

## การชักนำแคลลัสจากอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจรในสภาพปลอดเชื้อ

### Callus Induction from *in vitro* Anther Culture of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees

จินตภา อ่วมอ้า<sup>1\*</sup> ปัทมา หาญนอก<sup>2</sup> สุเทพ วัชรเวชสงคราม<sup>1</sup> และ เท็ดศักดิ์ โทณลักขณ<sup>3</sup>

Jinthapa Aumum<sup>1\*</sup> Pattama Hannok<sup>2</sup> Suthep Watcharawetsaringkharn<sup>1</sup> and Therdsak Thonnaluk<sup>3</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

<sup>1</sup> Division of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290

<sup>2</sup> สาขาวิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

<sup>2</sup> Division of Agronomy, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290

<sup>3</sup> สาขาวิชาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

<sup>3</sup> Division of Medicinal Plant Science, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290

\* Corresponding author: jinthapa.kungking.25@gmail.com

(Received: 3 May 2023; Revised: 1 June 2023; Accepted: 19 June 2023)

#### Abstract

*In vitro* anther culture of *Andrographis paniculata* from Prachin Buri province for callus induction was studied. The flower was harvested at the 2-6 days after the flower bud have the highest percentage of tetrad stage initiation was use for anther culture well. The anther explants cultured on NLN medium supplemented with 0 0.1 0.5 and 1.0 mg/L BAP in combination with 0 0.1 and 0.5 mg/L NAA for 8 weeks. The result showed that the most effective treatment for callus induction (8.87 percentage) was culturing on NLN medium supplemented with 0.5 mg/L NAA in combination with 1.0 mg/L BAP. The callus cultured on NLN medium supplemented with 0.5 mg/L NAA in combination with 1.0 mg/L BAP was incubated at the low temperature of 4 °C for 1 and 3 days. It was further transplanted under high temperature of 28 30 and 32 °C for 1, 2, 3 and 4 days. The result showed that the highest weight callus was incubated on low temperature of 4 °C for 24 day, and then transplanted under high temperature of 28 °C for 1 days.

**Keywords:** King bitter, anther culture, callus, temperature

#### บทคัดย่อ

การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจรจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัดปราจีนบุรี ด้วยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อศึกษาการพัฒนาดอกเพื่อนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนพืช พบว่า ดอกที่มีการพัฒนาในระยะ tetrad อัตราสูงในช่วงอายุ 2-6 วัน หลังจากดอกปรากฏ ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับ

การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NLN ที่เติมสาร BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด และเมื่อนำอับละอองเรณูมาเพิ่มปริมาณแคลลัสด้วยการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 3 วัน ต่อเนื่องด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 28 30 และ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 วัน พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส 1 วัน ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สามารถเพิ่มปริมาณการชักนำและน้ำหนักแคลลัสของฟ้าทะลายโจรได้สูงที่สุด

**คำสำคัญ:** ฟ้าทะลายโจร การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู แคลลัส อุณหภูมิ

## คำนำ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชล้มลุก ใบและลำต้นมีรสขม มีสารออกฤทธิ์ คือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ซึ่งเป็นสารที่มีสรรพคุณในการรักษาอาการ ไอ และเจ็บคอ (Valdiani, 2012) เนื่องจากฟ้าทะลายโจรยังไม่มีสายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ทางการค้า สายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่เกิดการผสมพันธุ์กันเองตามธรรมชาติ อีกทั้งการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการสร้างเมล็ดพันธุ์ลูกผสมอาจต้องใช้ระยะเวลานาน จึงใช้การปรับปรุงพันธุ์สมัยใหม่เข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ฟ้าทะลายโจรโดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูเพื่อให้ได้แคลลัส แล้วชักนำให้ได้ต้นอ่อน เนื่องจากแคลลัสจะสามารถเพิ่มปริมาณและชักนำได้ง่าย การใช้เทคนิคดังกล่าวจึงสามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์จากการผสมตัวเองเพื่อให้ได้พ่อแม่พันธุ์ที่เป็นพันธุ์แท้หรือพันธุ์บริสุทธิ์ที่ต้องใช้การผสมตัวเองไม่น้อยกว่า 7 รอบการผสม แต่การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจะใช้เวลาเพียง 1-2 รอบ ในการสร้างสายพันธุ์แท้หรือพันธุ์บริสุทธิ์ (ชุดิมา และณวงศ์, 2563) โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจะต้องมีกรรมวิธีที่เหมาะสมจึงจะชักนำให้เกิดแคลลัส และสามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้

การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู (anther culture) เป็นการนำอับละอองเรณูมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถสร้างพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) ได้ เมื่อทำการเพิ่มปริมาณชุดโครโมโซมเป็นสองเท่าจึงได้เป็นพืชที่ได้จะมีโครโมโซมทุกตำแหน่งเหมือนกัน (homozygous) จึงสามารถสร้างสายพันธุ์แท้ได้ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์นั้นรวดเร็วขึ้น (Hadziabdic *et al.*, 2011) ซึ่งโดยวิธีการดั้งเดิมการสร้างสายพันธุ์แท้โดยวิธีการผสมตัวเองต้องใช้ระยะเวลานาน ส่งผลให้เสียค่าใช้จ่าย

ที่มากในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ (Yan *et al.*, 2017) การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจึงเป็นวิธีที่นักปรับปรุงพันธุ์เลือกใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์แท้ของพืช ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจะให้ผลลัพธ์ 2 กรณี (1) สามารถชักนำให้เป็นต้น และ (2) การเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้แคลลัสแล้วจึงชักนำให้เป็นต้น การชักนำให้เกิดแคลลัสมาก่อนแล้วจึงนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้นจะประสบความสำเร็จมากกว่า การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูแล้วได้ต้นเลย แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์ที่อยู่ร่วมกันโดยยังไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดต้นหรือราก หากอยู่ในอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูเพื่อให้ได้แคลลัสนั้น ชนิดของอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิ และสิ่งแวดล้อมมีผลต่อความสำเร็จอย่างมาก (พันทิพา และคณะ, 2560; Gahan and George, 2008) อาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีการเพิ่มวิตามิน เช่น NLN (Lichter, 1982) มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในพริกและมะเขือเทศโดยใช้สูตรอาหารสังเคราะห์ NLN พบว่าให้ปริมาณการเกิดแคลลัสและสามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้สูงที่สุด (Kim *et al.*, 2008; Ahmadi *et al.*, 2015) การชักนำให้เกิดแคลลัสใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินร่วมกับออกซิน และการชักนำให้เกิดต้นส่วนใหญ่ใช้ไซโตไคนินเพียงชนิดเดียว (ชุดิมา และณวงศ์, 2563; Lee *et al.*, 2005; Mohajer *et al.*, 2012; Maharani *et al.*, 2020) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในผักกาดโดยใช้สูตรอาหาร NLN ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน 6-benzylaminopurine (BAP) ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน naphthaleneacetic acid (NAA) ที่ความ

เข้มข้น 0.05 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการชักนำเป็นแคลลัส และราก สูงที่สุด (Smykalova *et al.*, 2006) อุณหภูมิก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู เพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมสามารถช่วยกระตุ้นให้เกิดการชักนำแคลลัส ได้มากขึ้น ในพืชบางชนิดการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู ในระยะแรกที่อุณหภูมิสูงจะไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ของละอองเรณูให้ทำงานเร็วขึ้น (Bajaj, 1990) และการที่พืช ได้รับอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ เติบโตจะช่วยชักนำให้เกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลล์ สืบพันธุ์ได้ จากการศึกษาอุณหภูมิโดยการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณูในข้าวสาลี พบว่าที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สามารถชักนำ แคลลัส และสามารถชักนำเป็นต้นได้ นอกจากนี้ระยะ การพัฒนาของดอกมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณูในพืชเป็นอย่างมาก (Wilken *et al.*, 2005) โดยระยะดอกที่มีความเหมาะสมคือระยะที่มีการสร้าง ไมโครสปอร์ในระยะ tetrad ระยะนี้เป็นระยะที่สามารถ เพาะเลี้ยง และชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ (สมาพร และคณะ, 2563)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากรรมวิธีที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู ในฟ้ายะลวยโจร เพื่อสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการ เพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้ายะลวยโจรเพื่อการปรับปรุง พันธุ์ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การศึกษาระยะดอกที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณู

การทดลองที่ 1 นำดอกฟ้ายะลวยโจรที่มีแหล่งปลูก ในจังหวัดปราจีนบุรีมาทำการศึกษาการพัฒนาของละออง เกสรตัวผู้ โดยนำดอกที่มีระยะการพัฒนาดอกต่างกัน 10 ระยะ คือ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 วัน หลังดาดอก ปรากฏ หยดด้วยสีย้อม acetocarmine ความเข้มข้น 0.002 M แล้วใช้วิธี Squash technique และจึงนำไปตรวจ การพัฒนาของละอองเกสรเพศผู้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบเชิงประกอบ (Compound light microscope) เก็บ บันทึกรายละเอียดเปอร์เซ็นต์ไมโครสปอร์ในระยะ tetrad (n=4)

ซึ่งเป็นระยะที่ละอองเกสร 4 เซลล์อยู่ติดกันเนื่องจากการ แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

### 2. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อ การชักนำให้เกิดแคลลัส

การทดลองที่ 2 นำดอกที่มีการพัฒนาในระยะ tetrad สูงสุด มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร NLN ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน มีการวางแผนโดยวางแผนการทดลองแบบ 4×3 factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 สารควบคุม การเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BAP) ที่ระดับ ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ปัจจัยที่ 2 สารควบคุมการเจริญเติบโต naphthaleneacetic acid (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม ต่อลิตร รวมทั้งสิ้นจำนวน 12 สูตรอาหาร โดยใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.7-5.8 จากนั้น นำไปเลี้ยงในหีองอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มีด 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงไว้ในที่มีแสงโดยมีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ดำเนินการทดลองโดยนำดอก ที่มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาดอกในระยะ tetrad ที่สูงที่สุด มาฟอก ขำเชื้อผิวภายนอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบ ระยะเวลาล้างด้วยล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปแยกอับละอองเรณู สำหรับเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ตามที่ วางแผนการทดลองไว้ข้างต้น ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เก็บบันทึกข้อมูลจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนา เป็นแคลลัส การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์) น้ำหนักแคลลัส (มิลลิกรัม) และลักษณะของแคลลัส นำมาวิเคราะห์ความ แปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

### 3. การศึกษาอุณหภูมิต่อการเพิ่มปริมาณการเกิดแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

การทดลองที่ 3 นำดอกที่มีการพัฒนาในระยะ tetrad สูงสุด มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร NLN ที่มีปริมาณการชักนำให้เกิดแคลลัส และน้ำหนักที่สูงที่สุด นำมาบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เพื่อเพิ่มปริมาณของ

แคลลัสและน้ำหนัก โดยวางแผนการทดลองแบบ  $2 \times 3 \times 4$  factorial in CRD ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาบ่มที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียสที่ 1 และ 3 วัน ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิที่แช่บ่ม คือ 28 30 และ 32 องศาเซลเซียส และ ปัจจัยที่ 3 ระยะเวลาที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 1 2 3 และ 4 วัน รวมทั้งสิ้นจำนวน 24 สิ่งทดลอง โดยมีวิธีการดังนี้ นำสูตรอาหารที่ได้จากการทดลองที่ 2 ที่พบว่ามีความเหมาะสมในการชักนำแคลลัสสูงที่สุด และมีปริมาณน้ำหนักสูงที่สุด นำมาเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูโดยใช้วิธีการที่กล่าวไปแล้วในขั้นตอนของการทดลองที่ 2 จากนั้นจึงนำมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยนำอับละอองเรณูไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 1 และ 3 วัน จากนั้นศึกษาอุณหภูมิต่อที่ 28 30 และ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ทำการบ่ม 1 2 3 และ 4 วัน ในที่มีด จากนั้นแล้วจึงนำไปเลี้ยงไว้ในที่มีแสงโดยมีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บบันทึกข้อมูลการเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์) น้ำหนักของแคลลัส (มิลลิกรัม) และลักษณะของแคลลัส นำมาวิเคราะห์แปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

เมื่อนำอับละอองเรณูจากดอกฟ้าทะลายโจร ที่มีระยะการพัฒนาดอก 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 วัน หลังติดดอกปรากฏ มาศึกษาพัฒนาการของอับละอองเรณู ในระยะ tetrad พบว่าระยะดอกที่มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาในระยะ tetrad (Figure 1A) อยู่ในช่วงระยะการพัฒนาดอก 2 3 4 5 และ 6 วัน หลังจากติดดอกปรากฏ ที่ 13.63 10.90 9.09 0.90 และ 0.90 ตามลำดับ (Table 1) โดยวันที่ 3 หลังจากติดดอกปรากฏ พบว่ามีการพัฒนาดอกในระยะ tetrad มากที่สุด หลังจากช่วงวันที่ 5 ดอกฟ้าทะลายโจรได้มีการพัฒนาไปเป็นละอองเรณูหรือระยะที่สมบูรณ์พร้อมรับการผสมเกสร (Figure 1B) จากการศึกษา ร้อยละของการพัฒนาในระยะ tetrad อยู่ในช่วงระยะดอกที่ 2 3 และ 4 วัน หลังจากติดดอกปรากฏ ซึ่งเป็นระยะดอกที่เหมาะสมของการพัฒนาไมโครสปอร์ที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจร เนื่องจากระยะนี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และสามารถ

พัฒนาไปเป็นต้นได้ เพราะเป็นระยะที่มีผนังเซลล์ที่บางสามารถชักนำได้ง่าย (สมาพร และคณะ, 2563)

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของอับละอองเรณูในฟ้าทะลายโจร โดยการเติมสาร BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสสูงสุด 8.87 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะสีของแคลลัสมีสีเขียว เกาเก้นแบบแน่น (compact callus; CP) และให้ปริมาณน้ำหนักสูงสุด 0.830 มิลลิกรัม (Table 2) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองมีอิทธิพลร่วมกัน ทำให้มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในฟ้าทะลายโจร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากตารางจะเห็นได้ว่าหากมีสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดจะมีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่ามีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียว สอดคล้องกับการศึกษาการชักนำแคลลัส และการชักนำให้เกิดพืช haploid ใน *Primula forbesii* Franch พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่เติมสาร BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงที่สุด (Jia *et al.*, 2014) เช่นเดียวกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของ *Lupinus angustifolius* บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสาร BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการชักนำแคลลัสที่มากขึ้น และมีการช่วยชีวิตแคลลัสที่เป็นสีน้ำตาลด้วยอาหารสูตรเดียวกันนี้ (Kozak *et al.*, 2012) จากการศึกษาปริมาณการใช้สาร พบว่าหากเติมสาร BAP ร่วมกับสาร NAA เพิ่มขึ้นก็จะทำให้ปริมาณของการชักนำแคลลัส และน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และจากตารางที่ 2 (Table 2) จะเห็นได้ว่าอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของสาร BAP ต่อน้ำหนักแคลลัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยเหตุนี้สันนิษฐานได้ว่าสาร BAP มีผลต่อน้ำหนักแคลลัสมากกว่าสาร NAA รูปแบบแคลลัสที่พบในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในฟ้าทะลายโจร มีแบบชนิดเกาเก้นแบบแน่น (compact callus; CP) และแบบเกาเก้นแบบหลวม (friable callus; FB) ลักษณะสีของแคลลัสมีสีเขียว เหลือง และม่วง ซึ่งรูปแบบการเกาเก้นของแคลลัสมีผลมาจากสมดุลของสารควบคุมการเจริญ

เติบโตของทั้งไซโตไคนิน ออกซินที่สูงเกินไป (Redway *et al.*, 1990) และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ระยะ การพัฒนาของดอก อุณหภูมิ ปริมาณของซูโคส และแสง (Seguí and Nuez, 2008)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จ รองลงมาจากสูตรอาหารสังเคราะห์ และปริมาณของสาร ควบคุมการเจริญเติบโต จะเห็นได้ว่าการศึกษาอุณหภูมิเพื่อ เพิ่มปริมาณของแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู ในฟ้ายะลวยโจร เมื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้ายะลวยโจร ในอุณหภูมิปกติ ( $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส) โดยที่ไม่ได้ทำการ บ่มก่อน (ในการทดลองที่ 2) ปริมาณของการชักนำให้เกิด แคลลัส และน้ำหนักของแคลลัสมีความแตกต่างกัน การบ่ม อุณหภูมิที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มปริมาณการชักนำแคลลัส ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้ายะลวยโจรได้ (เปอร์เซ็นต์) โดยเพิ่มขึ้นจาก 8.87 เป็น 9.19 (Table 3) และเพิ่มปริมาณน้ำหนักแคลลัส จาก 0.830 เป็น 3.274 มิลลิกรัม จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน ของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ทำให้มีผลต่อการชักนำให้เกิด แคลลัส และปริมาณน้ำหนักของแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณูในฟ้ายะลวยโจร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จำนวนวันในการบ่มอุณหภูมิต่ำและจำนวนวันในการบ่ม อุณหภูมิสูงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอุณหภูมิของการบ่มมีส่วนสำคัญ ในความสำเร็จของการชักนำให้เกิดแคลลัส และชักนำ ให้เกิดต้นอ่อนโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู โดยได้มีการ ศึกษาในมะเขือเทศซึ่งได้นำอับละอองเรณูมาเพาะเลี้ยง และได้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน และ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ต่ออีก 2 วัน สามารถ ชักนำให้พืชเกิดแคลลัส และพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ (Ahmadi *et al.*, 2015) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ

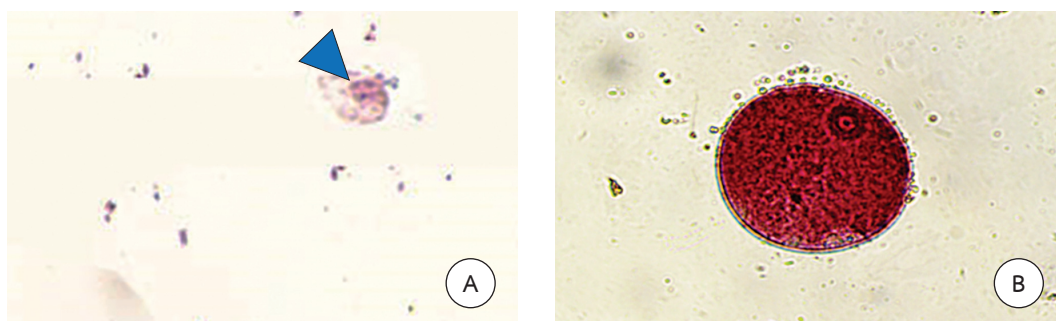
การบ่มของพืชจะอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส เพราะ จะทำให้พืชตอบสนองต่อความเครียดโดยสิ่งเร้าที่เกิดจาก อุณหภูมิ นอกจากนี้แสงก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ในพืช เนื่องจากทำให้พืชตอบสนองต่อความเครียด เช่นเดียวกับอุณหภูมิ (Custers *et al.* 1994; Touraev *et al.*, 1996 and Raina and Irfan., 1998) จึงต้อง มีการนำพืชที่เพาะเลี้ยงอับละอองเรณูนำไปเพาะเลี้ยง ในที่ที่ไม่มีแสงก่อน แล้วจึงนำมาไว้ในที่มีแสงเพื่อให้พืช ตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากแสงเป็นตัวกระตุ้น จากผลการวิจัยนี้พบว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจากการ บ่มที่อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบแล้วให้ผลลัพธ์ในการเพิ่ม ปริมาณแคลลัส และน้ำหนักสูงสุดของการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณูในฟ้ายะลวยโจรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของ ฟ้ายะลวยโจรให้สีที่ต่างกัน โดยแคลลัสที่ให้สีเขียว (Figure 2B) ต่างจากแคลลัสที่เป็นสีเหลืองน้ำตาล (Figure 2C) นอกจากแคลลัสที่เป็นสีเขียว สีเหลือง และสีน้ำตาลแล้ว ยังพบแคลลัสที่เป็นสีม่วง (Figure 2I) ซึ่งเกิดจากการผลิต สารทุติยภูมิคือสารกลุ่มแอนโทไซยานิน หรือฟลาโวนอยด์ และแคลลัสสีเขียวเกิดจากการผลิตสารกลุ่มคลอโรฟิลล์ (Winarto *et al.*, 2011) ความสามารถในการฟื้นฟูของ แคลลัสที่แตกต่างกันอาจมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิ โดย แคลลัสที่มีสีเขียว จะสามารถพัฒนาไปเป็นยอด และราก (Figure 2G) ได้ดีกว่าแคลลัสที่เป็นสีเหลือง แคลลัสสีเหลือง มีการพัฒนาที่ต่ำไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ ด้วยเหตุนี้ สีแคลลัสอาจเป็นอีกทางเลือกให้กับนักพัฒนาและปรับปรุง พันธุ์พืชเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเพื่อสร้างความ แตกต่างได้

**Table 1** Percentage of tetrad stage of meiosis in *Andrographis paniculata*

| Age of flower bud development (days) | No. of anther | Percentage of tetrad stage (%) |
|--------------------------------------|---------------|--------------------------------|
| 1                                    | 110           | 0.00                           |
| 2                                    | 110           | 13.63                          |
| 3                                    | 110           | 10.90                          |
| 4                                    | 110           | 9.09                           |
| 5                                    | 110           | 0.90                           |
| 6                                    | 110           | 0.90                           |

**Table 1** Percentage of tetrad stage of meiosis in *Andrographis paniculata* (Cont.)

| Age of flower bud development (days) | No. of anther | Percentage of tetrad stage (%) |
|--------------------------------------|---------------|--------------------------------|
| 7                                    | 110           | 0.00                           |
| 8                                    | 110           | 0.00                           |
| 9                                    | 110           | 0.00                           |
| 10                                   | 110           | 0.00                           |



**Figure 1** Pollen stage from anther of *Andrographis paniculata*. A) tetrad stage. and B) pollen.

**Table 2** Percentage of callus formation in NLN medium supplement with different concentrations of BAP and NAA of *Andrographis paniculata* (Mean±SE)

| Plant growth regulators |            | Percentage of callus     | Weight (mg)             | Color of callus | Characteristics of callus |
|-------------------------|------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|
| BAP (mg/l)              | NAA (mg/l) |                          |                         |                 |                           |
| 0                       | 0          | -                        | -                       | -               | -                         |
| 0                       | 0.1        | -                        | -                       | -               | -                         |
| 0                       | 0.5        | 0.009±0.02 <sup>gh</sup> | 0.000±0.01 <sup>h</sup> | Yellow          | FB                        |
| 0.1                     | 0          | 0.124±0.01 <sup>gh</sup> | 0.107±0.01 <sup>s</sup> | green           | FB                        |
| 0.1                     | 0.1        | 0.400±0.03 <sup>fg</sup> | 0.143±0.01 <sup>f</sup> | green           | FB                        |
| 0.1                     | 0.5        | 0.633±0.02 <sup>f</sup>  | 0.174±0.01 <sup>e</sup> | green           | FB                        |
| 0.5                     | 0          | 1.715±0.00 <sup>e</sup>  | 0.223±0.00 <sup>d</sup> | green           | CP                        |
| 0.5                     | 0.1        | 2.325±0.13 <sup>d</sup>  | 0.436±0.01 <sup>c</sup> | green           | CP                        |
| 0.5                     | 0.5        | 2.622±0.01 <sup>d</sup>  | 0.446±0.00 <sup>c</sup> | green           | CP                        |
| 1                       | 0          | 4.905±0.00 <sup>c</sup>  | 0.578±0.01 <sup>b</sup> | green           | CP                        |
| 1                       | 0.1        | 5.425±0.14 <sup>b</sup>  | 0.583±0.01 <sup>b</sup> | green           | CP                        |
| 1                       | 0.5        | 8.887±0.02 <sup>a</sup>  | 0.830±0.01 <sup>a</sup> | green           | CP                        |
| <b>F-test</b>           |            | *                        | *                       |                 |                           |
| Sig (BAP)               |            | *                        | ns                      |                 |                           |
| Sig (NAA)               |            | *                        | ns                      |                 |                           |
| Sig (BXN)               |            |                          |                         |                 |                           |

**Remarks:** \* Significantly difference test with 95 % confident level ( $P \leq 0.05$ )

<sup>ns</sup> Non-Significantly difference test with 95 % confident level ( $P \geq 0.05$ )

<sup>1</sup> Means within a column followed by the same letter are not significantly at  $P \leq 0.05$  by DMRT

<sup>CP</sup> Compact callus <sup>FB</sup> Friable callus

**Table 3** Percentage of callus formation in NLN medium supplement with the combination of BAP 1 mg/l and NAA 0.5 mg/l from various temperatures and different period of incubation in *Andrographis paniculata* for 8 week. (Mean±SE)

| Temperature         |            |                   | Incubation (Day) | Percentage of callus       | Weight (mg)              | Color of callus | Characteristics of callus |
|---------------------|------------|-------------------|------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------------|
| Cool treatment (°C) | Time (Day) | Heat shocked (°C) |                  |                            |                          |                 |                           |
| 4                   | 1          | 28                | 1                | 9.116±0.31 <sup>a</sup>    | 3.274±0.06 <sup>a</sup>  | green,violet    | CP                        |
|                     |            |                   | 2                | 8.154±0.15 <sup>ab</sup>   | 3.084±0.04 <sup>b</sup>  | green           | CP                        |
|                     |            |                   | 3                | 5.762±0.21 <sup>c</sup>    | 2.400±0.01 <sup>d</sup>  | green           | CP                        |
|                     |            |                   | 4                | 3.534±0.74 <sup>d</sup>    | 2.054±0.03 <sup>f</sup>  | green           | CP                        |
| 4                   | 1          | 30                | 1                | 3.140±0.04 <sup>de</sup>   | 1.126±0.06 <sup>h</sup>  | green           | CP                        |
|                     |            |                   | 2                | 1.604±0.34 <sup>fg</sup>   | 0.718±0.35 <sup>i</sup>  | green           | CP                        |
|                     |            |                   | 3                | 0.694±0.29 <sup>ghi</sup>  | 0.315±0.01 <sup>kl</sup> | green           | CP                        |
|                     |            |                   | 4                | 0.176±0.11 <sup>hi</sup>   | 0.206±0.02 <sup>lm</sup> | green           | CP                        |
| 4                   | 1          | 32                | 1                | 0.950±0.43 <sup>fghi</sup> | 0.356±0.02 <sup>k</sup>  | Yellowish-white | FB                        |
|                     |            |                   | 2                | 0.506±0.37 <sup>ghi</sup>  | 0.114±0.01 <sup>mn</sup> | Yellowish-white | FB                        |
|                     |            |                   | 3                | 0.074±0.16 <sup>i</sup>    | 0.003±0.01 <sup>n</sup>  | Yellowish-white | FB                        |
|                     |            |                   | 4                | -                          | -                        | no response.    | -                         |
| 4                   | 3          | 28                | 1                | 7.724±0.26 <sup>b</sup>    | 2.886±0.04 <sup>c</sup>  | green           | FB,CP                     |
|                     |            |                   | 2                | 7.172±0.03 <sup>b</sup>    | 1.756±0.02 <sup>f</sup>  | green           | FB,CP                     |
|                     |            |                   | 3                | 3.000±0.04 <sup>de</sup>   | 1.460±0.03 <sup>g</sup>  | green-white     | FB                        |
|                     |            |                   | 4                | 0.002±0.02 <sup>i</sup>    | 0.290±0.02 <sup>kl</sup> | green-white     | FB                        |
| 4                   | 3          | 30                | 1                | 2.010±0.01 <sup>ef</sup>   | 0.734±0.05 <sup>i</sup>  | Yellowish-white | FB                        |
|                     |            |                   | 2                | 1.528±0.01 <sup>fg</sup>   | 0.510±0.04 <sup>j</sup>  | Yellowish-white | FB                        |
|                     |            |                   | 3                | 0.906±0.04 <sup>fghi</sup> | 0.218±0.03 <sup>lm</sup> | Yellowish-white | FB                        |
|                     |            |                   | 4                | 0.002±0.05 <sup>i</sup>    | -                        | Brown           | FB                        |
| 4                   | 3          | 32                | 1                | 0.945±0.01 <sup>fghi</sup> | 0.208±0.03 <sup>lm</sup> | Brown           | FB                        |
|                     |            |                   | 2                | 0.262±0.01 <sup>hi</sup>   | 0.326±0.02 <sup>kl</sup> | Brown           | FB                        |
|                     |            |                   | 3                | -                          | -                        | -               | -                         |
|                     |            |                   | 4                | -                          | -                        | -               | -                         |

#### F-test

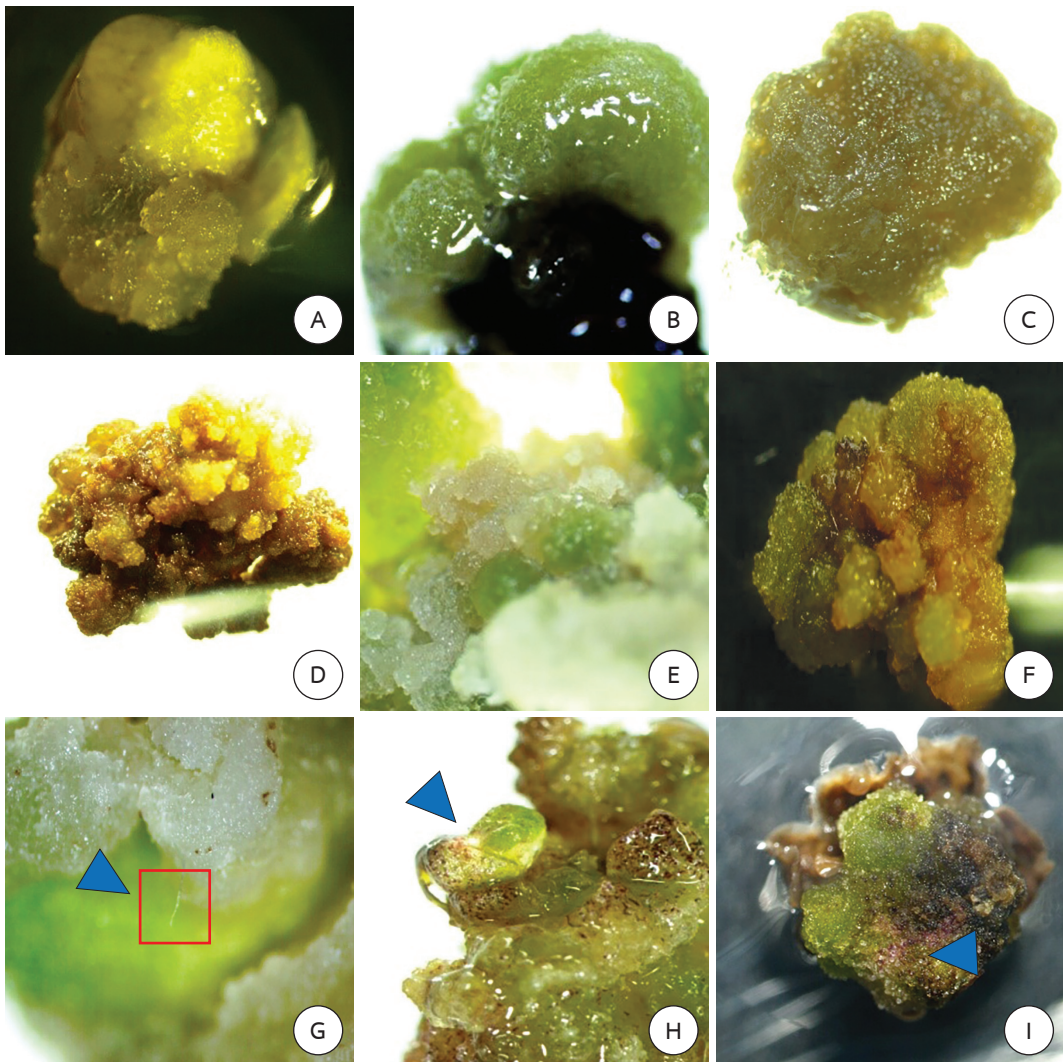
|                      |    |   |
|----------------------|----|---|
| sig (Time)           | *  | * |
| sig (Heat)           | *  | * |
| sig (Incubation)     | *  | * |
| sig (Heat x Incu)    | *  | * |
| sig (Heat x Time)    | *  | * |
| sig (Incu x Time)    | ns | * |
| Sig (HeatxIncuxTime) | *  | * |

**Remarks:** \* Significantly difference test with 95 % confident level ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>ns</sup> Non-Significantly difference test with 95 % confident level ( $P \geq 0.05$ ),

<sup>CP</sup> Compact callus. <sup>FB</sup> Friable callus.

<sup>1</sup> Means within a column followed by the same letter are not significantly at  $P \leq 0.05$  by DMRT.



**Figure 2** Characteristics of callus derived from anther culture of *Andrographis paniculata*. on NLN medium supplement with BAP 1mg/l and NAA 0.5mg/l after A) 2 weeks. B) 5 weeks (green callus). C) 20 days (Friable callus and yellowish callus). D) 30 days (Friable callus). E) 35 days (Friable callus). F) 35 days (compact callus). G) 35 days (Friable callus). (arrow indicates root initiation from callus). H) 45 days. (arrow indicates compact callus with heart shape). and I) 28 day (arrow indicates compact callus and violet callus).

## สรุปผลวิจัย

1. อับละอองเรณูในระยะ tetrad เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้ายะลายน้อยพบมากในดอกที่มีอายุระหว่าง 2-6 วัน หลังดอกปรากฏ

2. อาหารสูตร NLN ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด (8.87 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสในฟ้ายะลายน้อย ในขณะที่อาหารสูตร NLN ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีน้ำหนักสูงสุด 0.830 มิลลิกรัม รองลงมาได้แก่สูตรที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีน้ำหนักรองลงมา 0.583 มิลลิกรัม

3. ลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสีเขียว เกาะกันแบบแน่น ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสีเขียวเหลืองและสีเหลืองเกาะกันแบบแน่น และอาหารที่เติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสีเขียวเหลือง และสีเหลือง เกาะกันแบบหลวม ๆ

4. การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูฟ้ายะลายน้อยบนอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสที่บ่มในอุณหภูมิต่ำที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำให้แคลลัสฟ้ายะลายน้อยมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณเพิ่มขึ้น (9.116 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณน้ำหนักสูงสุด (3.274 มิลลิกรัม) ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และบ่มต่อที่อุณหภูมิสูง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ไม่สามารถตอบสนองต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของฟ้ายะลายน้อย

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริ มูลนิธิชัยพัฒนา ปีงบประมาณ 2562-2565 และคณะผลิตรกรรมเกษตร สาขาวิทยาการสมุนไพร ณ ห้องปฏิบัติการทางชีวภาพทางพืชสมุนไพร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ ที่เอื้อเพื่อสถานที่ทำการปฏิบัติงานทดลอง

## เอกสารอ้างอิง

- ชุดิมา แก้วพิบูลย์ และณวงศ์ บุญนาค. 2563. ผลของการควบคุมการเจริญต่อการผลิตสารกลุ่มไคโทเรซินแลคโตน จากแคลลัสฟ้ายะลายน้อย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 28(10): 1976-1801.
- พันทิพา ลัมสงวน สนธิชัย จันทรเปรม และเสริมศิริ จันทรเปรม. 2560. การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนจากกลีบดอกที่พัฒนาแล้วของเบญจมาศ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 48(3): 322-333.
- สมาพร เรื่องสังข์ นนทวัฒน์ หุ้มแพร และจิรวัฒน์ เรืองเนตร. 2560. ระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ในลิลลี่สายพันธุ์ฟอร์โมลองโก ที่มีขนาดดอกแตกต่างกัน. PSRU Journal of Science and Technology 5(1): 23-30.
- Afele, J.C., L.W. Kannenberg, R. Keats, S. Sohota and E.B. Swanson. 1992. Increased induction of microspore embryos following manipulation of donor plant environment and culture temperature in corn (*Zea mays* L.). Plant cell, tissue and organ culture 28: 87-90 Available: DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00039919>.
- Ahmadi, B., M.E. Shariatpanahi, R. Asghari-Zakaria, N. Zare and P. Azadi. 2015. Efficient microspore embryogenesis induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) using shed microspore culture. J Pure Appl Microbiol 9(2): 21-29. Available: DOI:10.13140/RG.2.1.3265.8805.
- Bajaj, Y.S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. Biotechnology in Agriculture and Forestry. 12: 3-44. Available: DOI:10.1007/978-3-642-61499-6\_1.
- Custers J.B.M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) Biology, Agricultural and Food Sciences: 185-193. Available: DOI:10.1007/978-94-017-1293-4\_29.

- Gahan, P.B. and E.F. George. 2008. Adventitious regeneration, In George, E.F., M.A. Halls and G.D. Klerk eds. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Springer, Netherlands.
- Hadziabdic, D., P.A. Wadl and S.M. Reed. 2011. Haploid cultures. Plant. CRC Press, American.
- Jia, Y., Q.X. Zhang, H.T. Pan, S.Q. Wang, Q.L. Liu and L.X. Sun. 2014. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. Scientia Horticulturae 176: 273-281. Available: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.018>.
- Kim, M., I.C. Jang, J.A. Kim, E.J. Park, M. Yoon and Y. Lee. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant cell reports 27: 425-434. Available: <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0442-4>.
- Kozak, K., R. Galek, M.T. Waheed and E. Sawicka-Sienkiewicz. 2012. Anther culture of *Lupinus angustifolius*: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structures Plant Growth Regulation 66: 145-153. Available: <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9638-2>.
- Lee, Y.S., Y.H. Kim and S.B. Kim. 2005. Changes in the respiration, growth, and vitamin C content of soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights. HortScience 40(5): 1333-1335. Available: DOI:10.21273/HORTSCI.40.5.1333.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollens of *Brassica napus*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 105(5): 427-34. Available: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(82\)80040-8](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(82)80040-8).
- Maison, T., H. Volkaert, U. Boonprakob and Y. Paisooksantivatana. 2005. Genetic Diversity of *Andrographis paniculata* Wall. ex Nees as Revealed by Morphological Characters and Molecular Markers. Kasetsart Journal of Social Sciences 39(3): 388-399.
- Maharani, A., W.I.D. Fanata, F.N. Laeli, K.M. Kim and T. Handoyo. 2020. Callus induction and regeneration from anther cultures of Indonesian indica black rice cultivar Journal of Crop Science and Biotechnology 23: 21-28. Available: <https://doi.org/10.1007/s12892-019-0322-0>.
- Mohajer, S., R.M. Taha, A. Khorasani and J.S. Yaacob. 2012. Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*) Australian Journal of Crop Science 6(8): 1305-1313.
- Raina, S.K. and S.T. Irfan. 1998. High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. Plant Cell Reports 17(9): 57-962. Available: <https://doi.org/10.1007/s002990050517>.
- Redway, F.A., V. Vasil, D. Lu and I.K. Vasil. 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 79: 609-617. Available: <https://doi.org/10.1007/BF00226873>.
- Roy, S.K. and K. Datta. 1988. Chromosomal biotypes of *Andrographis paniculata* in India and Bangladesh. Cytologia 53(2): 369-378. Available: <https://doi.org/10.1508/cytologia.53.369>.
- Sabu, K. 2002. Intraspecific variations in *Andrographis paniculata* Nees. PhD Thesis, Kerala university, Thiruvananthapuram, India.

- Seguí-Simarro, J.M. and F. Nuez. 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol. Physiologia Plantarum* 134(1): 1-12. Available: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01113.x>.
- Silveira, V., A.M. de Vita, A.F. Macedo, M.F.R. Dias, E.I.S. Floh and C. Santa-Catarina. 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114: 351-364. Available: <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0330-2>.
- Smykalova, I., M. Vetrovcova, M.V. Klima, I. Machackova and M. Griga. 2006. Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the breeding project "Czech Winter Rape". *Czech Journal of Genetics and plant breeding* 42(2): 58. Available: DOI:10.17221/3655-CJGPB.
- Touraev A, A. Ilham, O. Vicente and E. Heberle-Bors. 1996. Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports* 15: 561-565 Available: <https://doi.org/10.1007/BF00232453>.
- Valdiani, A., M.A. Kadir, S.G. Tan, D. Talei, M.P. DAbdullah and S. Nikzad. 2012. Nain-e Havandi *Andrographis paniculata* present yesterday, absent today: a plenary review on underutilized herb of Iran's pharmaceutical plants. *Molecular biology reports*. 39: 5409-5424. Available: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1341-x>.
- Wilken, D., E. Jiménez González, A. Hohe, M. Jordan, R. Gomez Kosky, G. Schmeda Hirschmann and A. Gerth. 2005. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer. Dordrecht: 525-537. Available: DOI:10.1007/1-4020-3200-5\_39.
- Winarto, B. and J.A. Teixeira da Silva. 2011. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 107: 305-315. Available: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9981-z>.
- Yan, G., H. Liu, H. Wang, Z. Lu, Y. Wang, D. Mullan and C. Liu. 2017. Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in plant science* 8: 1786. Available: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>.