

เทคนิคการขยายและอนุรักษ์พันธุ์กรรมภูมิพลินทร์
(*Paraboea bhumiboliana* Triboun & Chuchan) ในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro Propagation and Conservation Technique
of *Paraboea bhumiboliana* Triboun & Chuchan

พัชร ปิริยะวินิต^{1*}, พัฒนารี รัชัคี¹ และปราโมทย์ ไตรบุญ²

Phatchara Piriya-winit^{1*}, Padnaree Rukkid¹ and Pramote Triboun²

Received date: 17 ม.ค. 68 Revised date: 29 ม.ค. 68 Accepted date: 1 พ.ค. 68

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2025.265317>

บทคัดย่อ

ภูมิพลินทร์ เป็นพืชวงศ์แอฟริกันไวโอเลต (Gesneriaceae) ซึ่งจัดเป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศไทย มีการกระจายในพื้นที่จำกัด โดยเฉพาะบริเวณยอดเขาหินปูนในจังหวัดลำพูน และจังหวัดตาก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ภูมิพลินทร์ โดยเริ่มจากการศึกษาเทคนิคฟอกฆ่าเชื้อภูมิพลินทร์ ด้วยการใช้ฝักผ่านไฟฆ่าเชื้อ การใช้น้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อ และการใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 5% ผลการศึกษา พบว่า วิธีจุ่มฝักในเอทานอล 95% ตามด้วยการผ่านไฟฆ่าเชื้อ และเคาะเมล็ดเลี้ยงบนอาหาร เป็นวิธีที่เหมาะสม ทำให้ได้ต้นอ่อนที่ปลอดการปนเปื้อนได้ถึง 55.55% ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดภูมิพลินทร์ โดยเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ร่วมกับ Benzyladenine (BA) เข้มข้น 3 ระดับ คือ 0 0.1 และ 1.0 มก./ล. ผลการศึกษา พบว่า การเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ย 12.1 ยอด/ชิ้นพืชทดลอง สำหรับการศึกษาวิธีชะลอการเจริญเติบโตของภูมิพลินทร์ ทำโดยเลี้ยงยอดภูมิพลินทร์บนสูตรอาหาร MS 1/2 MS 1/4 MS และ 1/8 MS ผลการศึกษา พบว่า การเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร 1/2 MS สามารถชะลอการเจริญเติบโต โดยพืชคงความมีชีวิตได้นานถึง 12 เดือน แม้ปราศจากการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

คำสำคัญ: พืชถิ่นเดียว การขยายพันธุ์ การเก็บรักษาด้วยวิธีชะลอการเจริญเติบโต

Abstract

Paraboea bhumiboliana Triboun & Chuchan, a native plant species of Thailand, is classified in Gesneriaceae family. Its distribution is limited, particularly found on the limestone mountain peaks in Lamphun and Tak Province. This research was carried to study the propagation methods for *P. bhumiboliana*, starting with the evaluation of sterilization techniques by burning seed pod with flame, soaking seed in sterilized water and treating seed with 5% hydrogen peroxide (H_2O_2) solution. The result showed that the immersion of mature seed capsules in 95% ethanol followed by burning the capsule's outer surface was the optimum sterilization method which reached 55.55% non-contamination. The study on shoot multiplication by transferring plantlets to Murashige and Skoog (MS) medium added with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzyladenine (BA) was also carried out. The findings revealed that 0.1 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA induced an average vigorous shoot at 12.1 shoots per explant. *In vitro* conservation through slow growth storage technique of *P. bhumiboliana* by culturing on MS, 1/2 MS, 1/4 MS and 1/8 MS. was attempted. It was revealed that after being cultured on 1/2 MS, the cultures maintained viabilities for 12 months without any subculture and developed their new plantlets.

Keywords: Endemic species, micropropagation, slow growth storage

คำนำ

ภูมิพลินทร์ (*Paraboea bhumiboliana* Triboun & Chuchan) อยู่ในวงศ์แอฟริกันไวโอเลต (Gesneriaceae) เป็นไม้พุ่มสูง 20-60 ซม. ขึ้นบนหินผา แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มจำนวนมาก ลำต้นมีเนื้อไม้แข็งบริเวณโคนต้น เปลือกไม้แตกเป็นร่องตามแนวยาว

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี 12110

² ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

¹ Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani, 12110

² National Biobank of Thailand, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani, 12120

* Corresponding author: phatchara.p@doa.in.th

มีสีน้ำตาลอมเทา ยอดยาว 10-15 ซม. กิ่งเรียวเล็ก ใบเรียงสลับตรงข้ามแบบตั้งฉาก ใบคล้ายแผ่นหนัง รูปรี รูปขอบขนาน หรือ รูปไข่ กว้าง 1.5-2.5 ซม. ยาว 2.5-6 ซม. ปลายมน โคนรูปกลมหรือมน ขอบหยักมนตื้น ใต้ใบปกคลุมด้วยขนแบบใยแมงมุมมีสีขาว ช่อดอกประกอบด้วยดอกเดี่ยวหรือช่อดอกกระจุกสั้นพบที่ปลายยอดหรือซอกใบใกล้ปลายของกิ่ง มีใบประดับย่อยและใบประดับใต้ช่อดอก มีกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ ที่บริเวณโคนฐานเชื่อมติดกันปลายแยกเป็น 5 แฉก 3 แฉกบนติดกัน 2 แฉกล่างแยกกันเป็นอิสระ กลีบดอกเชื่อมติดกันที่โคนแล้วค่อยผายออกคล้ายรูปประฆัง สีชมพูถึงม่วงอ่อน ปลายแยกเป็น 5 แฉก ที่โคน 3 แฉกล่างมีแต้มกลมสีเหลือง เกสรเพศผู้ติดบนกลีบดอก 2 อัน เกสรเพศผู้ลดรูปจนมีขนาดเล็ก (เป็นหมัน) 3 อัน รังไข่มีขนสั้นหนาแน่นปกคลุม ยอดเกสรเพศเมียเป็นแถบรูปรี (Figure 1) ผลแบบผลแห้งแตก เมื่อแก่บิดเป็นเกลียว ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก ออกดอกและติดฝักช่วงเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พืชชนิดนี้พบเฉพาะถิ่นในบริเวณแก่งหินปูนจังหวัดลำพูนและจังหวัดตาก และมีการกระจายตัวในพื้นที่ที่มีลักษณะเฉพาะเป็นเนินลาดผาหินเหนือแม่น้ำ แม้ว่ามีการประเมินของ International Union for Conservation of Nature (IUCN) ว่าเป็นพืชที่ไม่ค่อยน่ากังวลเนื่องจากพบมีบางส่วนอยู่ในพื้นที่อนุรักษ์ (Triboun and Middleton, 2012)



Figure 1 Characteristics of the stems (a), leaves (b), and flowers (c) of *Paraboea bhumiboliana* in its natural habitat

แต่ด้วยปัจจุบันมีสภาวะการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศอย่างกะทันหันและต่อเนื่อง การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคหนึ่งที่สำคัญที่ช่วยสนับสนุนการขยายและป้องกันการสูญหายของเชื้อพันธุ์จากภัยธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่มีการกระจายตัวในพื้นที่จำกัดและมีลักษณะเฉพาะ ซึ่งการอนุรักษ์โดยใช้เทคนิคการชะลอการเจริญเติบโต (*in vitro* slow growth) ซึ่งเป็นวิธีการอนุรักษ์ที่สามารถนำเชื้อพันธุ์พืชมาใช้ประโยชน์ได้ทันที ด้วยการเลี้ยงให้เนื้อเยื่อพืชเกิดอัตราการเจริญเติบโตช้าลง แต่สามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ในเวลานาน เพื่อลดการย้ายเนื้อเยื่อหรือระยะเวลาเปลี่ยนถ่ายอาหาร (Chauhan et al., 2019) ซึ่งอาจใช้วิธีการลดปริมาณอาหาร หรือการใช้สารทดแทนน้ำตาล sucrose เช่น sorbitol หรือ mannitol ในการชะลอการเจริญในมันฝรั่ง (*Chilotanum* group) (Muñoz et al., 2019) แอฟริกันไวโอเล็ต (Moges et al., 2003) ตลอดจนการเพิ่มปริมาณ sucrose เนื่องจาก sucrose มีผลต่อค่า osmotic pressure ของพืช หรือการปรับสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต เช่น การลดอุณหภูมิ ซึ่งวิธีการดังกล่าวไม่ส่งผลต่อลักษณะภายนอกและคุณภาพของเนื้อเยื่อ ทั้งนี้มีการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตในพืชหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่นการใช้วิธีการปรับลดปริมาณอาหารและควบคุมสภาพแวดล้อมในไม้ผลหลายชนิด (Benelli et al., 2022) นอกจากนี้มีงานวิจัยในลิลี่ป่า 2 ชนิด ได้แก่ *Lilium davidii* และ *Lilium longiflorum* โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/4 MS ร่วมกับการเติม abscisic acid (ABA) เข้มข้น 3.0 มก./ล. ที่อุณหภูมิ -2°C ได้นาน 15 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร เพื่อเก็บรักษาสำหรับเป็นฐานพันธุ์กรรมลิลี่ (Du et al., 2012)

วิธีการศึกษา

รวบรวมตัวอย่างฝักภูมิพลินท์จากบริเวณพื้นที่ยอดเขาหินปูนจังหวัดตากและลำพูน ช่วงเดือนพฤศจิกายน ซึ่งภูมิพลินท์มีการออกดอกและติดฝักช่วงกรกฎาคม-ธันวาคม โดยเลือกใช้ฝักแก่จากแหล่งธรรมชาติที่มีลักษณะแห้งผิวฝักภายใต้ขนมีสีน้ำตาล เพื่อดำเนินการศึกษา 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักภูมิพลินท์ ซึ่งฝักมีขนหนาปกคลุมควรดึงและขูดขนที่อยู่บนผิวฝักภูมิพลินท์ให้สะอาด ล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาด และนำมาศึกษาการพอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเผาฝักแบ่งเป็น 3 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 นำฝักจุ่มในเอทานอล 95% แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการผ่านเปลวไฟ หลังจากนั้นบดฝักให้แตกและเคาะเมล็ดใส่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เตรียมไว้ 3 ขวด/ฝัก โดยเคาะเมล็ดให้มีปริมาณเมล็ดต่อขวดใกล้เคียงกัน

กรรมวิธีที่ 2 นำฝักจุ่มในเอทานอล 95% แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการผ่านเปลวไฟ หลังจากนั้นบดฝักให้แตกและเคาะเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้เมล็ดทั้งหมดที่ได้จาก 1 ฝัก/น้ำ 3 มล. จากนั้นดูดเมล็ดด้วย syringe ปริมาณ 0.5 มล. ฟันบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เตรียมไว้

กรรมวิธีที่ 3 นำฝักจุ่มในเอทานอล 95% แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการผ่านเปลวไฟ หลังจากนั้นบดฝักให้แตกและเคาะเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่มีเติมสาร hydrogen peroxide (H_2O_2) เข้มข้น 5% อัตราส่วน 2:1 โดยเมล็ดทั้งหมดที่ได้จาก 1 ฝัก/สารละลาย 3 มล. จากนั้นดูดเมล็ดด้วย syringe ปริมาณ 0.5 มล. ฟันบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เตรียมไว้

อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ปริมาณ 20 มล. ในขวดขนาด 4 ออนซ์ จำนวน 3 ขวด ข้างละ 6 ขวด เลี้ยงภายใต้สภาพควบคุมโดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลานาน 3 เดือน บันทึกจำนวนการปลดการปนเปื้อนของเชื้อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากขวดเพาะเลี้ยง

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดยอด โดยนำต้นอ่อนภูมิพลินทร์ความสูงประมาณ 1 ซม. ที่ได้จากการเพาะเมล็ด เพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 0.1 และ 1.0 มก./ล. ร่วมกับ benzyladenine (BA) เข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 0.1 และ 1.0 มก./ล. จำนวน 5 ขวด ข้างละ 5 ขวด วางแผนการทดลองแบบ CRD จัดสิ่งทดลองแบบ Factorial เลี้ยงภายใต้สภาพควบคุมโดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยง บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตที่สังเกตได้ จำนวนยอดที่สมบูรณ์ และขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) เลี้ยงเป็นเวลานาน 6 เดือน

การทดลองที่ 3 ชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำยอดภูมิพลินทร์ที่มีจำนวน 4 ข้อต่อยอดเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ MS 1/2 MS 1/4 MS และ 1/8 MS โดยใช้น้ำตาล 30 ก./ล. วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 8 ขวด ข้างละ 3 ขวด เลี้ยงภายใต้สภาพควบคุมโดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยง บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตที่สังเกตได้ และร้อยละการรอดชีวิต

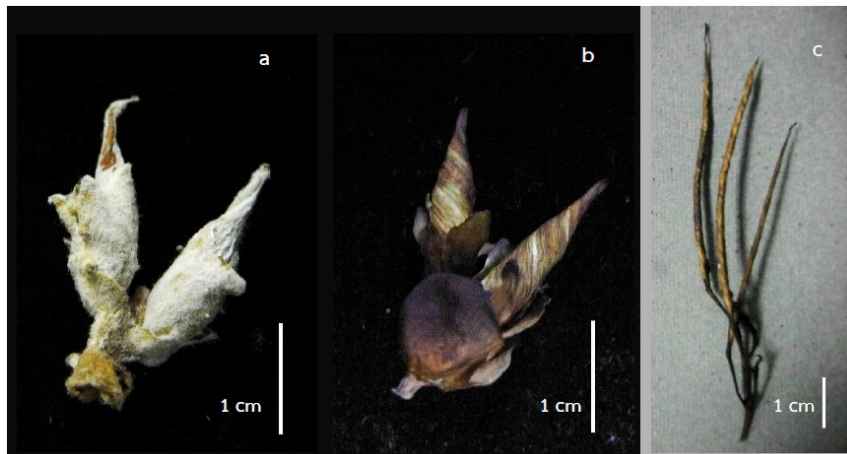
ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อฝักของภูมิพลินทร์ที่เหมาะสมควรดึงและชุดขนที่อยู่บนผิวฝักภูมิพลินทร์ให้สะอาด ล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาด หลังจากนั้นจุ่มฝักในเอทานอล 95% แล้วนำไปฆ่าเชื้อผ่านไฟฆ่าเชื้อ บดฝักที่เป็นเกลียวให้แตกและเคาะเมล็ดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยพบจำนวนตัวอย่างการปลดการปนเปื้อนของเชื้อ 55.55% (Table 1) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้สอดคล้องกับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝักของนครินทรา (*Paraboea sangwaniae*) (Piriyavinit et al., 2012) แต่แตกต่างจากวิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤๅษีตอดตุ้ง (*Paraboea doitungensis*) (Piriyavinit et al., 2018a) ทั้งนี้ แม้จะเป็นพืชสกุลเดียวกันและลักษณะของฝักเป็นแบบแห้งแตกมีลักษณะบิดเป็นเกลียวเช่นเดียวกัน โดยภายในมีเมล็ดเล็กเป็นผงจำนวนมาก (Triboun and Middleton, 2012) แต่มีลักษณะรูปทรงและผิวสัมผัสของฝักที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน (Figure 2) โดยฝักภูมิพลินทร์และฝักนครินทรา มีลักษณะเป็นฝักแห้งแตกรูปทรงกระบอกกว้าง (ellipsoid capsule) เช่นเดียวกัน โดยฝักภูมิพลินทร์มีความยาว 1.5 – 2.0 ซม. ความกว้าง 3.0 – 6.0 มม. มีขนสีขาวปกคลุม ส่วนฝักชาฤๅษีตอดตุ้งมีรูปทรงที่แตกต่างคือเป็นรูปทรงกระบอกแคบ (narrowly cylindric capsule) ซึ่งลักษณะรูปทรงกระบอกแคบมีผลต่อการปริแตกของฝักหรือการได้รับความเสียหายของฝักทั้งก่อนและระหว่างการฟอกฆ่าเชื้อได้ง่ายกว่า ทำให้ต้องเพิ่มเติมส่วนของการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยการใช้สาร H_2O_2 ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช (Thainum et al., 2012) หากเป็นฝักภูมิพลินทร์ที่มีรูปทรงกระบอกกว้างจะสามารถใช้วิธีผ่านไฟโดยไม่ต้องเคาะเมล็ดใส่ในน้ำ และนำไปเพาะบนอาหารสูตร MS ได้ทันที ทำให้ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน รวมถึงลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจากขั้นตอนต่าง ๆ จากการสัมผัสเมล็ดได้ สอดคล้องกับการฟอกฆ่าเชื้อนครินทร์ (*Petrocosmea pubescens*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์แอฟริกันไวโอเล็ตเช่นเดียวกัน (Rukkid et al., 2023) ด้วยเหตุนี้หากพบการแตกของฝักภูมิพลินทร์อาจต้องใช้ H_2O_2 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดตามรายงานการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สาร H_2O_2 ในเมล็ด *Aconitum heterophyllum* (Srivastava et al., 2010) เมล็ด *Rhododendron wardii* (Amarasinghe et al., 2018) และ เมล็ด *Cannabis sativa* (Sorokin et al., 2021) เป็นต้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนของเชื้อจากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดภูมิพลินทร์ได้ โดยเมื่อเพาะเมล็ดบนอาหาร MS นานประมาณ 1 เดือนเมล็ดจะเริ่มงอก ซึ่งแม้จะมีปริมาณเมล็ดเป็นผลจำนวนมากแต่พบการงอกเป็นต้นไม่มากนัก (Figure 3)

Table 1 Effect of seed pods of *P. bhumiboliana* sterilization on the rate of survival for 3 months

Methods of Sterilization	Non-contaminated rate (%)
Burning seed capsules	55.55
Burning seed capsules + dipping in sterile water (H ₂ O)	0
Burning seed capsules + dipping in 5% hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	22.22

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดจากต้นอ่อนภูมิพลินทร์ความสูงประมาณ 1 ซม. อายุประมาณ 3 เดือน (Figure 3) พบว่ามีการเกิดกลุ่มยอดอ่อนขนาดเล็กหนาแน่นเป็นจำนวนมากแม้เลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยบางยอดพัฒนาเป็นยอดขนาดใหญ่และสมบูรณ์ได้ (Figure 3) ซึ่งพบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง BA และ 2,4-D ที่มีผลกระทบกับจำนวนยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ โดยเมื่อเติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. เกิดยอดขนาดใหญ่ที่สมบูรณ์มากที่สุด 12.1 ยอด/ชิ้นพืชทดลอง ส่วนการขยายความกว้างของกลุ่มยอดขนาดเล็กนั้นเป็นผลจาก 2,4-D และ BA โดยไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2,4-D และ BA ซึ่งเมื่อเติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. จึงเห็นผลความแตกต่างทางสถิติของความกว้างของกลุ่มยอดขนาดเล็ก ส่วนการเติม BA จะสามารถชักนำให้เกิดกลุ่มยอดอ่อนที่มีขนาดเล็กและไม่สมบูรณ์ได้มากกว่าไม่เติม BA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเติม BA มีแนวโน้มชักนำให้เกิดกลุ่มยอดที่มียอดอ่อนขนาดเล็กที่ไม่สมบูรณ์จำนวนมากขึ้น แต่หากเติม 2,4-D ความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.1 มก./ล. จะช่วยในการชักนำการเกิดยอดที่สมบูรณ์ แต่ถ้าสูงเกินเป็น 1.0 มก./ล. มีแนวโน้มในการเกิดกลุ่มยอดขนาดเล็กเพิ่มขึ้น (Table 2 และ Figure 4) ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำการเกิดยอดที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยพืชสกุลนี้มีแนวโน้มการเกิดกลุ่มยอดขนาดเล็กที่ลักษณะไม่แข็งแรงจำนวนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BA แต่เมื่อเติมสารกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D หรือ Indole-3-butyric acid (IBA) เพียงอย่างเดียว ชักนำการเกิดยอดสมบูรณ์ดังรายงานการชักนำต้นอ่อนนครินทรา (Piriavinit et al., 2012; 2018b) และการใช้ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ชักนำใบชาฤๅษีตอดึงให้เกิดยอดสมบูรณ์ (Piriavinit et al., 2018a) แต่ทั้งนี้หากเพิ่มสารที่ควบคุมการเจริญเติบโตทั้งออกซินหรือไซโตไคนินมากกว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมมีแนวโน้มทำให้เกิดกลุ่มยอดขนาดเล็กที่ไม่แข็งแรงหนาแน่นจำนวนมากขึ้นและเกิดยอดที่สมบูรณ์ลดลง โดยมีรายงานการรวบรวมผลการศึกษการขยายพันธุ์พืชวงศ์ Gesneriaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกันกับภูมิพลินทรในสภาพปลอดเชื้อ เช่น การเลี้ยงแคลลัสแอฟริกันไวโอลีตบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 200 มก./ล. นาน 18 นาที แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.2 มก./ล. เพื่อชักนำการเกิดยอด หรือการใช้ Thidiazuron (TDZ) เข้มข้นต่ำ 0.001 - 0.002 มก./ล. ชักนำการเกิดยอดจากก้านและใบของแอฟริกันไวโอลีตได้ดีกว่าใช้ BA (da Silva et al., 2017) หรือการเพิ่มความเข้มข้นของ BA ส่งผลต่อการเกิดยอดของกล็อกซิเนีย (Sharma and Sharma, 2013) และการขยายลูกผสมกล็อกซิเนียพันธุ์ 'Strawberry Ice-Cream' บนอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับการเติม Indole-3-acetic acid (IAA) เข้มข้น 0.2 มก./ล. (Zaripova et al., 2020) ดังนั้นในการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงควรศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมทั้งสารกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโตไคนินที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งมีความเฉพาะในแต่ละชนิดของเชื้อพันธุ์และชิ้นส่วนที่ใช้ในการชักนำต่อไป

**Figure 2** Pod of *Paraboea bhumiboliana* (a), *P. sangwaniae* (b) and *P. doitungensis* (c)

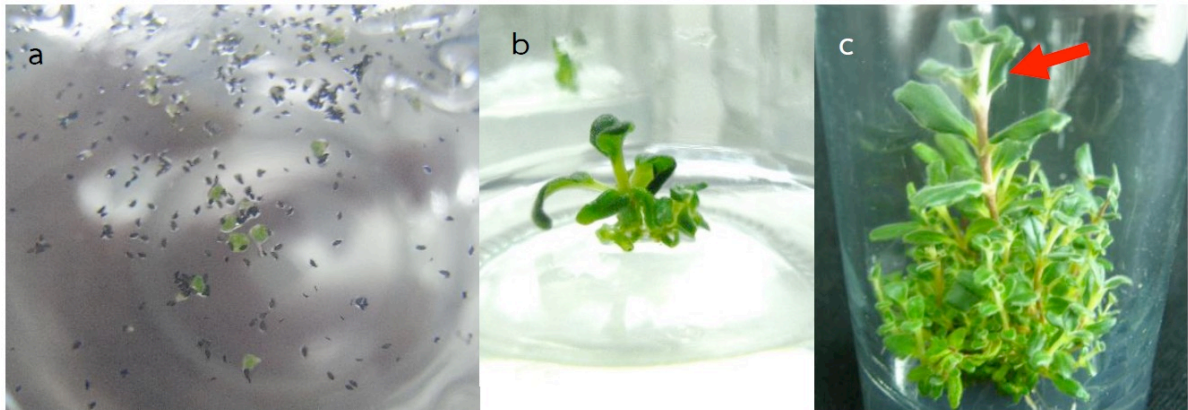


Figure 3 Characteristics of *P. bhumiboliana* plantlets cultured on MS medium for 1 month (a) 3 months (b) and vigorous shoots (c)

Table 2 Effects of 2,4-D and BA combination on shoot multiplication from plantlets of *P. bhumiboliana* cultured on MS medium for 6 months

2,4-D (mg/l)	Number of vigorous shoots				Shoot formation (cm)			
	BA (mg/l)				BA (mg/l)			
	0	0.1	1.0	mean	0	0.1	1.0	mean
0	8.3±0.06 ^{a x}	4.9±0.06 ^{b y}	3.7±0.07 ^{b x y}	5.9	2.18±0.06	2.36±0.08	2.40±0.04	2.31 ^y
0.1	9.2±0.05 ^{b x}	12.1±0.04 ^{a x}	5.5±0.06 ^{c x}	8.8	2.20±0.04	2.36±0.05	2.20±0.04	2.25 ^y
1.0	9.3±0.04 ^{a x}	3.8±0.03 ^{b y}	2.3±0.13 ^{b y}	5.1	2.58±0.03	2.58±0.05	2.62±0.06	2.59 ^x
mean	8.9	7.1	3.8		2.32 ^b	2.43 ^a	2.41 ^a	
<i>F</i> -test (BA)		**				**		
<i>F</i> -test (2,4-D)		**				*		
<i>F</i> -test (BA×2,4-D)		**				ns		
CV (%)		24.2				14.9		

Means within columns and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT (N=45)

ns = not significant

* = significant at 5% level

** = significant at 1% level

- The a, b, c combinations compare the difference in concentration of cytokinin (BA)

- The x, y, z combinations compare differences in concentrations of auxin (2,4-D)

Transformation efficiency: Number of shoots are log (X+1) transformed value

การทดลองที่ 3 การชะลอการเจริญเติบโตของต้นภูมิพลินท์ โดยการลดปริมาณความเข้มข้นของอาหารสูตร MS พบว่าลักษณะต้นมีขนาดเล็กเมื่อเลี้ยงยอดบนอาหาร MS โดยเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 เดือนต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (subculture) อย่างน้อยหนึ่งครั้งเนื่องจากมีการแตกยอดเป็นกลุ่มยอดหนาแน่นจำนวนมาก ส่วนการปรับลดปริมาณสูตรอาหาร MS ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการชะลอการเจริญเติบโตเนื่องจากการลดสารอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของพืช โดยพบว่าการเลี้ยงภูมิพลินท์บนสูตรอาหาร 1/8 MS และ 1/4 MS พบอาการแห้งเหี่ยวของยอดที่สมบูรณ์เกิดมากขึ้น เป็นสาเหตุให้ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างน้อยหนึ่งครั้ง เช่นเดียวกัน ส่วนต้นภูมิพลินท์ที่เลี้ยงบนอาหาร 1/2 MS พบว่ายังมีร้อยละการรอดชีวิต 87.50% เมื่อเลี้ยงนาน 8 เดือน (Figure 5) และสามารถเลี้ยงต้นภูมิพลินท์บนสูตรอาหาร 1/2 MS ได้นาน 1 ปี แม้ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงยอดนครินทรพาลบนอาหารสูตร 1/2 MS ได้นาน 1 ปี โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารและต้นยังคงสมบูรณ์ (Piriyavinit et al., 2018b) ทั้งนี้ มีการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโต โดยการปรับลดธาตุอาหารในพืชหลายชนิด เช่น ใน *Globba adhaerens* Gagnep พบว่าการลดปริมาณธาตุอาหารลงเหลือ 1/2 MS และ 1/4 MS ร่วมกับการลดน้ำตาลทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าไม่เติมน้ำตาล (Iida et al., 2020) และการชะลอการเจริญเติบโตพืชสกุลลิลลี่ ได้แก่ David's lily และ Easter lily

สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ดี โดยเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/4 MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 9% หรือ เติมน้ำ Absciscic acid (ABA) เข้มข้น 3.0 มก./ล. (Du et al., 2012) หรือการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอโกลนีมา (*Aglaonema*) โดยเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/4 MS ร่วมกับการเติม BAP เข้มข้น 1.0 มก./ล. และ IAA เข้มข้น 1.0 มก./ล. (Nugrahani et al., 2024) ในการทดลองนี้ ยังพบการเกิดรากในต้นภูมิพลินทร์เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ลดความเข้มข้นของสูตรอาหารเป็น 1/4 MS และ 1/8 MS แต่รากมีสีน้ำตาล ไม่สมบูรณ์ ซึ่งการปรับลดปริมาณธาตุอาหารของ MS มีรายงานว่าสามารถชักนำการเกิดรากได้ ซึ่งมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงยอด *Paraboea doitungensis* บนสูตรอาหาร 1/2 MS เพื่อชักนำราก (Piriyavinit et al., 2018a) และการชักนำรากในหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana bertonii*) โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.2 ppm (Asmono et al., 2021)

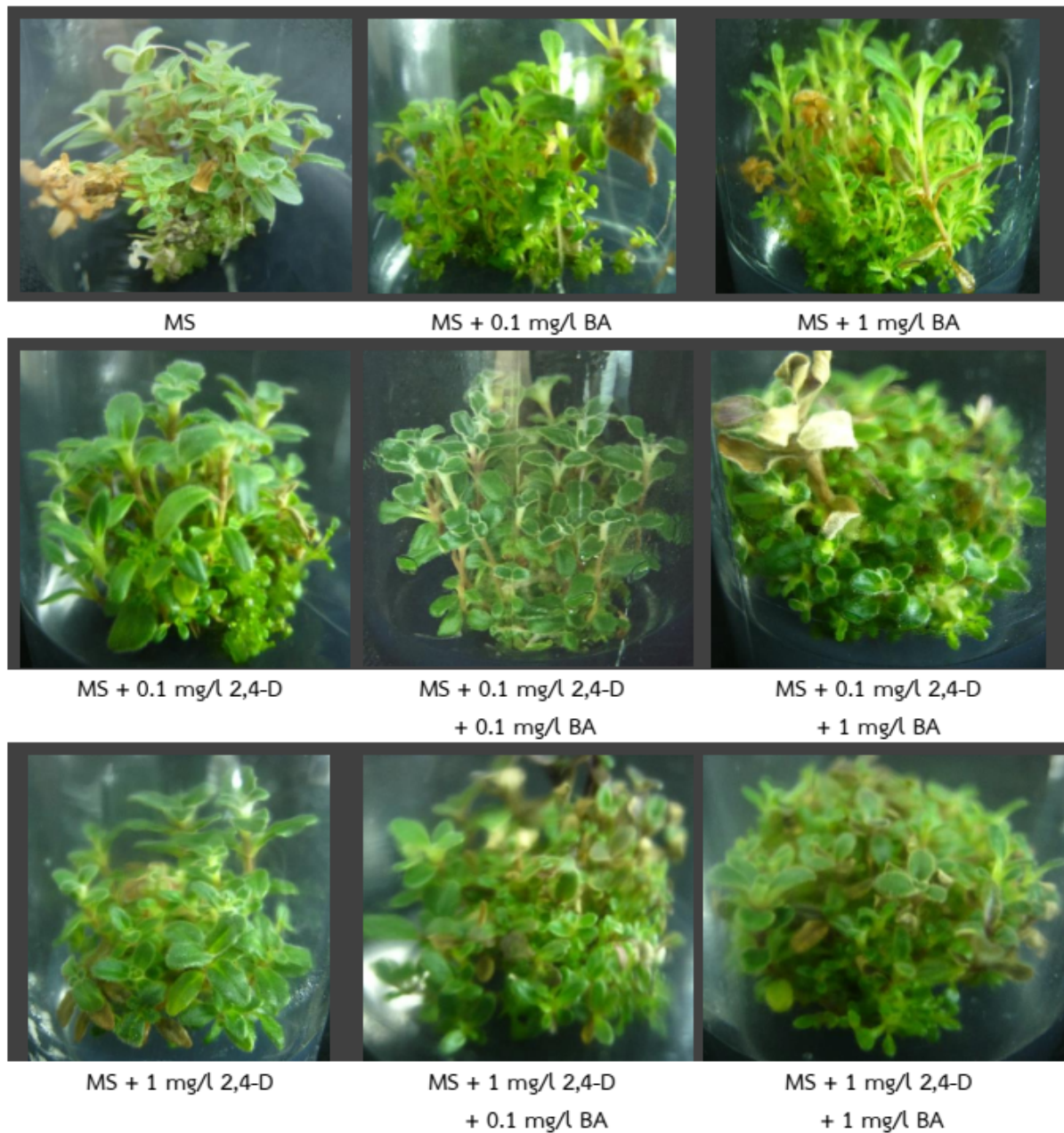


Figure 4 Shoot proliferation after plantlets of *P. bhumiboliana* were cultured on MS medium supplemented with different concentration of 2,4-D and BA for 6 months

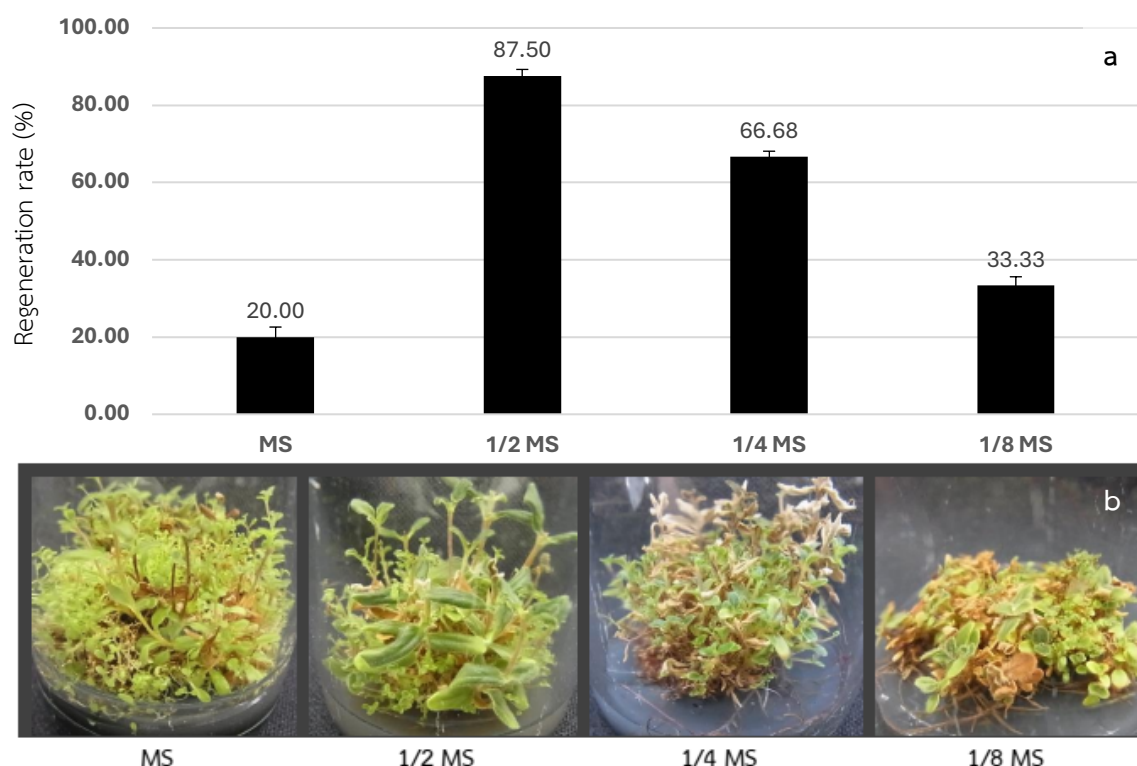


Figure 5 Effect of MS medium concentration on the regeneration rate (a) and morphological characteristics (b) of *P. bhumiboliana* shoots cultured from *in vitro* conservation for 8 months

สรุปผลการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อผิวผักแก่ภูมิพลินท์ที่มีลักษณะแห้ง ควรทำโดยนำผักมาล้างและชุบน้ำที่อุณหภูมิห้องให้สะอาด ล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาด หลังจากนั้นจุ่มผักในเอทานอล 95% แล้วนำผักผ่านไฟเผาเชื้อ ปิดผักที่เป็นเกลียวให้แตกและเคาะเมล็ดลงเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ซึ่งทำให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 55.55% และเมื่อนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ย 12.1 ยอด/ชิ้นพืชทดลอง สำหรับการชะลอการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเลี้ยงยอดภูมิพลินท์บนอาหาร 1/2 MS ทำให้ยังคงอัตราการรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ เมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 1 ปี โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร

ผลประโยชน์ทับซ้อน

บทความวิจัยนี้เป็นผลงานที่ได้จากการวิจัยโดยได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัย ตลอดจนคณะเจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตรที่ให้การสนับสนุนในการปฏิบัติงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง

การมีส่วนร่วมในการเขียนบทความของผู้เขียน

พัชร ปิริยะวินิตร ผู้เขียนบทความ เป็นผู้มีส่วนร่วมในการปฏิบัติงานวิจัยการขยายและอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ภูมิพลินท์ ตั้งแต่วางแผนการวิจัย ศึกษาภาคสนามรวบรวมเชื้อพันธุ์ บันทึก วิเคราะห์ และสรุปผลการวิจัย โดยมีผู้ร่วมวิจัยทั้ง 2 ท่านเป็นผู้มีส่วนร่วมในการสนับสนุนการปฏิบัติงานวิจัย ได้แก่ คุณพัฒน์นรี รักษัคคิต มีส่วนร่วมปฏิบัติงานทดลองในสภาพปลอดเชื้อ และ คุณปราโมทย์ ไตรบุญ มีส่วนร่วมในการสำรวจรวบรวมเชื้อพันธุ์ภาคสนาม ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับเชื้อพันธุ์พืช

เอกสารอ้างอิง

- Asmono, S. L., Rahmawati, A., & Sjamsijah, N. (2021). The effect of murashige and skoog (MS) modified medium and several types of auxins on the growth of stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) *in vitro*. **IOP Conference Series Earth and Environmental Science**, 672(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/672/1/012001>.
- Amarasinghe, R. M. N. T., Wang, J. H., Xie, W. X., Peng, L. C., Li, S. F., & Li, H. (2018). Seed-sterilization of *Rhododendron wardii* for micropropagation. **Sri Lanka Journal of Food and Agriculture**, 4(1), 9-14.
- Benelli, C., Tarref, W., Izgu, T., & De Carlo, A. (2022). *In vitro* conservation through slow growth storage technique of fruit species: an overview of the last 10 years. **Plants**, 11(23), 3188. <https://doi.org/10.3390/plants11233188>.
- Chauhan, R., Singh, V., & Quraishi, A. (2019). *In vitro* conservation through slow-growth storage. In Faisal, M. and Alatar, A. A. (eds.). 2019. **Synthetic Seeds**, pp. 397-416. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19.
- Da Silva, J. S. T., Zeng, S., Wicaksono, A., Kher, M. M. Kim, H., Hosokawa, M., & Dewir, Y. H. (2017). *In vitro* propagation of African violet: a review. **South African Journal of Botany**, 112(1), 501-507.
- Du, Y. P., Li, W. Y., Zhang, M. F., He, H. B. & Jia, G. X. (2012). The establishment of a slow-growth conservation system *in vitro* for two lily species. **African Journal of Biotechnology**, 11(8), 1981-1990.
- Iida, K., Kaewsom, P., & Wongchaochant, S. (2020). Slow growth culture media for *in vitro* short-term storage of *Globba adhaerens* Gangnep. In **Proceedings of the 58th Kasetsart University Annual Conference**, pp. 223-230. Kasetsart University.
- Moges, A. D., Karam N. S., & Shibli, R. A. (2003). Slow growth *in vitro* preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) **Advances in Horticultural Science**, 17(4), 223-230.
- Muñoz, M., Díaz, O., Reinún, W., Winkler, A., & Quevedo, R. (2019). Slow growth *in vitro* culture for conservation of *Chilotanum* potato germplasm. **Chilean Journal of Agricultural Research**, 79(1), 26-35. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000100026>.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3), 473-497.
- Nugrahani, P., Purnobasuki, H., & Sitawati, S. (2024). Composition of media for *in vitro* slow growth storage (sgs) of *Aglaonema*. **Ornamental Horticulture**, 30(1), e242696. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v30.e242696>.
- Piriyavinit, P., Rukkid, P., Triboun, P., & Sangkasa-ad, P. (2012). Study on micropropagation technique of *Trisepalum sangwaniae* an endemic species in Thailand. In **Proceedings of the 2nd National Conference Khon Kaen University, Nongkhai Campus**, pp. 395-400. Khon Kaen University, Nongkhai Campus. (in Thai).
- Piriyavinit, P., Rukkid, P., & Kanjanawattanawong, P. (2018a). Micropropagation technique of *Paraboea doitungensis* for conservation. **Thai Agricultural Research Journal**, 36(3), 268-278. (in Thai).
- Piriyavinit, P., Rukkid, P., Sangkasa-ad, P., & Triboun, P. (2018b). *In vitro* conservation technique of *Paraboea sangwaniae*. In **The 12th Botanical Conference of Thailand**, pp. 187-188. Mahasarakham University. (in Thai).
- Rukkid, P., Piriyavinit, P., & Triboun, P. (2023). The *in vitro* multiplication technique of *Petrocosmea pubescens*, an endemic species of Thailand. In **The 20th KU KPS National Conference**, pp. 281. Kasetsart University, Kamphang Saen Campus. (in Thai).
- Sharma, S. K., & Sharma, M. (2013). Improved protocol for *in vitro* propagation of gloxinia (*Sinningia* sp.). **Journal of Cell and Tissue Research**, 13(1), 3545-3548.
- Sorokin, A., Yadav, N. S., Gaudet, D., & Kovalchuk, I. (2021). Development and standardization of rapid and efficient seed germination protocol for *Cannabis sativa*. **Bio-protocol**, 11(1), e3875. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3875>.
- Srivastava, N., Kamal, B., Sharama, V., Negi, Y. K., Dovriyal, A. K., Gupta, S., & Jadon, V. S. (2010). Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum hererophyllum* - An endangered medicinal herb. **Academic Arena**, 2(6), 62-66.
- Thainum, K., Thonnalak, T., & Tapingkae, T. (2012). Hydrogen peroxide – an effective agent for the sterilization of plant tissue culture media. **Rajabhat Chiang Mai Research Journal**, 13(1), 149-155. (in Thai).
- Triboun, P., & Middleton, D. J. (2012). Twenty new species of *Paraboea* (Gesneriaceae) from Thailand. **Gardens' Bulletin Singapore**, 64(2), 333-370.
- Zaripova, A. A., Mukhametvafina, A. A., Urazbakhtina, K. A., Shigapava, A. I., Akhmetova, A. Sh., & Shigapov., Kh. (2020). Development of clonal micropropagation technique for *Gloxinia hybrida* hort. "Strawberry Ice-Cream". **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 941(1), 012029. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/941/1/012029>.