เทคนิคการขยายพันธุ์ชาฤาษีดอยตุง (*Paraboea doitungensis*) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์

Micropropagation Technique of *Paraboea doitungensis* for Conservation

พัชร ปิริยะวินิตร พัฒน์นรี รักษ์คิด ปัณฑารีย์ กาญจนวัฒนาวงศ์

Phatchara Piriyavinit Padnaree Rukkid Pantaree Kanjanawattanawong

ABSTRACT

Paraboea doitungensis, which belongs to family Gesneriaceae, is an endemic species found only in Chiang Rai province of Thailand. It is currently listed as endangered making the study on germplasm multiplication by *in vitro* propagation technique indispensable. This research was divided into 2 parts : study on seed pod sterilization method and finding appropriate medium for micropropagation. The results showed that appropriate sterilization method was by immersing seed pod in 95% ethanol, followed by burning the outer surface of seed pod and dipping seeds inside pod in 5% hydrogen peroxide (H_2O_2). This sterilization method could yield the uncontaminated seedlings up to 50%. The microplants from leaf culture were transferred to MS medium supplemented with 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/L Naphthalene acetic acid (NAA) and Benzyladenine (BA). The results showed that addition of 0.1 mg/L NAA alone could induce the average number of vigorous shoots of 2.48. They were further transfered to MS and ½ MS medium supplemented with 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/L NAA in order to investigate the root induction. The results demonstrated that ½ MS could induce the number of root and root length superior to MS in every NAA concentration. They also suggested that ½ MS without NAA was the better medium for root induction. It provided the average root number of 7.29 and average root length of 6.62 cm. Further research on acclimatization of the plantlets for successful transplanting and establishment under greenhouse conditions is still needed.

Key words: *Paraboea doitungensis, In vitro* propagation

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ปทุมธานี

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

Corresponding auther:phat87__ka@yahoo.com

บทคัดย่อ

ชาฤาษีดอยตุงจัดอยู่ในวงศ์ชาฤาษี เป็นพืชถิ่นเดียวของไทยที่พบเฉพาะใน จ.เชียงราย ทำให้เผชิญกับความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์จากธรรมชาติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์เชื้อพันธุ์พืช การทดลองแบ่งออกเป็นศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อฝัก และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อพันธุ์ ซึ่งผลการทดลอง พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อฝักโดยการจุ่มฝักในแอลกฮออล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ ตามด้วยบิดฝักเคาะเมล็ดใส่ในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 5% เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อฝักของชาฤาษีดอยตุง ทำให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 50% นอกจากนี้ การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยนำใบตัดเป็นชิ้นเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมกรดแนพทาลีนแอซิติก (NAA) ร่วมกับสารเบนซิลอะดีนิน (BA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. ซึ่งพบว่า การเติมสาร NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยจำนวน 2.48 ยอด ยอดที่สมบูรณ์จะถูกย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ ½ MS ร่วมกับการเติมสาร NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดราก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจาก NAA เป็นสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพ สามารถชักนำให้เกิดรากและความยาวรากได้ดีกว่าสูตรอาหาร MS และ ½ MS ที่เติม NAA ชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ย 7.29 ความยาวเฉลี่ย 6.62 ซ.ม. ทั้งนี้ควรมีการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยนี้ เพื่อนำชาฤาษีดอยตุงออกปลูกในสภาพโรงเรือนต่อไป

คำสำคัญ: ชาฤาษีดอยตุง การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

บทนำ

ชาฤาษีดอยตุง (*Paraboea doitungensis* Triboun & D.J. Middleton) จัดอยู่ในวงศ์ Gesneriaceae พืชชนิดนี้เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นส่วนล่างมีเนื้อไม้แข็ง ใบและก้านมีปีกแคบ ๆ ใต้ใบปกคลุมด้วยขนสีน้ำตาลอ่อน ช่อดอกกระจุกสั้นออกดอกเป็นคู่ กลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ กลีบดอกเป็นรูประฆังสีชมพู โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอดมีสีชมพูชีดแต้มสีเหลืองจางที่ฐาน เกสรเพศผู้ 2 อัน ติดอยู่ใกล้ฐานภายในหลอด เกสรเพศผู้เป็นหมัน 2-3 อัน ลดรูปจนมีขนาดเล็ก ฝักหรือผลเป็นแบบแห้งแตกเป็นรูปทรงกระบอกแคบ ยาว 5-6.8 ซม. และกว้าง 1.8 มม. มีลักษณะบิดเป็นเกลียว ภายในฝักประกอบด้วยเมล็ดเล็กลักษณะเป็นผงจำนวนมาก ออกดอกและติดฝักช่วงเดือน กรกฎาคมถึงพฤศจิกายน สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature; IUCN) ได้ประเมินเชื้อพันธุ์พืชชนิดนี้ว่ามีความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์จากธรรมชาติ เข้าขั้นอันตราย (Endangered) เนื่องจากพืชชนิดนี้พบเฉพาะถิ่นในบริเวณจำกัดไม่เกิน 100 ตร.กม. ต้องอาศัยปัจจัยแวดล้อมที่มีความจำเพาะสำหรับการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ ความชื้น หรือ ระดับความสูง เป็นต้น โดยพืชชนิดนี้พบได้เฉพาะบริเวณยอดเขาหินปูน ดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย พื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่เปิดไม่มีการควบคุม ทำให้ประชากรของชาฤาษีดอยตุงถูกคุกคามและถูกรบกวนได้ง่าย ทำให้จำนวนประชากรมีความสมบูรณ์ลดลง (Triboun and Middleton, 2012) ดังนั้น การขยายเชื้อพันธุ์

ในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากใช้พื้นที่น้อยในการขยายพันธุ์และเหมาะกับพืชที่มีคุณลักษณะที่เฉพาะให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อและปลอดจากภัยธรรมชาติ เช่น การขยายพันธุ์เปราะราศี (*Kaempferia larseii* Sirirugsa) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, Kinetin และ TDZ ร่วมกับฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การเติม TDZ ความเข้มข้น 1 มก./ล. ชักนำการเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด และเติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ชักนำการเกิดรากเฉลี่ยมากที่สุด (จิราภรณ์ และคณะ, 2558) การขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องเทียน ได้แก่ *Coelogyn triplicatula* โดยใช้ต้นอ่อนเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การเติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 13 ยอด (ธนากร และคณะ, ม.ป.ป.) หรือ *Coelogyn stricta* ใช้ pseudobulb เลี้ยงบน ½ MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การเติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด (Basker and Narmatha Bai, 2006)

งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤาษีดอยตุง และ 2) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นชาฤาษีดอยตุง ซึ่งผลการวิจัยสามารถนำไปใช้พัฒนาต่อยอดการวิจัยที่สูงขึ้นและการวางแผนการอนุรักษ์ต้นชาฤาษีดอยตุงในสภาพธรรมชาติและการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจและรวบรวมตัวอย่าง

ทำการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างชาฤาษีดอยตุงจากยอดเขาหินปูน บริเวณดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย ซึ่งมีช่วงฤดูการออกดอกและติดฝักระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน ของทุกปี

2. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤาษี

ทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเผาฝัก ซึ่งแบ่งเป็น 3 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 นำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดออกเลี้ยงบนอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ (113.65 มล.) ประมาณ 100 เมล็ด ให้มีปริมาณเมล็ดต่อขวดใกล้เคียงกัน

วิธีการที่ 2 นำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อตามวิธีการของ จิตราพรรณ (2536) โดยฝักชาฤาษีดอยตุง 1 ฝักต่อน้ำ 2.5 มล. หลังจากนั้นดูดน้ำออกแล้วเกลี่ยเมล็ดเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้

วิธีการที่ 3 นำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นบิดฝักให้แตกและแคะเอาเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 5% อัตราส่วน 2:1 (จิตราพรรณ, 2536) โดยฝักชาฤาษีดอยตุง 1 ฝักต่อสารละลาย 2.5 มล. หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเกลี่ยเมล็ดเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้

เมล็ดชาฤาษีที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 3 กรรมวิธี นำมาเพาะบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) จำนวน 5 ซ้ำ/กรรมวิธี

คิดเป็น 15 หน่วยทดลอง หน่วยทดลองละ 4 ขวด ย่อย และบันทึกจำนวนการปลอดการปนเปื้อนของเชื้อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ต้นชาฤาษีดอยตุง

3.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นชาฤาษีดอยตุง โดยเลือกใบระยะไม่อ่อนและขนาดเดียวกัน ตัดให้มีขนาด 1 × 1 ตร.ซม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมกรดแนพทาลีนแอซิติก (Naphthalene acetic acid; NAA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. ร่วมกับ เบนซิลอะดีนิน (Benzyladenine; BA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) จำนวน 6 ซ้ำ 96 หน่วยทดลอง โดย

ปัจจัยที่ 1 คือ ความเข้มข้นของ NAA 4 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล.

ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของ BA 4 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล.

บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนยอดที่สมบูรณ์ และขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นชาฤาษีดอยตุง โดยนำยอดสมบูรณ์ความสูง 4 ข้อ เลี้ยงบนอาหารลดปริมาณ MS ได้แก่ ½ MS และ MS ร่วมกับการเติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) จำนวน 5 ซ้ำ คิดเป็น 40 หน่วยทดลอง โดย

ปัจจัยที่ 1 คือ อาหารลดปริมาณ MS จำนวน 2 ระดับ ได้แก่ ½ MS และ MS

ปัจจัยที่ 2 คือ NAA ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มก./ล.

บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกข้อมูลจำนวนราก และความยาวของราก นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ทั้งนี้ทุกกรรมวิธีได้ทำการทดลองในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ 24-27 °ซ. ชั้นติดตั้งไฟสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสว่างประมาณ 2,000 ลักซ์ ควบคุมเวลาปิดเปิดไฟกำหนดระยะเวลาการให้ความสว่างนาน 16 ชม./วัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤาษีดอยตุง

การทดลอง พบว่า วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤาษีดอยตุง คือ การจุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านไฟ 2 ครั้ง จากนั้นบิดฝักและเคาะเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของสารละลาย H_2O_2 เข้มข้น 5% อัตราส่วน 2:1 หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเขี่ยเมล็ดเพาะบนอาหารสูตร MS เนื่องจากพบการปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 50% เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อทั้งหมด และเมื่อเพาะเมล็ดบนอาหาร MS นานประมาณ 1 เดือน เมล็ดจะเริ่มงอก (Table 1) ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยสารละลาย H_2O_2 เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการฟอกฆ่าเชื้อพืชต่าง ๆ เช่น เมล็ด *Aconitum heterophyllum* (Srivastava *et al*., 2010) และเมล็ดกล้วยไม้

(จิตราพรรณ, 2536) ต่างจากการฟอกฆ่าเชื้อฝักนครินทรา (*Paraboea sangwaniae*) (ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกันแต่ใช้วิธีการผ่านไฟโดยไม่ต้องเคาะเมล็ดใส่ในน้ำ สามารถนำไปเพาะบนอาหารสูตร MS ได้ทันที และมีความรอดสูงกว่าวิธีอื่น (พัชร และคณะ, 2555) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะลักษณะของฝักชาฤาษีดอยตุงเป็นรูปทรงกระบอกแคบ เมื่อได้รับความร้อนทำให้ฝักปริแตกหรือได้รับความเสียหายได้ง่ายกว่าฝักนครินทรา ซึ่งเป็นทรงกระบอกกว้าง ทำให้ฝักชาฤาษีดอยตุงเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ง่ายกว่าฝักนครินทรา ทั้งนี้ ขั้นตอนการล้างฝักด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาดนั้น ต้องระวังไม่ให้ฝักแตกและไม่ควรแช่น้ำนาน เพราะจะทำให้เมล็ดได้รับความเสียหายเนื่องจากน้ำซึมผ่านเข้าภายในฝัก ทำให้เมล็ดเกิดความชื้นและติดกันเป็นก้อน

Table 1 Effect of seed pod sterilization on the survival rate

sterilization method	Survival plantlets (%)
Burning pod	0
Burning pod + dipping in sterile water (H_2O)	0
Burning pod + dipping in 5% H_2O_2	50

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ต้นชาฤาษีดอยตุง

2.1 การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ NAA ร่วมกับกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA ผลการทดลองพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของสารกลุ่มออกซิน (NAA) และ ไซโตไคนิน (BA) เมื่อเลี้ยงใบของชาฤาษีดอยตุงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า มีการแตกยอดขนาดเล็กปริมาณมากเกาะกันเป็นกลุ่ม ซึ่งยอดไม่แข็งแรง และมีการพัฒนาเป็นยอดสมบูรณ์ได้น้อยกว่าใบที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต และเมื่อเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดขนาดใหญ่ที่สมบูรณ์สูงสุดเฉลี่ย 2.48 ยอด (Table 2) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับการเติม BA เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ที่มีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.30 ยอด

สำหรับขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อต้นชาฤาษีดอยตุงนั้น เมื่อเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว พบว่า เกิดการขยายขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อสูงสุดเฉลี่ย 3.42 ซม. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับการเติมสาร BA เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. (2.82 ซม.) เช่นกัน (Table 3) อย่างไรก็ตามต้นชาฤาษีดอยตุงที่ได้รับ NAA ร่วมกับ BA ในความเข้มข้นสูง จะทำให้เกิดการขยายปริมาณของเนื้อเยื่อ แต่การเกิดยอดที่สมบูรณ์ลดลง ซึ่งเนื้อเยื่อต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงจะสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี (Figure 1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการขยายพันธุ์แอฟริกันไวโอเล็ต (*Saintpaulia ionantha*) และกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับชาฤาษีดอยตุง โดยใช้ก้านใบแอฟริกันไวโอเล็ตเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม

NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.01 มก./ล. เพื่อชักนำการเกิดต้น ได้ดีกว่าการใช้ BA ความเข้มข้นสูง ๆ (Bilkey *et al*., 1978) แต่ผลการทดลองนี้จะแตกต่างกับการเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเป็นยอดได้ 100% (Khan *et al*., 2007)

Table 2 Effect of NAA and BA combination on shoot multiplication from leaf explants of *P. doitungensis* cultured on MS medium for 6 months

NAA (mg/L)	Number of shoots				
	BA (mg/L)				Mean
	0	0.1	0.5	1.0	
0	0.82 b xy	2.30 a x	2.00 a x	2.11 a x	1.81
0.1	2.48 a x	1.73 a xy	1.14 a yz	0.45 b z	1.45
0.5	1.42 b xy	1.70 a x	1.81 a x	0.45 b y	1.34
1.0	0.42 b xy	1.53 a x	1.20 a xy	0.25 b y	0.86
Mean	1.29	1.81	1.54	0.81	
CV (%)	32.43				

Means within columns and rows followed by the same letters are not signicantly different at 5% level by DMRT

- The a, b, c combination compares the differences in concentrations of auxin (NAA)

- The x, y, z combination compares the differences in concentration of cytokinin (BA)

Table 3 Effect of NAA and BA combination on shoot proliferation from leaf explants of *P. doitungensis* cultured on MS medium for 6 months

NAA (mg/L)	Shoot formation (cm)				
	BA (mg/L)				Mean
	0	0.1	0.5	1.0	
0	2.63 b x	1.73 b y	2.82 a x	2.78 a x	2.49
0.1	3.42 a x	1.88 a y	1.80 b y	1.42 b y	2.13
0.5	1.85 c x	1.85 a x	2.18 ab x	1.67 b x	1.89
1.0	1.35 c x	1.88 a x	1.83 b x	1.27 b x	1.58
Mean	2.31	1.84	2.16	1.78	
CV (%)	32.4				

Means within columns and rows followed by the same letters are not signicantly different at 5% level by DMRT

- The a, b, c combination compares the differences in concentrations of auxin (NAA)

- The x, y, z combination compares the differences in concentration of cytokinin (BA)

2.2 จากการทดลองการปรับลดปริมาณ MS ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) พบว่า ระดับความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเกิดราก และไม่พบปฏิสัมพันธ์ของการปรับลดปริมาณ MS กับระดับความเข้มข้นของ NAA และ การลดปริมาณ MS เป็น ½ MS สามารถชักนำการเกิดรากของยอดชาฤาษีดอยตุงได้ดีกว่าเลี้ยงบนอาหาร MS โดยชักนำให้เกิดรากได้เฉลี่ย 7.29 ราก ยาวประมาณ 6.6 ซม. (Table 4 and Figure 2) ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองที่ทราบโดยทั่วไปว่าการชักนำการเกิดรากจะถูกกระตุ้นโดยความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น แอฟริกันไวโอเล็ต เมื่อเลี้ยงยอดบนอาหาร ½ MS ที่เติมกรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-acetic acid, IAA) ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. สามารถกระตุ้นการชักนำการเกิดรากได้ดี (Ghorbanzade and Ahmadabadi, 2014) และใน *Camptotheca acuminate* ซึ่งมีลักษณะเป็นพืชมีเนื้อไม้และยืนต้น กระตุ้นรากโดยเลี้ยงบนอาหาร MS หรือเลี้ยงบนอาหาร WP (Huimei *et al*., 2007) ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีส่วนคล้ายกับต้นชาฤาษีดอยตุง เนื่องจากต้นชาฤาษีดอยตุงมีลักษณะลำต้นส่วนล่างเป็นเนื้อไม้แข็ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการชักนำรากในแอฟริกันไวโอเล็ต ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับชาฤาษี พบว่าสามารถชักนำรากโดยใช้ชิ้นส่วนยอดเลี้ยงบนอาหาร MS และสามารถย้ายปลูกในโรงเรือนได้สำเร็จ (Sunpui and Kanchanapoom, 2002; Rout *et al*., 2006)

Table 4 Effect of NAA on root induction from shoot explants of *P. doitungensis* cultured on MS medium for 3 months

NAA (mg/L)	Number of roots			Root length (cm)		
	MS		Mean	MS		Mean
	MS	½ MS		MS	½ MS	
0	0.59	6.98	3.78	2.00	10.84	6.42
0.1	1.44	6.54	3.99	2.70	4.14	3.42
0.5	0.90	8.26	4.58	2.36	5.84	4.10
1.0	1.2	7.38	4.29	4.32	5.64	4.98
Mean	1.03 b	7.29 a		2.84 b	6.61 a	
CV(%)	29.98			32.1		

Means within and rows followed by the same letters are not signicantly different at 5% level by DMRT

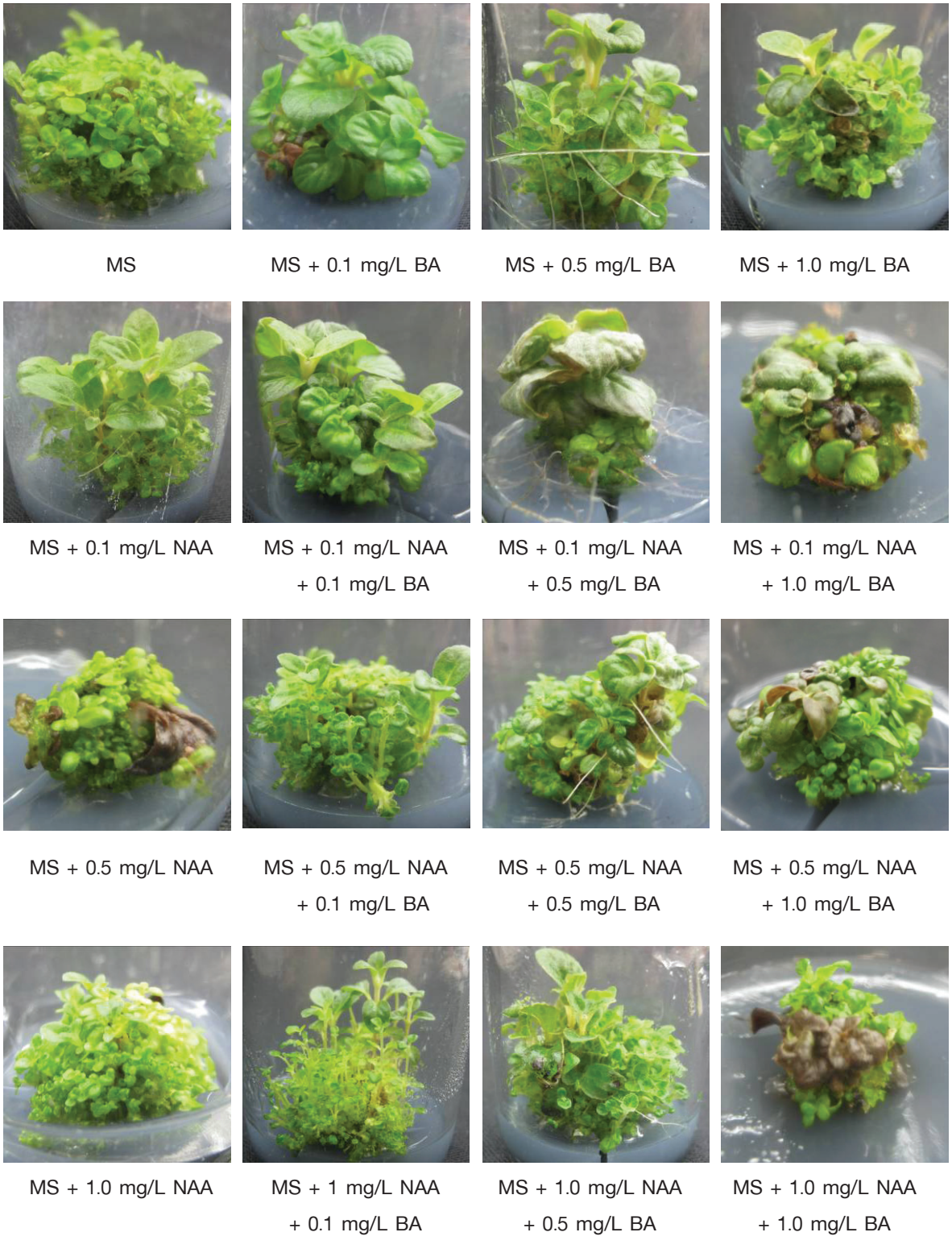

Figure 1 Shoot proliferation after 6 months cultured leaf explants on MS medium supplemented with different concentrations, of NAA and BA

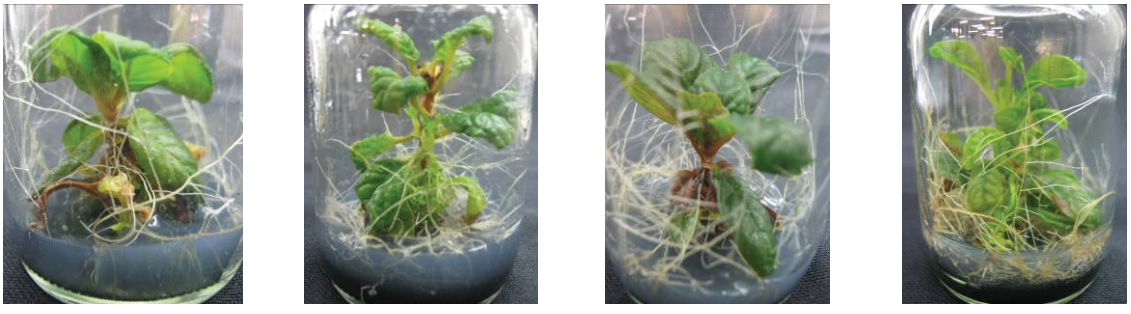

Figure 2 Shoot proliferation after 3 months cultured on MS medium supplemented with NAA

การย้ายปลูกต้นชาฤาษีดอยตุงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีการดัดแปลงจาก มณฑา และคณะ (2553) เลือกใช้ต้นที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงและมีรากจำนวนมาก นำมาปรับสภาพโดยนำออกจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คลายฝาขวดเพื่อลดความชื้นสัมพัทธ์ในขวด และเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศมากขึ้น ประมาณ 5-7 วัน จากนั้นล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด จุ่มยากันเชื้อรา วางพักบนตะกร้าให้แห้งเล็กน้อย แล้วปลูกโดยใช้วัสดุปลูก พีทมอส (peat moss) : หินอัคนีพุ (pumice stone) : หินเพอร์ไลต์ (perlite stone) : เม็ดดินเผา (popper) อัตราส่วน 3:1:1:1 นำต้นที่ปลูกลงในกระถางคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น ระวังไม่ให้ใบสัมผัสถุงวางไว้ในที่ร่ม เป็นเวลา 1-2 เดือน ปรับความชื้นโดยเปิดปากถุงที่ละน้อย พบว่า ต้นชาฤาษีดอยตุงแสดงอาการเหี่ยวและตายในที่สุด ซึ่งยังไม่พบการรอดชีวิตในสภาพโรงเรือนสาเหตุอาจเป็นเพราะต้นชาฤาษีต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่มีความจำเพาะในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับต้นที่ขึ้นในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้ควรมีการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยนี้ เพื่อนำชาฤาษีดอยตุงออกปลูกในสภาพธรรมชาติต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อฝักชาฤาษีดอยตุง คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการเผาฝักชาฤาษีดอยตุงโดยการนำฝักจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านไฟ หลังจากนั้นบิดฝักและแคะเมล็ดใส่ในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของสารละลาย H_2O_2 เข้มข้น 5% อัตราส่วน 2:1 จากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MS

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จากใบชาฤาษีดอยตุง คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. หรือ BA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์มากกว่าการใช้ฮอร์โมน 2 ชนิดร่วมกัน

3. อาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำยอดของต้นชาฤาษีดอยตุงให้เกิดรากได้ดี คือ อาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ ผู้ค้นพบต้นชาฤาษีดอยตุงเป็นอย่างยิ่งที่ให้การสนับสนุนเรื่องข้อมูลและคำแนะนำต่าง ๆ เกี่ยวกับพืชชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ ผุดผ่อง สุรพล แสนสุข และปิยะพร แสนสุข. 2558. การขยายพันธุ์เปราะราศี (*Kaempferia larsenii* Sirirugsa) ในหลอดทดลองเพื่อการอนุรักษ์พืชหายากในประเทศไทย. *ว.วิทย.มข.* 43(4): 673-687.

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. *การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้.* ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 82 หน้า.

ธนากร วงษศา ณิชาภา ทองเหลือง และอนุพันธ์ กงบังเกิด. ม.ป.ป. ผลของ BA และ NAA ต่อการทวีจำนวนต้นอ่อน *Coelogyne triplicatula* Rchb.f. (Orchidaceae) ในสภาพปลอดเชื้อ. แหล่งข้อมูล http://tar.thailis.or.th/bitstream/123456789/549/1/วิจัย 10.pdf. Accesed: 3 สิงหาคม 2561

มณฑา วงศ์มณีโรจน์ รงรอง หอมหวน สุลักษณ์ แจ่มจำรัส และกมลศรี สระทองพรม. 2553. เทคนิคการย้ายปลูกต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ใน*: *งานครบรอบ 30 ปี ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง "สามทศวรรษเซ็นทรัลแล็บกับการบริการชุมชน"*. หน่วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช งานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเกษตร ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลองสถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

พัชร ปิริยะวินิตร พัฒน์นรี รักษ์คิด ปราโมทย์ ไตรบุญ และปาริฉัตร สังข์สะอาด. 2555. ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์นครินทรา (*Trisepalum sangwaniae*) พืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทยในสภาพปลอดเชื้อ. *ประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย ครั้งที่ 2*: 395-400.

Basker S. and V. Narmatha Bai. 2006. Micropropagation of *Coelogyne stricata* (D.Don) Schltr. Via pseudobulb segment cultures. Tropical and Subtropical Agroecosystems 6: 31-35.

Bilkey, P.C.; B.H. McCown and A.C. Hildebrandt. 1978. Micropropagation of african violet from petiole cross-sections. *Hort Science* 13(1): 37-38.

Ghorbanzade, Z. and M. Ahmadabadi. 2014. An improved system for rapid

in vitro regeneration of *Saintpaulia ionantha*. *Plant Tissue Cult. Biotech*. 24(1): 37-45.

Huimei, W.; Z. Yuangang and L. Hongmei. 2007. Efficient rooting and root development after transfer of regenerated plantlets of *Comptotheca acuminate*. *Eurasian J. For. Res*. 10(2): 179-184.

Khan, S.; S. Naseeb and K. Ali. 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimatization of African violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. *Pak. J. Bot*. 39(4): 1263-1268.

Rout, G.R.; A. Mohapatra and S.M. Jain. 2006. Tissue future of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.s* 24(6): 531-560.

Srivastava, N.; B. Kamal; V. Sharama; Y.K. Negi, A.K. Dovriyal; S. Gupta and V.S. Jadon. 2010. Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum hererophyllum* - An endangered medicinal herb. *Academic Arena* 2(6): 62-66.

Sunpui, W. and K. Kanchanapoom. 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 24(3): 358-364.

Triboun, P. and D.J. Middleton. 2012. Twenty new species of *Paraboea* (Gesneriaceae) from Thailand. *Gardens' Bulletin Singapore* 64(2): 333-370.

Wuttisit, M. and K. Kanchanapoom. 1996. Tissue culture propagation of Gloxinia. *Suranaree J. Sci. Technol*. 3: 63-67.