว)

3. ชื่อการทดลอง เทคนิคการขยายพันธุ์นรีรัตน์ (*Petrocosmea pubescens*) พืชถิ่นเดียวของไทยในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Multiplication Technique of *Petrocosmea pubescens*, an Endemic Species in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง พัฒน์นรี รักษ์คิด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน พัชร ปิริยะวินิตร[1], อัสนี ส่งเสริม[1]

5. บทคัดย่อ

นรีรัตน์เป็นพืชถิ่นเดียวของไทยพบได้เฉพาะที่ดอยตุง จ.เชียงราย ปัจจุบัน IUCN ได้จัดสถานภาพให้อยู่ในระดับพืชที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ จึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมพืชชนิดนี้ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มปริมาณต้นนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยศึกษาวิธีการและชิ้นส่วนที่เหมาะสำหรับฟอกฆ่าเชื้อนรีรัตน์ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดนรีรัตน์โดยการนำฝักแก่จุ่มแอลกอฮอล์ 95% และผ่านไฟ 3 ครั้งแล้วเคาะเมล็ดออกมาเพาะเลี้ยง จะทำให้ได้ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 50% และการทดลองแปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นนรีรัตน์เพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อคือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA 0.5 มก./ล. สร้างจำนวนยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 11.4 ยอด/ชิ้นส่วน ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ

ABSTRACT

Petrocosmea pubescens is an endemic species of Thailand, found only on Doi Tung, Chiang Rai province. According to IUCN, this species has been classified as Vulnerable. Therefore, this research tried to apply tissue culture techniques to multiply and conserve this species. This research is conducted by studying sterilization method and parts of plant which are suitable for *in vitro* multiplication. The result showed that sterilization by dipping

---

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ปทุมธานี 12110

pod of *P. pubescens* in 95% ethanol then quickly moved the pod over flame for 3 times before culture seed on media was the most effective method as it resulted in 50% sterilized seed that could germinate and complete its growth. Various concentrations of plant growth regulators (auxin and cytokinin) were also examined. The results indicated that after 3 months of culture, the highest shoot number of *P. pubescens* (11.4 shoots per explant) was obtained from MS basal medium supplemented with 0.5 mg/L IBA while the media supplemented with BA and IBA were found to have no effect on increasing number of shoot.

6. คำนำ

พืชวงศ์ Gesneriaceae ที่พบทั่วโลกมีประมาณ 150 สกุล 3,700 ชนิด มีทั้งพืชที่ปลูกเป็นการค้า เช่น แอฟริกันไวโอเลต (*Saintpaulia ionantha*) และกล๊อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) บางชนิดเป็นพืชถิ่นเดียว เช่น *Haberlea rhodopensis* พืชถิ่นเดียวของประเทศบัลแกเรีย บางชนิดเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ เช่น *Dayaoshania cotinifolia* (Daskalova, *et al*., 2010) มีการใช้ประโยชน์พืชวงศ์นี้ในต่างประเทศ ทั้งในยุโรปและอเมริกาได้มีการนำมาปลูกเพาะเลี้ยง ปรับปรุงพันธุ์เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีคุณค่ามากมาย จนสามารถตั้งเป็นสมาคม คือ African Violet Society of America (A.V.S.A.) สกุลที่ได้เคยถูกนำมาใช้ประโยชน์เช่น *Saintpaulia, Streptocarpus, Sinningia, Aeschynanthus, Achimenes, Episcia, Columnea* และ *Nematanthus* มีรายงานการใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์นี้เพื่อเป็นพืชสมุนไพร เช่น *Didymocarpus pedicellata* ชื่อสามัญคือ stone flower ที่ประเทศอินเดียใช้พืชชนิดนี้ในการรักษาโรคนิ่วในไตและนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ (ปราณี และวิไลวรรณ, 2549) Otero *et al*. (2000) ได้ศึกษาการใช้ต้น *Stauranthera grandiflora* เพื่อใช้รักษาพิษจากการถูกงูกัด ในประเทศไทยมีการนำพืชวงศ์นี้มาใช้ประโยชน์เป็นพืชสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย (วงศ์สถิตย์, 2553)

จากการรายงานของ Burtt ในปี ค.ศ. 2001 พบพืชวงศ์ Gesneriaceae ในประเทศไทยประมาณ 26 สกุล 150 ชนิด โดยพืชสกุล *Petrocosmea* ที่พบในประเทศไทยมีเพียง 6 ชนิด ได้แก่ *Petrocosmea formosa, P. heterophylla, P. kerrii, P. umbelliformis*, *P. bicolor* และ *P. pubescens* ซึ่ง *P. pubescens* ชื่อสามัญคือ นรีรัตน์ เป็นพืชสกุล *Petrocosmea* ชนิดล่าสุดที่พบในประเทศไทย จากการออกสำรวจพืชทางภาคเหนือในระหว่าง กันยายน 2551 ถึงกันยายน 2552 โดยคณะนักวิชาการเกษตรของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

นรีรัตน์ (*Petrocosmea pubescens* D.J. Middleton & Triboun) เป็นพืชถิ่นเดียวของไทย (Endemic of Species in Thailand) ปัจจุบัน IUCN (International Union for Conservation of Nature Natural resources) ได้จัดสถานภาพของต้นนรีรัตน์ ให้อยู่ในระดับพืชที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (VU:

Vulnerable) จากการสำรวจพบประชากรต้นนรีรัตน์น้อยกว่า 500 ต้น พบได้เฉพาะที่ดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย โดยขึ้นบนหินปูนในป่าดิบเขา ที่ระดับความสูง 1,350-1,400 เมตร บริเวณถิ่นที่พบมีการถูกคุกคามจากมนุษย์ ซึ่งหากไม่มีการเร่งขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนประชากร อนาคตอันใกล้นี้ต้นนรีรัตน์อาจอยู่ในสภาวะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Triboun and Middleton, 2012) ต้นนรีรัตน์มีลักษณะเป็นพืชล้มลุก เหง้ามีขนหนาแน่น ใบเรียงแผ่ที่โคน มีก้านใบ แผ่นใบเกือบกลมหรือรูปไข่ แผ่นใบมีขนสั้นนุ่มหนาแน่นทั้งสองด้าน ก้านใบยาวมีขนหนาแน่น ช่อดอกแบบช่อซี่ร่ม ออกจากเหง้า มี 1-2 ดอก ก้านช่อมีขนยาวหนาแน่น กลีบเลี้ยง 5 กลีบมีขนยาวด้านนอก กลีบรูปแถบ 2 กลีบบนแยกกัน 3 กลีบล่างเชื่อมติดกัน กลีบดอกรูปปากเปิดสีม่วงเข้ม มีขนสั้นนุ่มกระจายด้านนอก มีต่อมเล็กๆ ภายในหลอดและโคนกลีบ เกสรเพศผู้ 2 อัน ติดกันภายในโคนหลอดกลีบ ก้านชูอับเรณูมีต่อมกระจาย เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน มีขนและต่อมหนาแน่น ก้านเกสรเพศเมีย มีขนช่วงล่าง (Middleton and Triboun, 2010) ต้นนรีรัตน์มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นพืชไม้ดอกไม้ประดับประเภทกระถาง โดยอาจนำมาพัฒนาให้เป็นพันธุ์ปลูกโดยตรงหรือใช้ในการผลิตเป็นพันธุ์ลูกผสม เนื่องจากดอกมีสีม่วงเข้มและใบมีรูปทรงที่สวยงาม (Shaw, 2011) ในขณะที่ประเทศจีนได้มีการศึกษาถึงศักยภาพการใช้ประโยชน์ทางยาตลอดจนการพัฒนาวิธีการผสมข้ามชนิดในพืชสกุล *Petrocosmea* (Ji, 2008)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถขยายพันธุ์ได้เร็วและจำนวนมาก แต่มีข้อเสียอยู่คือต้นทุนในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการค่อนข้างสูง และขั้นตอนในการปฏิบัติการขยายพันธุ์ค่อนข้างยาก ถ้าเทียบกับการขยายพันธุ์ไม้ดอก กล้วยไม้ หรือไม้ประดับ เพราะว่าสมุนไพรในแต่ละชนิดจะมียาง ซึ่งในยางนั้นจะมีตัวยาแตกต่างกันไป และตัวยาในยางของสมุนไพรนี่เองที่มักจะทำปฏิกิริยากับธาตุอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงต้นพืชสมุนไพร บางครั้งอาจทำให้พืชนั้นไม่เจริญเติบโต ไม่แตกกอ ไม่ดูดสารอาหาร และจะทำให้พืชนั้นตายในที่สุด แต่ถ้าหากทดลองสูตรอาหารได้สูตรที่เหมาะสมกับพืชนั้นๆ ก็จะเจริญเติบโตได้ดี

การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชโดยใช้พื้นที่น้อยในการอนุรักษ์ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อและปลอดจากภัยธรรมชาติ (อรดี, 2539) ซึ่งสอดคล้องกับ Siddique และคณะ (2003) ที่รายงานว่าการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยาและการอนุรักษ์ทรัพยากรพืชในระยะยาวโดยเฉพาะพืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Gesneriaceae หลายสกุล แต่ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงพืชสกุล *Petrocosmea* ในสภาพปลอดเชื้อ เช่น Sunpui และ Kanchanapoom (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Saintpaulia ionantha* โดยใช้ชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และลำต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS พบว่าชิ้นส่วนใบและก้านใบให้ความถี่ในการเกิดยอดสูง โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนก้านใบ คือ MS เติม BA 3 มก./ล. และชิ้นส่วนใบคือ MS เติม TDZ 0.5 มก./ล. North และ Nadakidemi (2012) ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ *Streptocarpus rexii* โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1 มก./ล. ทำให้ได้จำนวนต้นที่มีปริมาณมากที่สุด Tang และ Lin (2007) ได้รายงานผลการศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ *Chirita*

longgangensis ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียวและใกล้สูญพันธุ์ของจีนโดยสามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. โดยได้ประมาณ 24 ต้น และสามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA 0.1 มก./ล. Kazak และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด *Kohleria amabilis* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ได้แก่ ½ MS, MS, B5, NN และ WPM ที่เติม BA 1 มก./ล. พบว่าอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ต้นนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ และเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรให้มีปริมาณมาก ก่อนที่จะเข้าสู่การพัฒนาวิธีการนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน และการคืนพืชสู่ถิ่นธรรมชาติต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ของต้นนรีรัตน์ และอุปกรณ์เก็บตัวอย่างพืช
2. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช
3. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Murashige and Skoog (MS)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซิน คือ indole-3-butyric acid (IBA) และกลุ่มไซโคไคนิน คือ 6-benzyladenine (BA)
5. อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
6. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส
7. วัสดุเพาะปลูก เช่น กระถาง ดินผสม หินเพอร์ไลท์ เม็ดดินเผา และพีทมอส

วิธีการ

1. สำรวจ และรวบรวม ตัวอย่างต้นนรีรัตน์ จากแหล่งธรรมชาติ ที่บริเวณเขาหินปูนยอดดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย จดบันทึกลักษณะพืชและแหล่งที่พบ
2. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์

2.1. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบด้วยสารละลาย Clorox โดยทำความสะอาดชิ้นส่วนใบของต้นนรีรัตน์ด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 10 วินาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาด 1 x 1 ซม. ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox 10 % นาน 15 นาที หยดสาร Tween 20 จำนวน 1-2 หยด ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 10-15 นาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 0.6 x 0.6 ซม. นำชิ้นส่วนใบเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 3 เดือน เก็บข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

2.2. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบด้วยสารละลาย $HgCl_2$ โดยทำความสะอาดชิ้นส่วนใบของต้นนรีรัตน์ด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 10 วินาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาด 1 x 1

ซม. ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.2 และ 0.4% หยดสาร Tween 20 1-2 หยด ฟอกนาน 3 และ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 10-15 นาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 0.6 x 0.6 ซม. นำชิ้นส่วนใบเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 3 เดือน เก็บข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลาย $HgCl_2$ และระยะเวลา (นาที) ที่เหมาะสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของต้นรีรัตน์

2.3. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักที่ยังไม่สุกแก่เต็มที่ โดยนำฝักที่ยังไม่สุกแก่เต็มที่ของต้นรีรัตน์จุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟ 3 ครั้ง ตัดปลายฝัก บิดและเคาะฝักเพื่อให้เมล็ดออก เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 3 เดือน เก็บข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

2.4. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักแก่ โดยนำฝักแก่ของต้นรีรัตน์จุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟ 3 ครั้ง ตัดปลายฝัก บิดและเคาะฝักเพื่อให้เมล็ดออก เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 3 เดือน เก็บข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

3. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์

ต้นรีรัตน์ที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ (จากข้อ 2) และเพาะเลี้ยงจนได้เป็นต้นที่สมบูรณ์ เลือกใบที่มีขนาดเท่าๆ กันประมาณ 0.8 x 0.8 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ จำนวน 15 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบกลุ่มโตไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 มก/ล. ร่วมกับกลุ่มออกซิน (IBA) ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0, 0.5 และ 1 มก./ล.

วางแผนการทดลองแบบ 4x3 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้สิ่งทดลองคืออาหารทั้ง 15 สูตรข้างต้น โดยปัจจัยที่ 1 คือระดับความเข้มข้นของ BA จำนวน 5 ระดับได้แก่ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 มก/ล. ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ IBA จำนวน 3 ระดับได้แก่ 0, 0.5 และ 1 มก./ล. เก็บข้อมูลโดยการนับจำนวนยอดและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เวลาและสถานที่

เริ่มการทดลองปี 2557 ถึง 2558

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร จ.ปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สำรวจ และรวบรวม ตัวอย่างต้นรีรัตน์ จากแหล่งธรรมชาติ

จากการสำรวจ และรวบรวม ได้ต้นรีรัตน์ 5 ต้น ฝักแก่ 2 ฝัก และฝักที่ยังไม่สุกแก่เต็มที่ 2 ฝัก เนื่องจากต้นรีรัตน์ขึ้นบนหินปูนในป่าดิบเขา พบได้เฉพาะที่ดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย จากการสำรวจพบประชากรต้นรีรัตน์เหลือเพียงไม่เกิน 500 ต้น และพบเพียงจุดเดียว ไม่มีการกระจายตัว (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 สภาพต้นนรีรัตน์ในแหล่งธรรมชาติ

จากการศึกษาลักษณะต้นนรีรัตน์ในแหล่งธรรมชาติ (ภาพที่ 2) พบว่า นรีรัตน์เป็นพืชล้มลุก เหง้ามีขนหนาแน่น ใบเรียงแผ่ที่โคน มีก้านใบ แผ่นใบเกือบกลมหรือรูปไข่ และมีขนสั้นนุ่มหนาแน่นทั้งสองด้าน ก้านใบยาวและมีขนหนาแน่น (ภาพที่ 3a) ดอกสีม่วงเข้มฝัก ผลแห้งลักษณะเรียวยาวขนาดประมาณเมล็ดข้าว ภายในฝักแก่ประกอบด้วยเมล็ดสีน้ำตาลเข้มขนาดเล็กเป็นผงจำนวนมาก ส่วนเมล็ดในฝักที่ยังไม่แก่เต็มที่ มีสีน้ำตาลอ่อนๆ เป็นผงจำนวนมากและค่อนข้างชื้น (ภาพที่ 3b)

ภาพที่ 2 ลักษณะทรงต้น ใบ และดอกนรีรัตน์ ในสภาพธรรมชาติ

ภาพที่ 3 ลักษณะต้นนรีรัตน์ (a) และฝัก (b) จากแหล่งธรรมชาติ

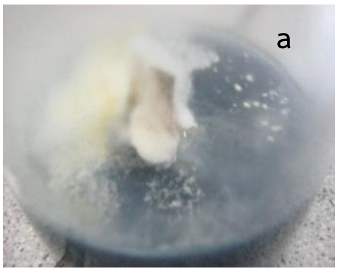
2. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์

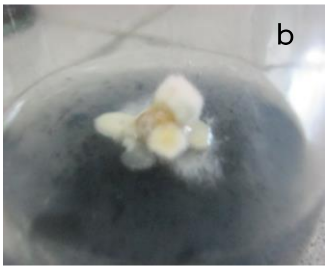
เมื่อได้ตัวอย่างพืชจากแหล่งธรรมชาติ (ภาพที่ 1) ต้นนรีรัตน์และฝัก ซึ่งในแหล่งธรรมชาติมีปริมาณที่จำกัด ดังนั้นจึงได้ตัวอย่างชิ้นส่วนพืชมาศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อปริมาณจำกัด การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ จึงได้นำมาใช้สำหรับฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบในการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์ แบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย ได้ผลดังนี้

2.1. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบด้วยสารละลาย Clorox จากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบนรีรัตน์ด้วยสารละลาย Clorox เข้มข้น 10 % นาน 15 นาที พบว่าชิ้นส่วนใบที่ได้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 100% (ภาพที่ 3)

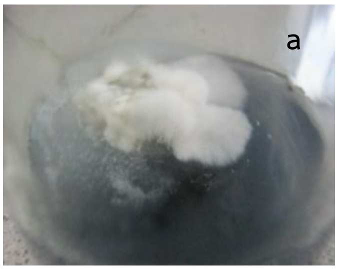
ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนใบที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 10% นาน 15 นาที

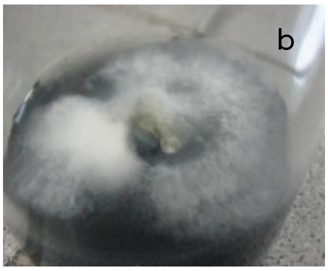
2.2. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.2 และ 0.4% นาน 3 และ 5 นาที พบว่าชิ้นส่วนใบที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 100% (ภาพที่ 5a และ 5b) และ (ภาพที่ 6a และ 6b)





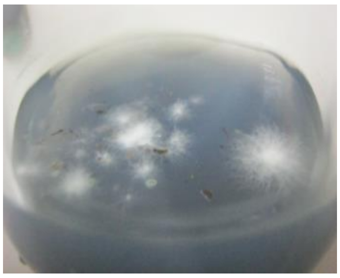
ภาพที่ 5 ชิ้นส่วนใบที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ 0.2% นาน 3 นาที (a) และ นาน 5 นาที (b)





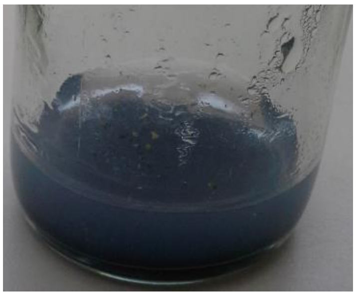
ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนใบที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ 0.4% นาน 3 นาที (a) และ นาน 5 นาที (b)

2.3. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักที่ยังไม่สุกแก่เต็มที่ โดยนำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปลนผ่านไฟ 3 ครั้ง พบว่าได้ชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 100% (ภาพที่ 7)



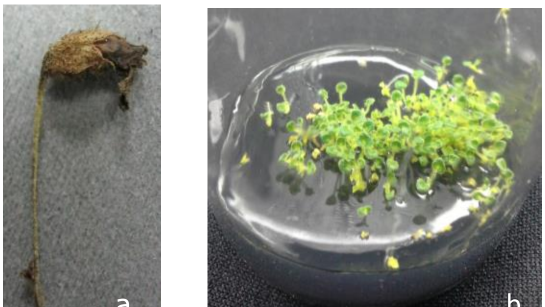
ภาพที่ 7 เมล็ดที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อฝักที่ไม่สุกแก่โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนผ่านไฟ 3 ครั้ง

2.4. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักแก่ โดยนำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปลนผ่านไฟ 3 ครั้ง พบว่า ได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อจุลินทรีย์และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 50% (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 เมล็ดที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อฝักที่สุกแก่โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนผ่านไฟ 3 ครั้ง

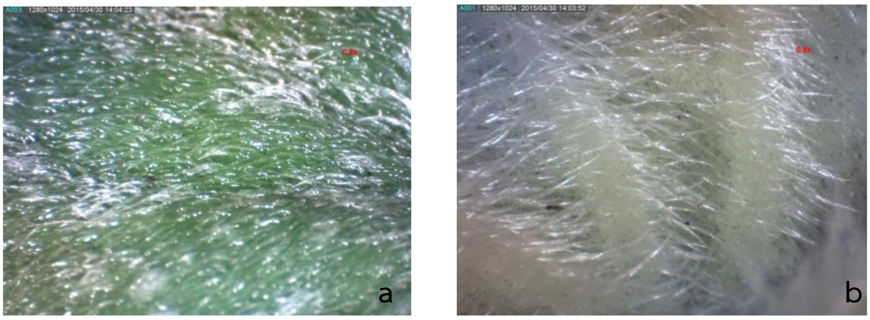
จากการศึกษาพบว่านรีรัตน์ต้องใช้ฝักแก่จึงเหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 9a) โดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนผ่านไฟ 3 ครั้ง เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อจะได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อจุลินทรีย์และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 50% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 3 เดือน (ภาพที่ 9b) ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักที่ยังไม่สุกแก่เต็มที่นั้น ได้ชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 100% อาจเนื่องจากเมล็ดยังไม่มีการพัฒนาเต็มที่ ประกอบกับเมล็ดภายในฝักมีความชื้นค่อนข้างสูงจึงทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด



ภาพที่ 9 ลักษณะฝักแก่ของต้นนรีรัตน์ (a) และต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (b)

การศึกษาฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบนรีรัตน์ พบว่าชิ้นส่วนแผ่นใบไม่เหมาะสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากใบของต้นนรีรัตน์มีขนลักษณะสั้นๆ สีขาวปกคลุมค่อนข้างหนาแน่นและราบไปกับพื้นผิวทั้งบริเวณด้านบนและใต้ของแผ่นใบ (ภาพที่ 10a และ 10b) และสภาพถิ่นที่พบต้นนรีรัตน์ในธรรมชาติเป็นป่า

ที่มีความชื้นค่อนข้างสูง ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก ทำให้การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ และ Clorox ไม่ได้ผลดี คือพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูง แม้จะมีการเติมสารจับใบ คือ Tween 20 แล้วก็ตาม ในขณะที่พืชบางสกุลในวงศ์ Gesneriaceae นี้ สามารถฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบและสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายปริมาณพืชได้ เช่น สกุล *Saintpaulia* (Cassells *et al*., 1986; Lo *et al*., 1997; Mithila *et al*., 2003; Murch *et al*., 2003) และ *Sinningia* (Sunpui and Kanchanapoom, 2002) เนื่องจากมีการนำมาปลูกในสภาพโรงเรือนจนได้ชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างน้อย หรือพืชสกุลเหล่านี้มักผ่านการพัฒนาสายพันธุ์จนเป็นพืชปลูก จึงมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าพืชที่นำมาจากป่า



ภาพที่ 10 ลักษณะขนบนใบ (a) และใต้ใบ (b) เมื่อใช้กล้องกำลังขยาย 0.8x

3. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์

เมื่อได้ชิ้นส่วนนรีรัตน์ที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 3 เดือน จนเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว จึงตัดใบให้มีขนาดเท่าๆ กัน ขนาดประมาณ 0.8 x 0.8 ซม. (ภาพที่ 11) เพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์บนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ จำนวน 15 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 มก./ล. ร่วมกับกลุ่มออกซิน (IBA) ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0, 0.5 และ 1 มก./ล. เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดยอด (multiple shoots)

ภาพที่ 11 เพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์บนอาหารสูตรต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอด

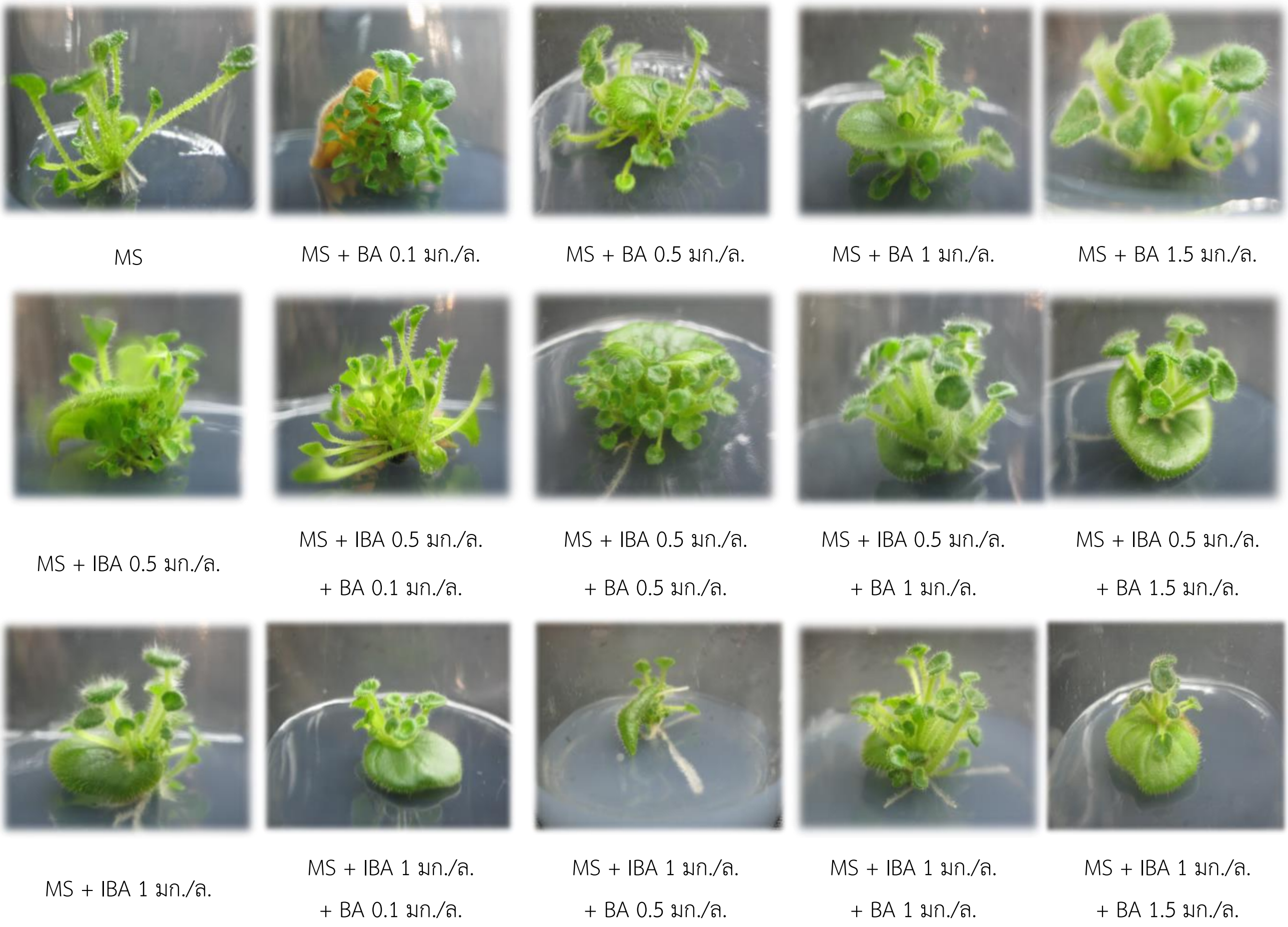
ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม BA และ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดของต้นนรีรัตน์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน

สูตรอาหาร MS +	BA (มก./ล.)					
IBA (มก./ล.)	0	0.1	0.5	1.0	1.5	mean
0	7.1 a	15.5 a	9.8 a	7.4 a	6.5 a	9.3 ab
0.5	16.0 a	9.6 a	14.6 a	10.9 a	6.0 a	11.4 a
1.0	6.6 a	5.6 a	5.6 a	7.3 a	3.9 a	5.8 b
mean	9.9	10.2	10.0	8.5	5.5	8.8
CV (%)	34.23					

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

- ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (IBA) ใช้ตัวอักษร a, b, c

จากการทดลองเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 15 สูตร เป็นเวลา 3 เดือน (ตารางที่ 1) และ (ภาพที่ 12) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IBA ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด คือไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ระดับคือ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 มก./ล. ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดนรีรัตน์เช่นเดียวกัน ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA เพียงอย่างเดียว ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับคือ 0, 0.5 และ 1 มก./ล. มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดต้นนรีรัตน์ โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ทำให้เพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 11.4 ยอด เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบแอฟริกันไวโอเลตพบว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก (Daud and Taha, 2008; Ghasemi *et al*., 2012) และการเติม IBA ในปริมาณมากเกินไปมีผลทำให้เกิดจำนวนยอดลดลง ในขณะที่อาหารที่ไม่ใส่ IBA ทำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 9.3 ยอด สอดคล้องกับการรายงานของ Ma และคณะ (2011) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงใบ *Metabriggsia ovalifolia* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Gesneriaceae พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (IAA, IBA และ NAA) ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เช่นเดียวกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงใบ *Primulima tabacum* บนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวน 32 สูตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 6-8 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากถึง 21 ยอดต่อชิ้นส่วน (Ma *et al*., 2011)



ภาพที่ 12 ลักษณะของนรีรัตน์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BA และ IBA เป็นเวลา 3 เดือน

การนำนรีรัตน์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปลูกในสภาพโรงเรือน จำเป็นต้องใช้วัสดุปลูกที่มีความโปร่งและมีการเก็บรักษาน้ำค่อนข้างดี แต่ต้องไม่รดน้ำจนแฉะเกินไป วัสดุปลูกที่ใช้มีดังนี้ พีทมอส : ดินผสม : เพอร์ไลท์ : หินภูเขาไฟ อัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1 มีอัตราการรอดชีวิต 20% (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 13 แสดงต้นนรีรัตน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์ ได้เทคนิคที่เหมาะสม คือ ฟอกฆ่าเชื้อฝักแก่โดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วลนผ่านไฟ 3 ครั้ง และจากการเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเพิ่มจำนวนยอดพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ MS ที่เติม IBA 0.5 มก/ล. ทำให้เพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 11.4 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองนี้ได้เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชสกุล *Petrocosmea* และได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์นรีรัตน์ (*Petrocosmea pubescens*) ในสภาพปลอดเชื้อ สำหรับการอนุรักษ์ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และเพื่อการวิจัยต่อไปในอนาคต ตลอดจนเป็นการลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของพืชชนิดนี้ จากแหล่งธรรมชาติเนื่องจากเป็นพืชหายากและพืชเฉพาะถิ่นของไทย

11. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนงบวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สถานที่ทำการวิจัย และขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สนับสนุนและร่วมงานวิจัยอย่างเต็มที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ ผู้ค้นพบนรีรัตน์และเอื้ออำนวยข้อมูลสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง

ปราณี ปาลี และวิไลวรรณ อนุสารสุนทร. 2549. พืชวงศ์ชาฤๅษีกับศักยภาพในการพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับ ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการโครงการ BRT** ครั้งที่ 10 8-11 ตุลาคม 2549 จังหวัดกระบี่. 124-131.

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

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

Burtt, B.L. 2001. Flora of Thailand: annotated checklist of Gesneriaceae. **Thai Forest Bulletin** 29: 81-109.

Daskalova, E., Doncheva, S., Yahubyan, G., Minkov, I. and V. Toneva. 2010. Ecological Characterisitvs and Conservation of the Protected Resurrection Species *Haberlea rhodopensis* FRIV. As *in vitro* Plants through a Modified Micropropagation system. **In: Proceedings of the Balkan Scientific Conference of Biology in Plovdiv (Bulgaria)**, pp. 213-217.

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

Ghasemi, Y., Nematzadeh, G.A., Omran, V.G., Dehestani, A. and S. Hosseini. 2012. The effects of explants type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency. **Biharean Biologist.** 6(2): 73-76.

Ji, H. 2008. **China Papers.** Studies on Cytology, Reproductive Biology and Pollen Morphology of *Petrocosmea* (Gesneriaceae) from China. Available source : http://ir.kib.ac.cn:8080/handle/151853/336, August 29, 2011.

Kozak, D., Hetman, J. and M. Witek. 2007. The Influence of the Mineral Composition of the Medium on *in vitro* Propagation of *Kohleria amabilis* (Planch. Et Linden) Fritsch Shoots. **Acta Agrobotanica** 60(1): 95-99.

Lo, K.H., K.L. Giles and V.K. Sawhney. 1997. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Sainnntppaulia ionantha* (African violet) cultured *in vitro*. **Plant Cell Rep.** 16(6): 416-420.

North, J.J. and P.A. Ndakidemi. 2012. Evaluation of Different Ratios of Auxin and Cytokinin for the *in vitro* Propagation of *Streptocarpus rexii* Lindl. **Int. J. Phys. Sci.** 7(7): 1083-1087.

Ma, G.H., Jaime, A.T., Lü, J.F., Zhang, X.H. and J.T. Zhao. 2010. Shoot organogenesis and plant regeneration in *Metabriggsia ovalifolia*. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 105(3): 355-361.

Ma, G.H., He, C.X., Ren, H., Zhang, Q.M., Li, S.J., Zhang, X.H. and B. Eric. 2011. Direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulima tabacum*. **Biologia Plantarum.** 54(2): 361-365.

Middleton, D.J. and P. Triboun. 2010. Two New Species of *Petrocosmea* (Gesneriaceae) from Thailand. **Thai Forest Bull. (Bot.)** 38: 42-47.

Mithila, J., J. Hall, J.M.R. Victor and P.K. Saxena. 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) **Plant Cell Rep.** 21(5): 408-414.

Murashige, T. and T. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-496.

Murch, S.J., J.M.R. Victor and P.K. Saxena. 2003. Auxin, calcium and sodium in somatic embryogenesis of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cv. Benjamin. **Acta Hort.** 625: 201-209.

Otero, O., Nunez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jimenez, SL., Osorio, R.G., Saldarriaga , M. and A.Di. 2000. Snakebites and Ethnobotany in the Northwest Region of Colombia. Part III: Neutralization of the Haemorrhagic Effected of Bothrops Atrox Venom. **Ethnopharmacol** 73: 233-241.

Shaw, J. 2011. A new species of *Petrocosmea*. **The Plantsman.** 10(3): 177-179.

Siddique, N.A., Bari, M.A., Kharn, N., Rahman, M., Rahman, M.H. and Huda, S. 2003. Plant Regeneration from Nodal Segments Derived Callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R.Br. (Anantamul) an Endangered Medicinal Plant in Bangladesh **J. Biol. Sci**. 3: 1158-1163.

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): 357-364.

Tang Z. and H. Lin. 2007. Ripid *in vitro* Multiplication of *Chirita longgangensis* W.T. Wang: An Endangered Gesneriaceae Species in China. **Hort. Sci.** 42(3): 638-641.

Triboun, P. and D.J. Middleton. 2012. *Petrocosmea pubescens*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012. Available source: http://www.iucnredlist.org/details/201813/0, December 2, 2015.

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของนรีรัตน์ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน BA และ IBA เป็นเวลานาน 3 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Sqr(X+0.5)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	14	20.26475425	1.44748245	1.37 ns
CYTO (C)	4	5.15703249	1.28925812	1.22 ns
AUX (A)	2	8.52105902	4.26052951	4.04 *
CxA	8	6.58666274	0.82333284	‹ 1
ERROR	45	47.40066734	1.05334816	
TOTAL	59	67.66542160		

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