

การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อน
จากอับเรณูของฟ้าทะลายโจรในสภาพปลอดเชื้อ

Callus Induction and Plantlet Regeneration from
Anther of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees. *In Vitro*

เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์¹ ฉันทนา วิชรรัตน์² และ จินทภา อ่วมอ้า^{2*}
Therdsak Thonnaluk¹, Chantana Witrut² and Jinhapa Aum-um^{2*}

¹ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ (วิทยาการสมุนไพร) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

¹ Division of Agriculture (Medicinal Plant Science), Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290. Thailand

² สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

² Division of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290. Thailand

*Corresponding author: Email: jinhapa.kungking25@gmail.com

(Received: 1 September 2024; Revised: 29 January 2026 ; Accepted: 30 January 2026)

Abstract: *In vitro* anther culture of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees. from Chiang Mai for callus induction was studied. The flowers were harvested 9 to 7 days before blooming and were used for anther culture. The anther explants were cultured on Nitsch & Nitsch medium (1967), as modified by Lichter (1982) (NLN), supplemented with 0, 0.1, 0.5, and 1.0 mg/L 6-Benzylaminopurine (BAP) in combination with 0, 0.1, and 0.5 mg/L Naphthalene acetic acid (NAA) for 8 weeks. The results showed that the most effective treatment for callus induction was cultured on NLN medium supplemented with 0.5 mg/L NAA in combination with 1.0 mg/L BAP. In order to increase the callus and induce embryo, callus was cultured 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 on NLN medium supplemented with 0.5 mg/L NAA in combination with 1.0 mg/L BAP. The results showed that the highest weight callus and induced somatic embryo were cultured at a low temperature of 4°C for 1 day and then transplanted at a high temperature of 28°C for 1 day could increase the quantity of callus and induce to form an embryo.

Keywords: King bitter, anther culture, callus, temperature

บทคัดย่อ: การศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจรจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า พัฒนาการของดอกที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจร คือ ระยะดอกที่อายุในช่วงวันที่ 9 ถึง 7 วัน ก่อนดอกบาน เมื่อนำดอกในระยะดังกล่าวไปทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Nitsch and Nitsch medium (1967) ดัดแปลง Lichter (1982) (NLN) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-Benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร NLN เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ และเมื่อนำอับละอองเรณูมาเพิ่มปริมาณแคลลัส แล้วนำไปชักนำให้เกิดต้น ด้วยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 3 วัน ต่อเนื่องด้วยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28, 30 และ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ในอาหารสูตร NLN ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสของฟ้าทะลายโจรได้ และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนได้

คำสำคัญ: ฟ้าทะลายโจร การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู แคลลัส อุณหภูมิ

คำนำ

ฟ้าทะลายโจร (King bitter) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ถิ่นกำเนิดอยู่ในจีน อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฟ้าทะลายโจรของประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกันกับฟ้าทะลายโจรในรัฐพินาทุของประเทศอินเดีย ตามรายงานในประเทศอินเดียได้รายงานถึงจำนวนสายพันธุ์ของฟ้าทะลายโจรไว้หลากหลายพันธุ์ อาทิ Niranjana *et al.* (2010) 28 สายพันธุ์ Boopathi (2000) 40 สายพันธุ์ และ Parixit *et al.* (2012) 42 สายพันธุ์ และมีการศึกษาสายพันธุ์ในประเทศไทยโดยการสุ่มตัวอย่าง 26 ตัวอย่าง จาก 16 จังหวัด ได้แก่ นครพนม กาญจนบุรี จันทบุรี เชียงใหม่ เชียงราย ชุมพร นครศรีธรรมราช เพชรบุรี บุรีรัมย์ สงขลา ระยอง พิษณุโลก ศรีสะเกษ นครราชสีมา ฉะเชิงเทรา และอุดรดิตถ์ จัดได้ 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ สายพันธุ์ นครพนม นครศรีธรรมราช เพชรบุรี และระยอง กลุ่มที่ 2 คือ ชุมพร เชียงราย ศรีสะเกษ พิษณุโลก จันทบุรี และกาญจนบุรี กลุ่มที่ 3 คือ เชียงใหม่ บุรีรัมย์ สงขลา และนครราชสีมา 1 และ กลุ่มที่ 4 คือ นครราชสีมา 2

(Maison *et al.*, 2005) จากการศึกษาการเพาะปลูกของฟ้าทะลายโจรในประเทศไทย พบว่า การปลูกฟ้าทะลายโจรยังมีน้อย ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค และสายพันธุ์ฟ้าทะลายโจรที่เพาะปลูกในประเทศไทยในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่เกษตรกรปล่อยให้ผสมพันธุ์กันเองตามธรรมชาติ (Department of Agricultural Extension, 2019) หากต้องการสายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) เพื่อใช้ในทางการค้า ต้องเริ่มจากการสร้างพ่อแม่พันธุ์ที่เป็นพันธุ์แท้เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม โดยปกติใช้เวลา 5-10 ปี หรือ 7 รอบการผสม เพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม ต้องใช้ระยะเวลานาน ส่งผลให้เสียค่าใช้จ่ายมากในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์และผลิตเมล็ดพันธุ์ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูเพื่อให้ได้แคลลัสแล้วชักนำให้ได้นต้นอ่อนจึงช่วยร่นระยะเวลาและลดขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากแคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณและชักนำได้ง่าย การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูใช้เวลาเพียง 3-5 ปี หรือ 1-2 รอบการผสม ในการสร้างสายพันธุ์แท้หรือพันธุ์บริสุทธิ์ การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูเพื่อให้ได้ต้นอ่อนต้องมีกรรมวิธีและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Chen, 2013)

การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู คือ การนำเซลล์เพศผู้ของพืชมาเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อม อาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู มีประโยชน์มากในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากสามารถสร้างสายพันธุ์แท้ได้ในเวลาสั้น โดยการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม การสร้างสายพันธุ์แท้ทำได้โดยการผสมตัวเองหลายรุ่นเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ต้องใช้เวลานาน การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูทำได้โดยการนำเอาอับละอองเกสรที่ยังอ่อน (young pollen) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพื่อยับยั้งพัฒนาการของ microspore ไม่ให้ทำหน้าที่เป็น male gametophyte ที่สามารถผสมกับไข่ได้ แต่บังคับให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือเอ็มบริโอแทน ซึ่งดอกหรืออับละอองเรณูที่จะนำมาเลี้ยงควรอยู่ในช่วงการแบ่งเซลล์ระยะ tetrad ซึ่งเป็นระยะที่สามารถชักนำและเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นอ่อนได้ โดยต้นพืชที่ได้มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) กระบวนการเกิดต้นโดยวิธีการเลี้ยงอับละอองเรณูนี้ เรียกว่า androgenesis

อาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจึงจะสามารถนำไปสู่การเกิดแฮพพลอยด์ คือ การเกิดเป็นแคลลัสก่อน จากนั้นจึงชักนำให้เกิดต้นพืชได้ โดยอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูนั้น มีการศึกษาโดย Chu (1978) ซึ่งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส นอกจากนี้ยังมีการชักนำให้เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหลักในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูพืชหลายใจ มี 2 ประเภท คือ อาหารกึ่งแข็ง (solid media) และอาหารเหลว (liquid media) อาหารเพาะเลี้ยงมีองค์ประกอบหลัก 4 กลุ่ม ได้แก่ สารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) สารอินทรีย์ (organic nutrients) และสารสกัดจากธรรมชาติ (Plant Extracts) (Krudnak, 2011) นอกจากนี้พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ได้จากน้ำตาลช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขนาดของกลุ่มเซลล์ชักนำให้กลุ่มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ กระตุ้นให้เกิดกลไกการพัฒนาไปเป็นต้นของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมสำหรับ

การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู และพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส Chaleff and Stolarz (1981)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู เพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมช่วยกระตุ้นให้เกิดการชักนำแคลลัสได้มากขึ้น พืชบางชนิดการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในระยะแรกที่อุณหภูมิสูงจะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูให้เร็วขึ้น (Bajaj, 1990; Krudnak 2011) ซึ่งมีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงพืช พบว่า การขาดธาตุอาหารในขณะที่พืชได้รับอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะช่วยชักนำให้เกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ (Afele *et al.* 1992) ประกอบกับ Lichter (1982) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของผักกาดก้านขาว (*Brassica napus*) พบว่า อุณหภูมิที่ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำการผ่านความเย็น (cold pretreatment) เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู โดยการปรับสภาพด้วยความเย็น เพื่อให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายต้นอ่อน (embryoid) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (Samphantharak, 2003) อุณหภูมิต่ำมีผลทำให้มีการแบ่งเซลล์ได้ 2 นิวเคลียส ที่เหมือนกัน (identical nuclei) ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไปของเส้นใย spindle ทำให้อัตราการหายใจและการสลายสสารภายในอับละอองเรณูช้าลง ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของละอองเรณู ชะลอการแก่ของเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ และทำให้เซลล์มีการพัฒนาไปพร้อม ๆ กัน (Meesakul *et al.*, 2005; Zapata *et al.* 1985)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูสามารถสร้างสายพันธุ์แท้ได้ในระยะเวลาสั้นกว่าวิธีดั้งเดิม ทำให้การปรับปรุงพันธุ์รวดเร็วขึ้น (Ruangsanka *et al.*, 2020) มีการศึกษาในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) โดยทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู พบว่า สามารถชักนำเป็นต้นอ่อนได้ (Nitsch and Nitsch, 1969) และมีความวิจัยที่ทำการศึกษาศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจากข้าวโพด (*Zea mays* L.) พบว่า หลังจากผ่านการเลี้ยงได้

14 วัน อับละอองเรณูมีการตอบสนองที่ร้อยละ 18.3 และร้อยละ 19.2 สามารถเป็นแคลลัสและชักนำเป็นต้นได้ เมื่อทำการตรวจสอบพบว่า เป็นพืช haploid (Genovesi and Collins, 1982) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) โดยการนำอับเรณูของดอกทานตะวันที่มีปริมาณน้ำมันสูงมาทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู พบว่า ปัจจัยของความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของทานตะวันเพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้จะต้องประกอบด้วย อาหารที่เพาะเลี้ยง แสง อุณหภูมิ และคุณภาพในการปลูก การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูยังสามารถเพิ่มปริมาณของพืชได้อย่างรวดเร็ว และได้ประสิทธิภาพ (Krudnak, 2011)

อุปกรณ์และวิธีการ

นำดอกฟ้าทะลายโจรในแหล่งปลูกเชียงใหม่ที่มีอายุของการพัฒนาของดอกช่วง 9 ถึง 1 วันก่อนดอกบาน มาตัดแยกดอกอย่างระมัดระวังไม่ให้อับละอองเรณูได้รับความเสียหาย นำอับละอองเรณูมาตัดแยกบนกระจกสไลด์ แล้วหยดสีย้อม acetocarmine (Loba, INDIA) ความเข้มข้น 0.002 M จำนวน 1-2 หยด แล้วกดอับละอองเรณูให้กระจายตัวด้วยปลายมีดผ่าตัด จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้วิธี squash technique ซึ่งเป็นการนำกระดาษชำระพับครึ่งแล้วสอดสไลด์ให้ด้านที่มีกระจกปิดสไลด์อยู่ด้านใน กดเบา ๆ ด้วยนิ้วหัวแม่มือให้อับละอองเรณูแตกออกราบกับสไลด์ ตรวจสอบฟองอากาศ แล้วนำไปตรวจดูการแบ่งเซลล์ของอับละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ microscope (ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX23 ประเทศ ญี่ปุ่น) เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์ของดอกที่อยู่ในระยะ tetrad เพื่อให้ได้ช่วงอายุของดอกที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

1. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อนของฟ้าทะลายโจร

นำดอกที่มีช่วงอายุที่เหมาะสมมาฟอกฆ่าเชื้อผิวภายนอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบระยะเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ นำไปแยกอับละอองเรณู แล้วจึง

นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร NLN (Nitsch and Nitsch medium (1967) ดัดแปลง Lichter (1982)) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BAP) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ 2 คือสารควบคุมการเจริญเติบโต naphthaleneacetic acid (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้นจำนวน 12 สูตรอาหาร โดยใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.7-5.8 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงไว้ในที่มีแสง โดยมีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส (ร้อยละ) น้ำหนักแคลลัส (มิลลิกรัม) และลักษณะของแคลลัส โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 4×3 (factorial in CRD (Completely Randomized Design) ทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้นต่อจาน และนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corp. (2020). IBM SPSS Statistics version 26 Computer software) เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วจึงจะนำไปเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูต่อในการทดลองที่ 2

2. การศึกษาอุณหภูมิต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อนของฟ้าทะลายโจรโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

นำอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจรฟอกฆ่าเชื้อผิวภายนอก (ตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1) เข้ามาใหม่อีกครั้งแล้วจึงนำไปวางบนสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อนของฟ้าทะลายโจร สูตรอาหารที่มีปริมาณการชักนำให้เกิดแคลลัส และน้ำหนักของแคลลัสมากที่สุด (การทดลองที่ 1) นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อนของฟ้าทะลายโจร โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู โดยวางแผนการทดลองแบบ $2 \times 3 \times 4$ factorial in CRD ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ ระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศา

เซลล์เซียส คือเวลา 1 และ 3 วัน ปัจจัยที่ 2 คือ อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง คือ 28, 30 และ 32 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่ 3 คือระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 1, 2, 3 และ 4 วัน รวมทั้งสิ้นจำนวน 24 กรรมวิธี โดยนำอับละอองเรณูไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 3 วัน หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28, 30 และ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง 1, 2, 3 และ 4 วัน ในที่มีติดจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงไว้ในที่มีแสง โดยมีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการเกิดแคลลัส (ร้อยละ) น้ำหนักของแคลลัส (มิลลิกรัม) ลักษณะของแคลลัส และการชักนำให้เกิดต้นอ่อน แล้วโดยวางแผนการทดลองแบบแบบแฟกทอเรียล $2 \times 3 \times 4$ (factorial in CRD (Completely Randomized Design) ทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ซีนต่องาน นำมาวิเคราะห์แปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม (IBM Corp. (2020). IBM SPSS Statistics version 26 Computer software)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

เมื่อนำดอกฟ้าทะลายโจรที่มีอายุของการพัฒนาของดอกช่วง 9 ถึง 1 วันก่อนดอกบาน ไปตรวจดูพัฒนาการแบ่งเซลล์ของอับละอองเรณูในระยะ tetrad ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Figure 1B) พบว่า มีการพัฒนาเซลล์ของดอกฟ้าทะลายโจรในระยะ tetrad มากที่สุดอยู่ในช่วงระยะ 9 ถึง 7 วัน ก่อนดอกบาน (Figure 1A) ซึ่งเป็นระยะดอกที่เหมาะสมของพัฒนาการไมโครสปอร์ที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู เนื่องจากระยะนี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ เพราะเป็นระยะที่มีผนังเซลล์บางสามารถชักนำได้ง่าย (Ruangsanka *et al.*, 2020) สำหรับดอกที่อยู่ในช่วง 5 วันก่อนดอกบาน ไปจนถึง 1 วันก่อนดอกบาน มีการพัฒนาไปเป็นละอองเรณูหรือระยะที่สมบูรณ์พร้อมรับการผสมเกสร (Figure 1C) ซึ่งไม่เหมาะสม

ต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู เพราะต้นอ่อนที่ได้อาจเป็นต้นที่ถูกผสมไปแล้ว

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของฟ้าทะลายโจรในปัจจัยหลักทั้ง 2 ชนิด (Table 1) คือ BAP และ NAA พบว่า ความเข้มข้นของ BAP มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย BAP ที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดที่ 5.395 ซึ่งมากกว่าการใช้ BAP ที่ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่าไซโตไคนิน โดยเฉพาะ BAP มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และเซลล์เกิดการสูญเสียหน้าที่เฉพาะ (dedifferentiation) ของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานของการชักนำแคลลัส (George *et al.*, 2008; Thorpe, 2007) นอกจากนี้ การไม่เกิดแคลลัสในชุดควบคุมยังสนับสนุนว่าการมีอยู่ของไซโตไคนินเป็นเงื่อนไขจำเป็นต่อการเริ่มต้นการตอบสนองของเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ (Ikeuchi *et al.*, 2013) และในความเข้มข้นของ NAA ส่งผลต่ออัตราการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย NAA ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุดที่ 2.491 ซึ่งมากกว่าการใช้ NAA ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าออกซินมีบทบาทในการสนับสนุนการเกิดแคลลัส โดยเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากออกซินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดตัวของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเนื้อเยื่อพืช (Skoog and Miller, 1957; George *et al.*, 2008)

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อน้ำหนักของแคลลัสในฟ้าทะลายโจรในปัจจัยหลักทั้ง 2 ชนิด (Table 2) คือ BAP และ NAA พบว่า ความเข้มข้นของ BAP ส่งผลต่อน้ำหนักแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในชุดที่ไม่เติม BAP ไม่พบการเกิดแคลลัส (NC) ขณะที่การเพิ่มระดับ BAP ส่งผลให้น้ำหนักแคลลัสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดย BAP ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด 0.644 มิลลิกรัม ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า BAP มีบทบาทสำคัญไม่เพียงต่อการชักนำให้เกิด

Table 1. Effect of BAP and NAA on percentage of callus formation of *Andrographis paniculata* cultured on NLN medium for 8 weeks.

Main effects: Factor A: BAP

BAP (mg/L)	Callus formation (%)
0.0	NC
0.1	0.248 c
0.5	2.143 b
1.0	5.395 a
F-test	*

Factor B: NAA

NAA (mg/L)	Callus formation (%)
0.0	1.548 b
0.1	1.801 b
0.5	2.491 a
F-test	*

Interaction effect (BAP × NAA)

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Callus formation (%)
0.0	0.0	NC
0.0	0.1	NC
0.0	0.5	NC
0.1	0.0	0.104 e
0.1	0.1	0.245 e
0.1	0.5	0.395 de
0.5	0.0	1.575 cd
0.5	0.1	2.355 c
0.5	0.5	2.498 c
1.0	0.0	4.513 b
1.0	0.1	4.603 b
1.0	0.5	7.070 a
F-test (A×B)		*
CV (%)		25.16

Table 2. Effect of BAP and NAA on callus weight of *Andrographis paniculata* cultured on NLN medium for 8 weeks.

Main effects; Factor A: BAP

BAP (mg/L)	Callus weight (mg)
0.0	NC
0.1	0.121 c
0.5	0.352 b
1.0	0.644 a
F-test	*

Factor B: NAA

NAA (mg/L)	Callus weight (mg)
0.0	0.214 b
0.1	0.275 b
0.5	0.347 a
F-test	*

Interaction effect (BAP × NAA)

BAP (mg/L)	NAA(mg/L)	Callus weight (mg)
0.0	0.0	NC
0.0	0.1	NC
0.0	0.5	NC
0.1	0.0	0.087 g
0.1	0.1	0.123 f
0.1	0.5	0.154 e
0.5	0.0	0.213 d
0.5	0.1	0.416 c
0.5	0.5	0.426 c
1.0	0.0	0.558 b
1.0	0.1	0.562 b
1.0	0.5	0.810 a
F-test (A×B)		*
CV (%)		1.50

Mean values within the same column followed by different superscript letters (a, b, c, etc.) are significantly (*) different according to the F-test at the 95% confidence level ($P < 0.05$). Values with the same letter are not significantly different. NC = no callus formation

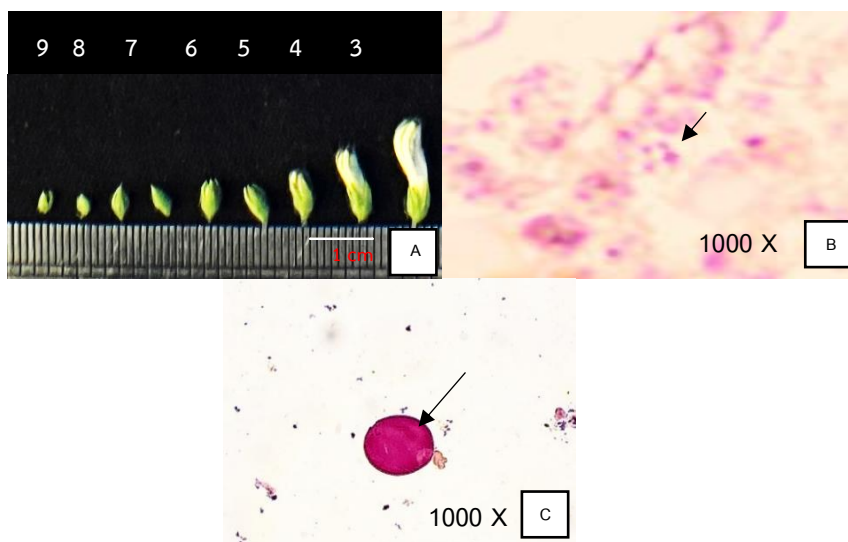


Figure 1. Pollen stage from anther of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees A) young flower bud from left to right, 9 to 1 day old before flower bloom B) tetrad stage and C) pollen

แคลลัสเท่านั้น แต่ยังส่งผลต่อการเจริญ และการสะสมชีวมวลของแคลลัสอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ George et al. (2008) ที่ระบุว่าไซโตไคนินมีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และเพิ่มอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากนี้ Thorpe (2007) ยังรายงานว่าระดับไซโตไคนินที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และในปัจจัยของ NAA ที่ส่งผลต่อน้ำหนักแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย NAA ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด 0.347 มิลลิกรัม ผลการทดลองนี้สะท้อนบทบาทของออกซินในการส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์และการเพิ่มน้ำหนักของเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเมื่อใช้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้าทะลายโจรต่อการเกิดแคลลัสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน ระหว่าง BAP กับ NAA โดยการใช้ความเข้มข้นสาร BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณค่าเฉลี่ยของการเกิดแคลลัสสูงที่สุดที่ร้อยละ 7.70 ที่น้ำหนัก 0.810

มิลลิกรัม (Table 2) สูตรที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อพิจารณาจะเห็นได้ว่าหากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียว (Table 1) จากการศึกษาปริมาณการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า หากเติม BAP ร่วมกับ NAA เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณของการชักนำแคลลัสเพิ่มขึ้นด้วย แต่ต้องอยู่ในสมดุล หากมากเกินไปทำให้พืชได้รับความเสียหายและตายได้ ด้านรูปแบบของแคลลัส การเกาะกันของแคลลัสที่พบในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู ทั้งการเกาะกันแบบหลวม (Figure 2A) หรือการเกาะกันแบบแน่น (Figure 2D) หรือแคลลัสที่เกิดขึ้นมาจากสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของทั้งไซโตไคนินและออกซินที่สูญเสียไป และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ระยะการพัฒนาของดอก อณูหุ้ม และปริมาณของซูโครส การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง BAP และ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน ตามลำดับ ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินมีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางสรีรวิทยาของพืช ได้แก่ การลดอิทธิพลการข่มของตายอดทำให้ตาข้างเกิด

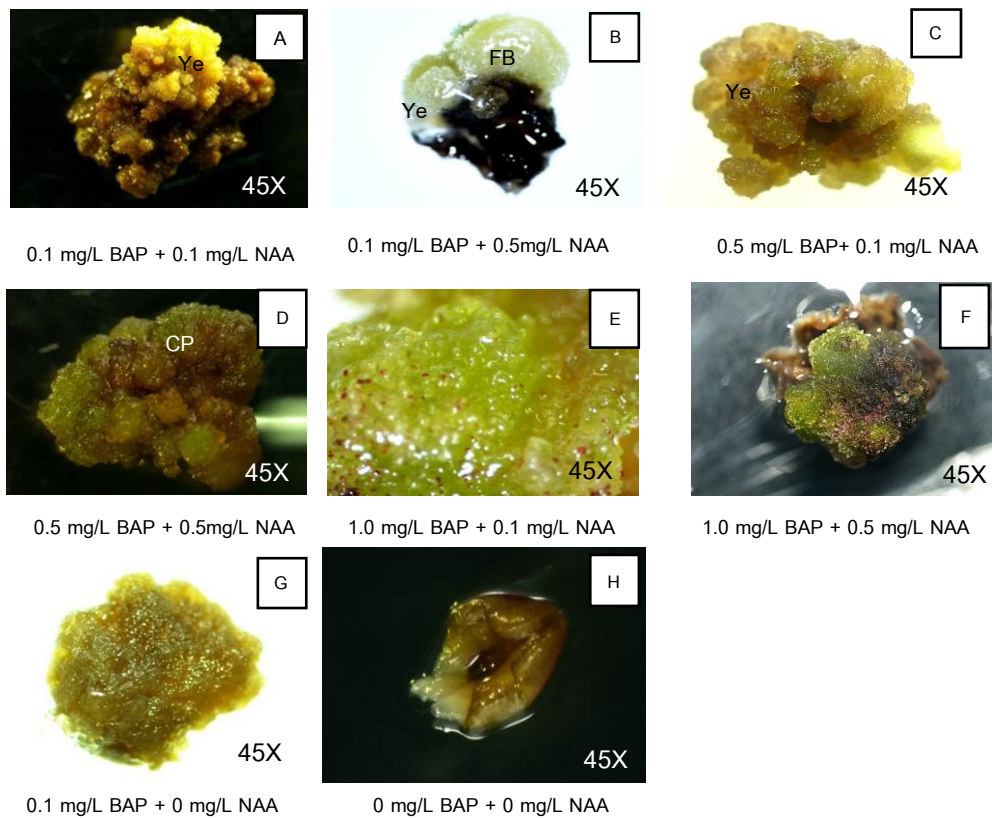


Figure 2. Characteristics of callus derived from anther culture of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees. on NLN medium supplemented with BAP and NAA after A) 2 weeks, B) 5 weeks (green callus), C) 20 days (friable callus and yellowish callus), D) 30 days (friable callus), E) 35 days (friable callus), F) 35 days (compact callus), G) 35 days (friable callus) and H) death
* CP (compact callus), FB (friable callus), Ye (yellowish callus), Gr (green callus), PP (purple callus)

การเจริญและการพัฒนาของอวัยวะ สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยึดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก (Azizi *et al.*, 2015) การประเมินว่าควรใช้สารในกลุ่มไซโทไคนิน และออกซินในปริมาณเท่าไรเพื่อการพัฒนายอดใหม่ของพืชนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สายพันธุ์ รวมถึงพันธุกรรมของพืชชนิดนั้น ๆ ด้วย (Afza *et al.*, 2000)

จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสใน 8 สัปดาห์ ใน 3 ปัจจัยหลัก พบว่า ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (Incubation time) จาก Table 3 มีผลต่อร้อยละการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วันให้ร้อยละการเกิดแคลลัส 2.38 ซึ่งสูงกว่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยง 3 วัน ที่ให้ร้อยละการเกิดแคลลัสที่ 1.87 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงในระยะเวลาสั้นช่วยลดความเครียดของเนื้อเยื่อและยังคงศักยภาพของเซลล์ในการเกิดกระบวนการ dedifferentiation ได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ George *et al.* (2008) ที่ระบุว่าการควบคุมระยะเวลาการเพาะเลี้ยงอย่างเหมาะสมมีผลต่อความสามารถของเนื้อเยื่อพืชในการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในสภาพปลอดเชื้อ และผลของอุณหภูมิ (Temperature) พบว่ามีผลต่อร้อยละการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

Table 3 Effect of incubation time, temperature, and curing period on percentage of callus formation of *Andrographis paniculata* cultured on NLN medium supplemented with 1 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA for 8 weeks.

Main effects Factor A: Incubation time

Time (day)	Callus formation (%)
1	2.38 a
3	1.87 b
F-test	*

Factor B: Temperature

Temperature (°C)	Callus formation (%)
28	5.07 a
30	0.98 b
32	0.34 c
F-test	*

Factor C: Curing period

Curing (day)	Callus formation (%)
1	3.51 a
2	2.88 b
3	1.41 c
4	0.72 d
F-test	*

Interaction effect (Time × Temperature × Curing)

Time (day)	Temp (°C)	Curing (day)	Callus formation (%)	Callus color	Callus type
1	28	1	7.72 a	Gr, Vi, Ye	CP
		2	7.10 ab	Gr	CP
		3	5.21 c	Gr	CP
		4	2.90 d	Gr	CP
1	30	1	2.51 de	Gr	CP
		2	0.99 gh	Gr	CP
		3	0.31 hij	Ye	FB

Table 3 Effect of incubation time, temperature, and curing period on percentage of callus formation of *Andrographis paniculata* cultured on NLN medium supplemented with 1 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA for 8 weeks. (continued)

Interaction effect (Time × Temperature × Curing)

Time (day)	Temp (°C)	Curing (day)	Callus formation (%)	Callus color	Callus type
1	32	4	0.26 ij	Ye	FB
		1	0.69 ghij	Ye	FB
		2	0.94 ghi	Ye	FB
		3	0.05 j	Ye, Wh	FB
3	28	4	NC	–	–
		1	7.56 a	Gr, Wh	FB, CP
		2	6.81 b	Gr, Wh	FB, CP
		3	2.09 e	Gr, Wh	FB, CP
3	30	4	1.20 fg	Gr, Wh	FB, CP
		1	1.83 ef	Ye	FB
		2	1.13 g	Ye	FB
		3	0.81 ghi	Br	FB
3	32	4	NC	–	–
3	32	1	0.75 ghi	Br	FB
3	32	2	0.33 hij	Br	FB
		3	NC	–	–
		4	NC	–	–
F-test (AxBxC)			*		
CV (%)			18.92		

Mean values within the same column followed by different superscript letters (a, b, c, etc.) are significantly (*) different according to the F-test at the 95% confidence level ($P < 0.05$). Values with the same letter are not significantly different.

NC = no callus formation = friable callus, CP = compact callus. Gr = green, Ye = yellow, Br = brown, Vi = violet, Wh = white.

ให้ร้อยละการเกิดแคลลัสสูงสุดที่ 5.07 รองลงมาคือ 30 องศาเซลเซียส ที่ 0.98 และ 32 องศาเซลเซียสที่ 0.34 ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิที่สูงเกินไปส่งผลเชิงลบต่อการแบ่งเซลล์ และควมมีชีวิตของเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความเครียดจากความร้อน (Heat stress) ที่รบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Thorpe, 2007) ทั้งนี้ George *et al.* (2008) รายงานว่า อุณหภูมิประมาณ 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของพืชส่วนใหญ่ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงหลังเพาะเลี้ยงด้วยความร้อน (Curing period) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อร้อยละการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยความร้อนเป็นเวลา 1 วันให้ร้อยละการเกิดแคลลัสสูงสุดที่ 3.51 และลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 2 3 และ 4 วัน ตามลำดับ ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความร้อนเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดความเครียดสะสม ส่งผลให้ความสามารถในการแบ่งเซลล์ลดลง และนำไปสู่การเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ikeuchi *et al.* (2013) ที่ระบุว่าความเครียดที่มากเกินไปอาจยับยั้งการเกิดแคลลัสและเร่งกระบวนการชราของเซลล์

จากการศึกษาอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและชักนำให้เกิดขึ้น เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อุณหภูมิมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงทั้งอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ โดยอุณหภูมิร่วมกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ใช้แล้วชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุดที่สุด คือ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 1 วัน ร่วมกับอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 1 วัน ให้ผลการชักนำแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดที่ร้อยละ 7.72 (Table 3) และที่ให้ผลการชักนำน้อยที่สุด คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 3 วัน ร่วมกับ 32 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 2 วัน ให้ผลการชักนำแคลลัสเฉลี่ย 0.33 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 1 วัน ร่วมกับ 32 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 4 วัน เช่นเดียวกันกับ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 3 วัน ร่วมกับ 32 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 4 วัน

และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 3 วัน ร่วมกับ 32 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 3 วัน (Table 3) จากผลพบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 1 วัน ร่วมกับ 28 องศาเซลเซียส ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสได้มากที่สุด และยังสามารถให้เกิดขึ้นอ่อน (Figure 3C) เพราะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำก่อนทำให้อัตราการหายใจ และการใช้พลังงานภายในอับเรณูต่ำลง ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของละอองเรณูเพิ่มขึ้น (Zhang and Tan, 1997) ชักนำให้เกิดกลไกการพัฒนาไปเป็นต้นของละอองเรณู อันเกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยอุณหภูมิต่ำทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการพัฒนาของละอองเรณูจาก gametophytic ไปเป็น sporophytic (Chen, 1978; Raina, 1983) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงของพืชจะอยู่ในช่วง 28 - 32 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดความเครียดทำให้พืชตอบสนองต่อความเครียดโดยสิ่งเร้าที่เกิดจากอุณหภูมิ (Touraev and Heberle-Bors, 2003) ปัจจัยที่ทำให้พืชไม่เจริญเติบโต คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงหากอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไป และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานเกินไป อาจทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ปัจจัยเรื่องของอุณหภูมิ อาหารเพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต ถือเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของพืชหลายใจ สอดคล้องกับ Krudnak (2011) ได้กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการผลิตพืชสายพันธุ์แท้

จากการศึกษาด้านรูปแบบของแคลลัส พบว่า สีของแคลลัสที่พบในการเพาะเลี้ยงจากอับละอองเรณู พืชหลายใจ มีสีเขียว สีเหลือง (Figure 3A) และยังพบแคลลัสที่มีสีม่วง (Figure 3B) ที่เกิดจากการผลิตสารทุติยภูมิคือ สารสีกลุ่มแอนโทไซยานิน หรือ ฟลาโวนอยด์ สำหรับแคลลัสสีเขียวเกิดจากการผลิตสารสีกลุ่มคลอโรฟิลล์ (Smykalova *et al.*, 2006) สีน้ำตาล เกิดจากแคลลัสของพืชหลายใจเมื่อมีอายุเกิน 60 วัน พบว่า เกิดการ-browning ซึ่งลักษณะแคลลัสเป็นสีน้ำตาล คือ ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้ สอดคล้องกับ Liang *et al.* (1978) ได้กล่าวไว้ว่า แคลลัสอายุเกินกว่า 60 วัน

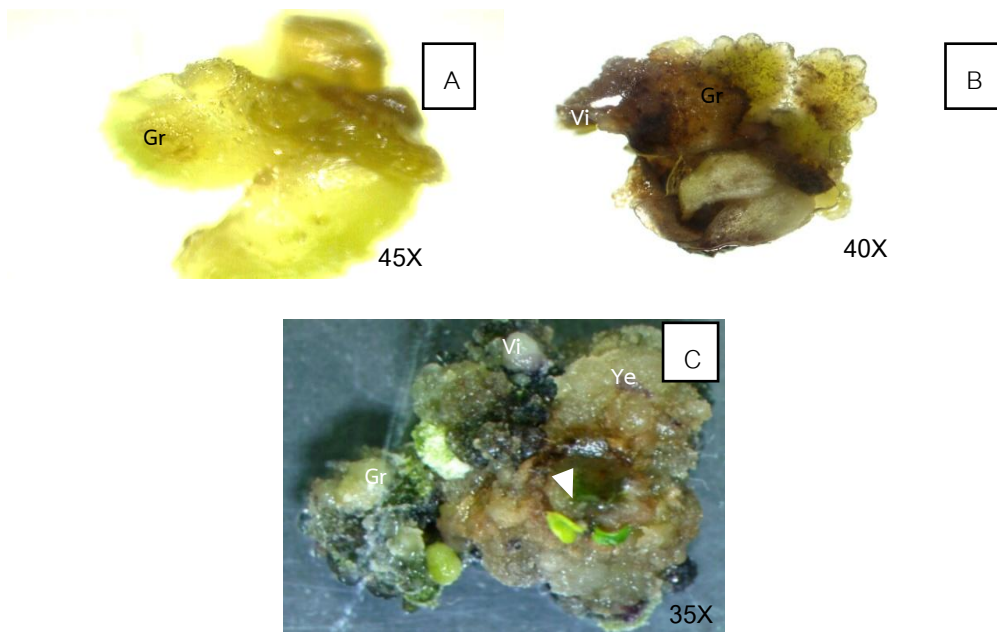


Figure 3. Embryo formation of callus derived from anther culture of *Andrographis paniculata* on NLN (Nitsch and Nitsch medium (1967)), medium supplemented with BAP 1 mg/l and 0.5 mg/L NAA culturing at 4°C for 1 day, was further transplanted to high temperature of 28°C for 1 day A) 2 weeks, B) 4 weeks and C) embryo (White arrow)

* CP (compact callus), FB (friable callus), Ye (yellowish callus), Gr (green callus), PP (purple callus)

ไปแล้ว ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้ และตายในที่สุด ความสามารถในการฟื้นฟูของแคลลัสที่แตกต่างกันมีสาเหตุมาจากอาหารเพาะเลี้ยงและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ไม่ว่า สี หรือการพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก สีของแคลลัสที่มีสีเขียว จะให้ร้อยละของการพัฒนาไปเป็นยอดกับรากได้ดีกว่าแคลลัสที่เป็นสีเหลือง ซึ่งแคลลัสสีเหลืองมีการพัฒนาที่ต่ำ สีของแคลลัสอาจเป็นทางเลือกให้กับนักพัฒนาเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเพื่อสร้างความแตกต่างได้

เมื่อพิจารณาในส่วนของการเกาะกันของแคลลัส พบว่า แคลลัสที่เกาะกันแบบแน่นมีการพัฒนาไปเป็นต้นได้มากกว่าแคลลัสที่เกาะกันหลวม สอดคล้องกับ Phamorn and Na Chiangmai (2009) และ Sangduen and Khampilanon (2005) ที่ทำการทดลองเรื่องผลของอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดแคลลัสของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พบว่า ลักษณะของแคลลัส

ที่เหมาะสมในการชักนำให้พัฒนาเจริญไปเป็นต้นได้ คือ ลักษณะแคลลัสที่มีการเกาะกันแบบแน่น (compact callus) แต่ขัดแย้งกับ Sayvongjai *et al.* (2016) ที่ทำการทดลองเรื่องการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดอ่อนสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พบว่า แคลลัสที่มีการเกาะกันแบบหลวม (friable callus) สามารถเจริญไปเป็นยอดอ่อนได้ แต่เมื่อพิจารณาผลการทดลองของการเพาะเลี้ยงอับเรณูของฟ้าทะลายโจร แสดงให้เห็นว่า แคลลัสที่มีสีเขียวมีรูปแบบการเกาะกันแบบแน่น สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม

สรุป

ดอกของฟ้าทะลายโจรที่มีการพัฒนาของระยะการแบ่งเซลล์ที่อยู่ในระยะ tetrad อัตราสูงในช่วงระยะ

ดอกอายุ 9 ถึง 7 วัน ก่อนดอกบาน ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของฟ้ายะลวยโจรอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุดร้อยละ 7.07 ส่วนสูตรอาหารที่ไม่เติม BAP แต่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในฟ้ายะลวยโจร

การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร NLN ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำให้แคลลัสฟ้ายะลวยโจรมีปริมาณสูงที่สุดร้อยละ 7.72 ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และการเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิสูง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสของฟ้ายะลวยโจรได้ การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน พบว่าอาหาร NLN ที่เติมสาร BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่ในอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำให้แคลลัสฟ้ายะลวยโจรชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ โดยมีการชักนำให้เกิดต้นมากที่สุด 1 ต้น ซึ่งขั้นตอนต่อไปจะนำตรวจสอบโครโมโซมว่าเป็น Haploid ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริ มูลนิธิชัยพัฒนา ปีงบประมาณ 2562-2565 และคณะกรรมการการเกษตร สาขาวิทยาการสมุนไพร ณ ห้องปฏิบัติการทางชีวภาพทางพืชสมุนไพร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการปฏิบัติงาน ตลอดจน

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Afza, R., M. Chen., F. Zepata, J. Xie., K.H. Fundi, K.S. Lee, E.B. Mucio and A. Kodym. 2000. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Science* 153(2): 155-159.
- Azizi, P., M.Y. Rafii., M. Maziah., S.N.A. Abdullah, M.M. Hanafi, M.A. Latif, A.A. Rashid and M. Sahebi. 2015. Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development* 135: 1-15.
- Bajaj, Y.P.S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. pp. 3-44. *In*: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Haploid in Crop Improvement I. Biotechnol in Agriculture and Forestry*. Vol 12. Springer Berlin, Heidelberg.
- Boopathi, C. 2000. *Andrographis* spp.: a source of bitter compounds for medicinal use. *Ancient Science of Life* 19(3-4): 164-168
- Chaleff, R.S. and A. Stolarz. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. *Physiologia Plantarum* 51(2): 201-206.

- Chen, C.1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. *Crop Science* 18(5): 905-906.
- Chen, Z.J. 2013. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nature Reviews Genetics* 14(7): 471 - 482.
- Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, 25 - 30 May 1978, Science Press, Peking.
- Department of Agricultural Extension. 2019. *Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees* (Fa Thalai Chon). Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 70 p. (in Thai)
- George, E.F., M.A. Hall and G.J. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue cultur. 3rd ed. Springer, Dordrecht. 540 p.
- Genovesi, A.D. and G.B. Collins. 1982. *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science* 22(6): 1137 - 1144.
- Ikeuchi, M., K. Sugimoto and A. Iwase. 2013. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25(9): 3159 - 3173.
- Krudnak, A. 2011. Anther culture and effects of boron on pollen quality of sunflower. M.S. Thesis. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. 91 p. (in Thai)
- Liang, C.C., Y.H. Chou and C.M. Chen. 1978. A study of submicroscopic structure and metabolic blocks in the albino anther plants of rice. pp. 161 - 166. *In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Science Press, Beijing.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 105(5): 427-434.
- 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 (Natural Science)* 39(3): 388 - 399.
- Meesakul, M., P. Pongtongkam and S. Peyachoknagul. 2005. Anther culture of F1 Hybrid Rice and BC1 Hybrid Rice for the Production of Doubled Haploid. Kasetsart University Bangkok. 539 p. (in Thai)
- Niranjan, A., S.K. Tewari and A. Lehri. 2010. Biological activities of Kalmegh (*Andrographis paniculata* Nees.) and its active principles -A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1(2): 125 - 135.
- Nitsch, C. and J.P. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta* 72: 355 - 370.
- Parixit. B., C. Bharath, N. Rajarajeshwari and S. Ganapaty. 2012. The genus *Andrographis*. a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 1835 - 1856.
- Phamorn, W. and P. Na Chiangmai. 2009. Effects of culture media and explant types on callus induction of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Agriculture* 25(2): 125 - 133. (in Thai)

- Raina, S.K. 1983. Recent progress in rice anther culture studies. pp. 159-168. *In*: S.K. Sen and K.I. Giles. (eds). Plant Cell Culture in Crop Improvement. Springer, New York.
- Ruangsanka, S., N. Homprae and J. Ruangne. 2020. Stages of microspore development in various sizes of *Lilium longiflorum* var. *formolongo* flower buds. PSRU Journal of Science and Technology 5(1): 23-30. (in Thai)
- Samphantharak, K. 2003. Plant Breeding, Principle Methodology and Concept. Kasetsart University, Bangkok. 237 p. (in Thai)
- Sangduen, N. and S. Khumphiranont. 2005. Agricultural Biotechnology. Kasetsart University, Bangkok. 266 p. (in Thai)
- Sayvongjai, V., T. Chetianukornku and T. Pankasemsuk. 2016. Callus and shoot induction from endosperm of immature physic nut seed. Journal of Agriculture 32(3) : 331 - 338. (in Thai)
- Skoog, F., and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology. 11: 118-130.
- Smykalova, I., M. Vetrovcova, M. 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): 58-71
- Thorpe, T.A. 2007. History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology 37(2): 169-180.
- Touraev, A. and E. Heberle-Bors. 2003. Anther and microspore culture in tobacco. pp. 223 - 228. *In*: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko (eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht.
- Zapata, F.J. 1985. Rice Anther Culture at IRRI. pp. 85 - 95. *In*: Proceeding of the Inter-Center Seminar on International Agricultural Research Centers (IARCs) and Biotechnology. IRRI, Los Banos.
- Zhang, C.Y. and B.K.H. Tan. 1997. Mechanisms of cardiovascular activity of *Andrographis paniculata* in the anaesthetized rat. Journal of Ethnopharmacology 56(2): 97-101.
-