

การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อหญ้าพันเกลียว (*Ceropegia thailandica* Meve) พืชใกล้สูญพันธุ์อย่างยิ่งในประเทศไทย

In vitro Propagation of *Ceropegia thailandica* Meve, Critically Endangered Plant in Thailand

เกศินี ศรีปฐมกุล, อารยา อารจรณ เทียนหอม และทัศนัย จารุวัฒนพันธ์*

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Kesinee Sripathomkul, Araya Arjcharoen Theanhom and Tassanai Jaruwattanaphan*

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Received: June 28, 2019; Accepted: July 8, 2019

บทคัดย่อ

หญ้าพันเกลียวเป็นพืชถิ่นเดียวและใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทยที่มีลักษณะดอกโดดเด่น การนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถือว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์เพื่ออนุรักษ์พืชนอกถิ่นอาศัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์หญ้าพันเกลียวในสภาพปลอดเชื้อ โดยฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี และเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าการใช้ NaOCl ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาที ตามด้วย HgCl₂ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 5 นาที มีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด 26.66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนของหญ้าพันเกลียวในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม BA และ Kn ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดจำนวน 15.80 ยอด Kn ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดหัวได้มากที่สุด โดยมีอัตราการตอบสนอง 87 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหญ้าพันเกลียวในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม IBA และ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้เกิดรากมากที่สุดเมื่อเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรากจำนวน 3.60 ราก IBA ทุกความเข้มข้นและ NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : เทพทาโร; เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ; ฟอกฆ่าเชื้อ; ไซโทไคนิน; ออกซิน

Abstract

Ceropegia thailandica Meve is endemic and critically endangered. Plant tissue culture is the efficient method for *ex situ* conservation. This study aims to find a suitable method for *in vitro*

propagation of *C. thailandica*. Nodal segments were sterilized with four different surface sterilization methods and cultured on MS medium for 5 weeks. The result showed that the explants sterilized with 0.3 % (v/v) NaOCl for 10 minutes followed by 0.2 % (w/v) HgCl₂ for 5 minutes had the lowest contamination rate (40 %) and the highest survival rate (26.66 %). Effect of BA and Kn on shoot and tuber induction from nodal segment was studied. Nodal segments were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of BA and Kn (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 or 2.5 mg/L) for 8 weeks. The result showed that the best shoot induction (15.80 shoots) was found in MS medium supplemented with 2 mg/L BA, and the best tuberization (87 %) was found in MS medium supplement with 2.5 mg/L Kn. Regenerated shoots of *C. thailandica* were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of IBA and NAA (0, 0.5, 1.0, 1.5 2.0 or 2.5 mg/L) for 8 weeks to observed root induction. The results showed that 0.5 mg/L IBA had the highest root induction (3.60 roots), and at all concentrations IBA and 1.5 mg/L NAA gave the highest callus induction (100 %)

Keywords: *Ceropegia*; tissue culture; sterilization; cytokinin; auxin

1. คำนำ

พืชสกุล *Ceropegia* L. จัดอยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อสามัญว่า Lantern flower ซึ่งมาจากลักษณะเด่นของดอกที่คล้ายโคมไฟ ส่วนมากเป็นพืชล้มลุก มีหัวใต้ดิน ลำต้นตรงหรือเลื้อย และมีลักษณะเด่นประจำสกุล คือ วงกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็นห้าแฉกแล้วม้วนจรดกัน เป็นโครงสร้างที่คล้ายกับกรง ปัจจุบันทั่วโลกพบพืชสกุลนี้มากกว่า 260 ชนิด กระจายพันธุ์บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย มาดากัสการ์ เขตร้อนของอาระเบีย เกาะคานารี แอฟริกา นิวกินี และตอนเหนือของออสเตรเลีย ในต่างประเทศพืชสกุล *Ceropegia* หลายชนิดนิยมใช้เป็นไม้ประดับและเป็นพืชสมุนไพรโดยมีสรรพคุณบรรเทาอาการท้องร่วง ท้องเสีย ถอนพิษงู รักษาแผลเปื่อย หัวใต้ดินและรากสะสมอาหารมีสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ไขมัน ไฟเบอร์ ยาง สารกลุ่มแอลบูมิน และสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Beena *et al.*, 2003; Silva, 2015) บางชนิดสามารถรับประทานหัวสะสมอาหารได้ (Muthukrishnan *et al.*, 2013) ส่วนใน

ประเทศไทยมีรายงานการพบพืชในสกุลนี้ 17 ชนิด (Boonjaras and Thaithong, 2003; Meve, 2009; Kidyoo, 2014a; Kidyoo, 2014b; Kidyoo, 2015a; Kidyoo, 2015b; Kidyoo and Paliyavuth, 2017a; Kidyoo and Paliyavuth, 2017b; Kidyoo, 2018a; Kidyoo, 2018b; Thaithong *et al.*, 2018)

หญ้าพันเกลียว หรือ *C. thailandica* เป็นพืชสกุล *Ceropegia* ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียวและใกล้สูญพันธุ์อย่างยิ่ง (critically endangered, CR) (วรตลต์ และคณะ, 2558) พบครั้งแรกที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย เมื่อปี พ.ศ. 2551 บริเวณทุ่งหญ้าที่ราบบนยอดภูเขาหินทราย ชายป่าดิบแล้ง ที่ระดับความสูงประมาณ 300 เมตร (Meve, 2009) ประกอบกับพื้นที่อาศัยถูกคุกคาม จึงมีการประเมินสถานภาพด้านการอนุรักษ์ตามแนวทางของ International Union of Conservation Nature (IUCN) พบว่าเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์อย่างยิ่ง (วรตลต์ และคณะ, 2558)

เนื่องจากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีทั่วไปใช้เวลานานและต้องใช้ต้นพันธุ์ค่อนข้างมาก ในขณะที่

การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใช้ต้นพันธุ์พืชไม่มาก สามารถควบคุมปัจจัยในการเจริญเติบโตได้ง่ายจึงสามารถเพิ่มจำนวนพืชได้มากในเวลาสั้น ช่วยกระตุ้นการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชได้ดี และได้ต้นพืชที่สะอาดปราศจากโรค จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการอนุรักษ์พืชนอกถิ่นอาศัย รักษาพันธุกรรมของพืชพื้นเมืองที่มีอยู่เดิม พืชหายาก และพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รังสฤษฎ์, 2540; Baker *et al.*, 2014) แต่ตัวอย่างพืชที่รวบรวมมาจากธรรมชาติมักมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ จึงต้องมีวิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (วารสารณ, 2551)

รายงานการศึกษาการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของพืชสกุล *Ceropegia* พบว่านิยมนำชิ้นส่วนของข้อที่มีตาข้างจากตัวอย่างพืชที่ปลูกในสภาพโรงเรือนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) ที่ความเข้มข้น 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-7 นาที (Patil, 1998; Nikam *et al.*, 2008; Chandore *et al.*, 2010; Chavan *et al.*, 2011; Krishnareddy และ Pullaiah, 2012; Nikam *et al.*, 2012; Chavan *et al.*, 2013; Phulwaria *et al.*, 2013; Chavan *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2015) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์พืชสกุล *Ceropegia* ในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ กลุ่มออกซิน (auxin) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดเซลล์ การยืดยาวของเซลล์ กระตุ้นการเกิดรากในพืช เช่น IBA (indole-3-acetic acid) และ NAA (naphthalene acetic acid) ซึ่งเป็นออกซินสังเคราะห์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และกลุ่มไซโทไคนิน (cytokinin) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์และกระตุ้นการเจริญของตาข้างเพิ่มการแตกกิ่ง เช่น BA (benzyladenine) และ Kn (kinetin) (พัชรียา, 2560) มีรายงานการขยายพันธุ์พืชสกุล *Ceropegia*

ในสภาพปลอดเชื้อโดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชลงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3-6 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ Patil (1998) ขยายพันธุ์ *C. jainii*, *C. bulbosa* var. *bulbosa* และ *C. bulbosa* var. *lushii* ในสภาพปลอดเชื้อด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS พบว่าการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ส่วนการเติม Kn ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดหัวมากที่สุด Chandore และคณะ (2010) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ *C. fantastica* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการใช้ BA และ IBA ความเข้มข้น 1.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากมากที่สุด

Krishnareddy และ Pullaiah (2012) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของ *C. elegans* โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ Kn ความเข้มข้น 4.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดยอดได้มากที่สุด และการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด

Parihar (2017) ขยายพันธุ์ *C. bulbosa* ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA และ Kn พบว่าการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด จากรายงานข้างต้นเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน มีผลต่อการชักนำยอด ราก และหัวของพืชสกุลนี้

ดังนั้นการเพิ่มจำนวนพืชด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์หญาพันเกลียวเพื่อการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดและเก็บรักษาพันธุกรรม และเพื่อเพิ่มจำนวนให้เพียงพอต่อการศึกษาการใช้ประโยชน์จากพืชหายากและใกล้สูญพันธุ์ชนิดนี้ในอนาคตต่อไป อันจะนำไปสู่การ

อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากฐานทรัพยากรชีวภาพของพืชในประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับหญ้าพันเกลียว

หญ้าพันเกลียวที่รวบรวมจากธรรมชาตินำมาปลูกภายใต้สภาพควบคุม โดยให้แสงจากหลอด LED (light emitting diode) วันละ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส โดยใช้หินภูเขาไฟเพอร์ไลต์ และพีทมอส อัตราส่วน 1:1:1 เป็นวัสดุปลูก เมื่อพืชเจริญเติบโตสูงเหนือดินประมาณ 20 เซนติเมตร ตัดส่วนข้อมาล้างใต้น้ำไหล 1 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำสบู่อีกหนึ่งครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ตัดแต่งให้เหลือความยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร จุ่มลงในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 30 วินาที แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ และ sodium hypochlorite ($NaOCl$) โดย $NaOCl$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เตรียมจากสารฟอกขาวทางการค้า (Clorox®) ที่มีสารออกฤทธิ์เป็น $NaOCl$ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยลำดับการฟอกฆ่าเชื้อ สารฟอกฆ่าเชื้อ และความเข้มข้นเป็นไปตามทรีตเมนต์ที่กำหนด ดังนี้

2.1.1 ทรีตเมนต์ที่ 1 $NaOCl$ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาที ตามด้วย $NaOCl$ ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 10 นาที

2.1.2 ทรีตเมนต์ที่ 2 $NaOCl$ ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาทีตามด้วย $NaOCl$ ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 10 นาที

2.1.3 ทรีตเมนต์ที่ 3 $NaOCl$ ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาที ตามด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 5 นาที

2.1.4 ทรีตเมนต์ที่ 4 $NaOCl$ ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาทีตามด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 5 นาที

หลังจากฟอกฆ่าเชื้อตามทรีตเมนต์แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เมื่อล้างชิ้นส่วนพืชครบทั้ง 4 ครั้ง ตัดแต่งส่วนที่ซ้าออก แล้วตัดให้มีส่วนของข้อและปล้องรวมกันความยาว 1-2 เซนติเมตร ปักชิ้นส่วนพืชที่ตัดแต่งแล้วลงในขวดอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ PPM™ (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, Inc.) 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 5.8 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 5 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้นส่วนพืช บันทึกผลการปนเปื้อนและการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืช เป็นเวลา 5 สัปดาห์

2.2 อิทธิพลของ BA และ Kn ต่อการเพิ่มปริมาณยอด

นำชิ้นส่วนข้อของหญ้าพันเกลียวที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์และ PPM™ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร pH 5.8 โดยเติม BA และ Kn ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 11 ทรีตเมนต์ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วนพืช บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด การเกิดหัว และบันทึกภาพ

2.3 อิทธิพลของ NAA และ IBA ต่อการชักนำให้เกิดราก

นำยอดหญ้าพันเกลียวที่ได้จากการชักนำยอดย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อลดอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช แล้วนำยอดที่มีความยาว 4-5 เซนติเมตรที่มีใบ 2-3 คู่ใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ PPM™ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร pH 5.8 โดยเติม NAA

และ IBA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 11 ทรีตเมนต์ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วนพืช บันทึกจำนวนรากต่อยอด ความยาวราก การเกิดแคลลัส และบันทึกภาพโดยนำขวดเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชไปวางในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence lamp) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 33.78 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดความยาวของยอดและรากด้วยโปรแกรม ImageJ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การฟอกฆ่าเชื้อหน่อยัพนเกลียว

การศึกษาวีธีฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับขยายพันธุ์หน่อยัพนเกลียวในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยทรีตเมนต์ที่ 2 NaOCl ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาทีตามด้วย

NaOCl ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 10 นาที และทรีตเมนต์ที่ 3 NaOCl ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาทีตามด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 5 นาที มีอัตราการปนเปื้อนมากที่สุด โดยไม่มีชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิต ส่วนทรีตเมนต์ที่ 4 NaOCl ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) 10 นาทีตามด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 5 นาที มีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์ รอดชีวิตโดยไม่ปนเปื้อนมากที่สุด 26.66 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (ตารางที่ 1) การใช้ชิ้นส่วนยอดและข้อในการฟอกฆ่าเชื้อทำให้พืชมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ แต่ยังมีข้อเสีย คือ ทำความสะอาดได้ยาก (สิริภัทร์, 2558) ประกอบกับตัวอย่างหน่อยัพนเกลียวที่ใช้ในการทดลองเป็นพืชที่มาจากธรรมชาติโดยตรง จึงยังคงพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (วารภรณ์, 2551)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าการใช้ NaOCl ร่วมกับ $HgCl_2$ มีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อข้อของหน่อยัพนเกลียวได้ดีกว่าการใช้ NaOCl เพียงอย่างเดียว แม้

ตารางที่ 1 การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) และปนเปื้อนของหน่อยัพนเกลียวจากการฆ่าเชื้อด้วย NaOCl และ NaOCl ร่วมกับ $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	ฟอกครั้งที่ 1	ฟอกครั้งที่ 2	อัตราปนเปื้อน จุลินทรีย์(%)	อัตราการรอดชีวิต (%)
1	NaOCl 0.9 % (10 min)	NaOCl 0.6 % (10 m.)	73.33 $\pm$ 0.46 ^b	6.67 $\pm$ 0.26 ^{ab}
2	NaOCl 0.6 % (10 min)	NaOCl 0.3 % (10 m.)	100 ^a	0 ^b
3	NaOCl 0.3 % (10 min)	$HgCl_2$ 0.1 % (5 m.)	100 ^a	0 ^b
4	NaOCl 0.3 % (10 min)	$HgCl_2$ 0.2 % (5 m.)	40 $\pm$ 0.51 ^b	26.67 $\pm$ 0.46 ^a
F-test			**	ns

ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test; ** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์; ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

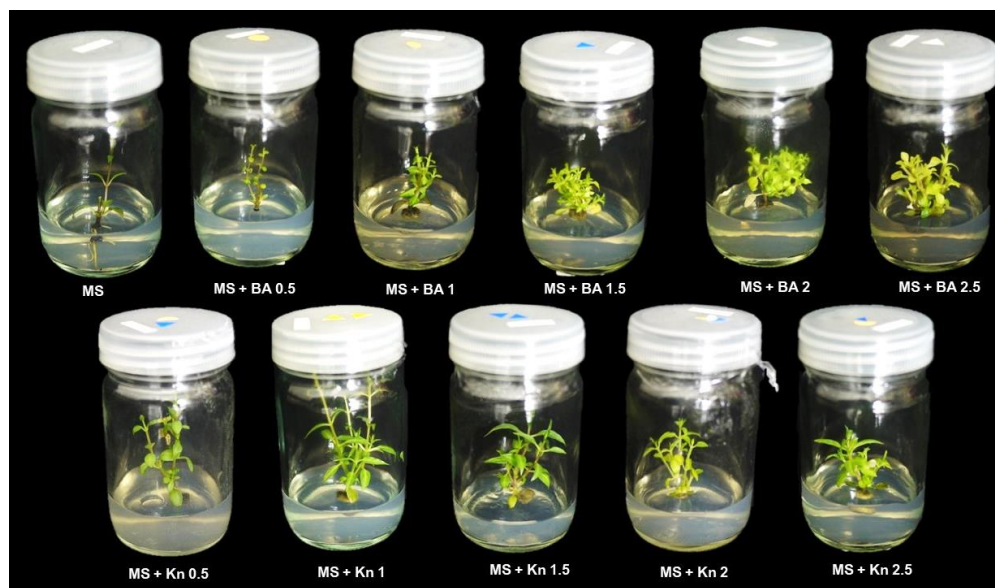
ว่า NaOCl เป็นสารฟอกฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันมากที่สุด แต่ในพืชที่มีการปนเปื้อนสูง เช่น ไม้เท้า หรือพืชที่มีหัวหรือเหง้าใต้ดินนิยมใช้ $HgCl_2$ ในการฟอกฆ่าเชื้อ (ปราณี และสมพิศ, 2539) สอดคล้องกับการศึกษาของ Dhir และ Shekhawat (2013, 2014b) ซึ่งพบว่าการใช้ NaOCl ร่วมกับ $HgCl_2$ มีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อใน *C. bulbosa*

3.2 ผลของ BA และ Kn ต่อการเพิ่มปริมาณยอด

ชิ้นส่วนข้อของหน่uating แก้วเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA และ Kn ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชทั้ง 2 ชนิด สามารถชักนำให้หน่uating แก้วมีปริมาณยอดเพิ่มขึ้น และชักนำให้เกิดหัวได้ในสภาพปลอดเชื้อ (รูปที่ 1) โดยสอดคล้องกับรายงานของ Patil (1998), Pandit และคณะ (2008) และ Kondamudi และ Murthy (2011) ที่ชักนำ *C. pusilla* ให้เกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อด้วย

อาหารสังเคราะห์ที่เติม BA หรือ BA ร่วมกับ Kn

การศึกษานี้พบว่า BA และ Kn สามารถชักนำให้หน่uating แก้วเกิดยอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งเกิดยอดมากที่สุด ในอาหารสังเคราะห์ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (15.80 ยอด) สอดคล้องกับรายงานของ Patil (1998) และ Parihar (2017) ซึ่งพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้เกิดยอดสูงสุดใน *C. bulbosa* รองลงมา คือ การเติม Kn และ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดยอดเฉลี่ย 8.33 และ 8.20 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อนำยอดที่ได้มาวัดความยาวพบว่าอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (ชุดควบคุม) มีความยาวยอดมากที่สุด 24.49 เซนติเมตร รองลงมา คือ การเติม Kn ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ย 23.27 และ 22.76 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) โดยเห็นได้ว่าการเติมไซโทไคนินความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้ความยาวยอดสั้นกว่าชุด



รูปที่ 1 ชิ้นส่วนข้อของหน่uating แก้วที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA และ Kn ความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ควบคุม สอดคล้องกับรายงานของ Chavan และคณะ (2011) ซึ่งพบว่า BA ชักนำให้ *C. spiralis* เกิดยอดได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Kn ซึ่งการเติม BA ความเข้มข้นต่ำชักนำให้เกิดยอดน้อยกว่า แต่ยอดที่ได้สมบูรณ์และเจริญเติบโตได้ดีกว่ายอดที่ถูกชักนำด้วย BA ความเข้มข้นสูง โดยทั่วไปสารในกลุ่มไซโทไคนินช่วยในการแบ่งและขยายขนาดของเซลล์พืช แต่การที่พืชได้รับไซโทไคนินในปริมาณมากจะมีผลยับยั้งการยืดยาวของเซลล์ได้ ทั้งนี้สารที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ BA และ Kn จัดเป็นสารสังเคราะห์ที่ละลายตัวได้ช้าและมีความเป็นพิษ เมื่อพืชได้รับในปริมาณมากจึงทำให้พืชเกิดความผิดปกติ (พีรเดช, 2529; พชรียา, 2560)

การเติม BA และ Kn สามารถชักนำให้หน่อยอดกล้วยเกิดหัว โดยอาหารสังเคราะห์ที่เติม Kn 2.5

มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหัวสูงที่สุด (87 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดหัว 80 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับ Patil (1998) ที่รายงานว่าอาหารสังเคราะห์ที่เติม Kn และ BA สามารถชักนำให้ *C.jainii* และ *C. bulbosa* var. *lushii* เกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อมากที่สุด

3.3 ผลของ IBA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดราก

เมื่อนำยอดหน่อยอดกล้วยที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าทั้ง IBA และ NAA นอกจากสามารถชักนำให้ยอด

ตารางที่ 2 ผลของ BA และ Kn ต่อการเกิดยอดและหัวของหน่อยอดกล้วยที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (mg/L)	จำนวนยอดเฉลี่ย	ความยาวยอดเฉลี่ย (mm)	การเกิดหัว (%)
ไม่เติม	1.40 ^d	24.49 ^a	0 ^d
BA 0.5	3.47 ^{bcd}	14.90 ^{bc}	20 ^{cd}
BA 1.0	7.40 ^{bc}	12.18 ^c	40 ^{abcd}
BA 1.5	6.60 ^{bcd}	11.30 ^c	47 ^{abcd}
BA 2.0	15.80 ^a	11.08 ^c	67 ^{abc}
BA 2.5	8.20 ^{bc}	11.90 ^c	73 ^{ab}
Kn 0.5	2.73 ^{cd}	23.27 ^a	33 ^{bcd}
Kn 1.0	4.60 ^{bcd}	22.76 ^a	80 ^{ab}
Kn 1.5	4.67 ^{bcd}	17.12 ^b	67 ^{abc}
Kn 2.0	5.33 ^{bcd}	17.19 ^b	40 ^{abcd}
Kn 2.5	8.33 ^b	14.10 ^{bc}	87 ^a
F-test	**	**	**

ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test; ** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

หญ้าพันธุ์เกลียวเกิดรากแล้ว ยังกระตุ้นให้เกิดยอดและแคลลัสได้ (รูปที่ 2) การเติม IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.60 ราก รองลงมา คือ อาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช มีจำนวนรากเฉลี่ย 2.73 ราก ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับ Nikam และคณะ (2008) ที่พบว่าการเติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสังเคราะห์สามารถชักนำให้ *C. maccannii* เกิดราก

มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติม IBA และ NAA ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าการเติม IBA สามารถชักนำให้เกิดรากในหญ้าพันธุ์เกลียวมากกว่า สอดคล้องกับ Muthukrisnan และคณะ (2013) และ Kalimuthu และ Prabakaran (2013) รายงานว่าการเพาะเลี้ยง *C. thwaitesii* และ *C. pusilla* ในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IBA มีประสิทธิภาพในการชักนำรากได้มากกว่า NAA



รูปที่ 2 ชิ้นส่วนยอดของหญ้าพันธุ์เกลียวที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลการทดลองพบว่าออกซินที่ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นให้เกิดจำนวนรากได้มากกว่าที่ความเข้มข้นสูง เมื่อพิจารณาความยาวรากพบว่าความยาวรากในทุกทรีตเมนต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากมากที่สุด (6.61 เซนติเมตร) รองลงมา คือ อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และอาหารที่เติม IBA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ใน

การศึกษามีตายอดซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างออกซิน ทำให้พืชมีสัดส่วนของออกซินในปริมาณที่มากกว่าไซโทไคนิน จึงส่งเสริมให้เกิดรากได้ แม้ในอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (พีเรเดช, 2529) การเติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้นต่ำมีความยาวรากมากกว่าสูตรอาหารที่เติม IBA หรือ NAA ความเข้มข้นสูง เนื่องจากออกซินในปริมาณที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดจุดกำเนิดราก แต่ถ้าความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญ

เติบโตของรากแทน (พัชรียา, 2560)

สารกลุ่มออกซินนอกจากจะสามารถชักนำรากแล้วยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของตาข้างอีกด้วย (นพดล, 2537) ตารางที่ 3 พบว่าการเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับอาหารสังเคราะห์ชุดควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Reddy และคณะ (2015) และ Subbaiyan และ Thangapandian (2017) ที่พบว่าการเติม NAA ในอาหารสังเคราะห์สามารถชักนำยอดใน *C. ensifolia* และ *C. bulbosa* นอกจากนั้นพบว่าอาหาร

ที่เติม NAA และ IBA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส โดยพบว่าอัตราการเกิดแคลลัสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IBA ทุกความเข้มข้น แคลลัสมีขนาดใหญ่กว่า

ผลการทดลองพบว่าอาหารที่เติม IBA 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดแคลลัสถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ NAA 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับรายงานของ Dhir และ Shekhawat (2014) ซึ่งรายงานว่า การเติม NAA ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0

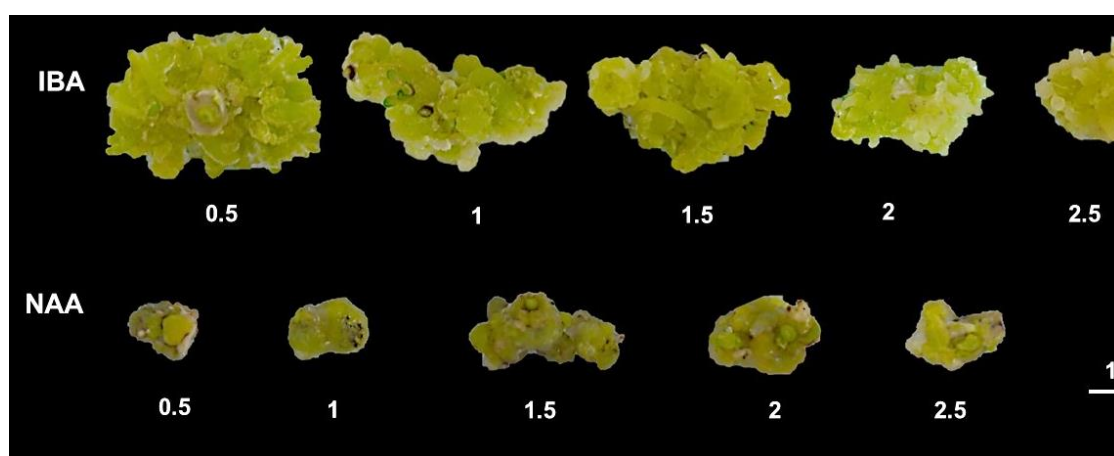
ตารางที่ 3 ผลของ IBA และ NAA ต่อการเกิดราก ยอด และแคลลัสของหนุ้าพันธุ์กล้วยที่ขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุม การเจริญเติบโตพืช (mg/L)	จำนวนราก เฉลี่ย	ความยาว รากเฉลี่ย	จำนวนยอด เฉลี่ย	อัตราการเกิด แคลลัส (%)	ขนาด แคลลัส	ลักษณะ แคลลัส
ไม่เติม	2.73 ^{ab}	6.01	4.80 ^{ab}	0 ^d	0 ^c	-
IBA 0.5	3.60 ^a	3.16	1.20 ^d	100 ^a	333.61 ^a	F, YG
IBA 1.0	1.93 ^{ab}	4.21	1.13 ^d	100 ^a	308.12 ^{ab}	F, YG
IBA 1.5	0.47 ^b	4.47	1.40 ^d	100 ^a	260.94 ^{ab}	F, YG
IBA 2.0	0.40 ^b	4.50	1.13 ^d	100 ^a	237.37 ^{ab}	F, YG
IBA 2.5	0.20 ^b	5.63	1.13 ^d	100 ^a	207.72 ^b	F, YG
NAA 0.5	2.47 ^{ab}	3.76	3.47 ^c	40 ^c	45.70 ^c	C, PG
NAA 1.0	1.80 ^{ab}	4.63	5.27 ^a	66.67 ^b	88.53 ^c	C, PG
NAA 1.5	1.70 ^{ab}	6.61	4.07 ^{bc}	100 ^a	96.95 ^c	C, PG
NAA 2.0	0.40 ^b	3.92	3.80 ^c	93.33 ^a	89.67 ^c	C, PG
NAA 2.5	0.27 ^b	3.39	3.53 ^c	86.67 ^{ab}	71.63 ^c	C, PG
F-test	**	ns	**	**	**	

ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test; ** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์; ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ; C = compact callus (แคลลัสที่กลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น); F = friable callus (แคลลัสที่กลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ); YG = สีเขียวปนเหลือง; PG = สีเขียวปนเหลืองเข้ม

มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้ *C. bulbosa* เกิดแคลลัส น้อย แต่เมื่อได้รับ NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่า และเกิดแคลลัสน้อยลงที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำแคลลัสมาวัดขนาดพบว่าการเติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 333.61 ตารางมิลลิเมตร รองลงมา คือ IBA 1, 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขนาดแคลลัส 308.12 และ 260.94 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แคลลัสที่ตอบ

สนองต่อ IBA เป็นแคลลัสที่เกาะกันหลวม ๆ มีสีเขียวปนเหลือง ส่วนแคลลัสที่ตอบสนองต่อ NAA เป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่น และมีสีเขียวปนเหลืองคล้ำ (รูปที่ 3) Muthukrishnan และคณะ (2015) เติม 2,4-D ในอาหารสังเคราะห์ร่วมกับ IBA และ NAA พบว่าสามารถชักนำให้ *C. thwaitesii* เกิดแคลลัส โดยในอาหารที่มี IBA ลักษณะแคลลัสเกาะกันแบบหลวม ๆ มีสีขาว ส่วนอาหารที่มี NAA แคลลัสเกาะกันแน่น สีน้ำตาล



รูปที่ 3 ลักษณะแคลลัสของหน่up้านกล้วยที่ตอบสนองต่ออาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

4. สรุป

การขยายพันธุ์หน่up้านกล้วยในสภาพปลอดเชื้อด้วยชิ้นส่วนข้อโดยฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที ตามด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที มีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุด และมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด การเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเกิดยอดมากที่สุด การเติม Kn ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อ การเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดรากได้ดีที่สุด นอกจากนี้อาหารสูตรที่เติม IBA ทุก

ความเข้มข้น และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำการกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย แผนงานเสริมสร้างศักยภาพ และพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางการยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2562 และขอขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่อนุญาตให้

ดำเนินการศึกษาวิจัยในพื้นที่ป่าอนุรักษ์

6. รายการอ้างอิง

ปราณี นน่อเพ็ชร และสมพิศ นิชลานนท์, 2539, เอกสารการสอนชุดวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช และการขยายพันธุ์พืช (Crop Improvement and Plant Propagation), สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาราช, นนทบุรี.

พัชรียา บุญก่อแก้ว, 2560, สารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชสวน, บริษัท สหมิตรพรินต์ติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

พีรเดช ทองอำไพ, 2529, ฮอว์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, หจก. ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

รังษฤษดิ์ กาวิตะ, 2540, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วรตลต์ แจ่มจำรูญ, นันทวรรณ สุปันตี, นัยนา เทศนา, มานพ ผู้พัฒน์, โสมนัสสา แสงฤทธิ์ และสุจิต เรืองเรือ, 2558, พืชที่ถูกคุกคามในป่าภูววิ-ภูลังกา, สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.

วรารณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร : แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, บริษัท ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น.

สิริภัทร พรหมณีย์, 2558, เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายและปรับปรุงพันธุ์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Baker, K., Lambdon, P., Jones, E., Pellicer, J., Stroud, S., Renshaw, O., Niissalo, M., Corcoran, Clubbe, C. and Sarasan, V.,

2014, Rescue, ecology and conservation of a rediscovered island endemic fern (*Anogramma ascensionis*): *Ex situ* methodologies and a road map for species reintroduction and habitat restoration, Bot. J. Linn. Soc. 174: 461-477.

Beena, M.R., Martin, K.P., Kirti, P.B. and Hariharan, M., 2003, Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*, PCTOC 72: 285-289.

Boonjaras, T. and Thaithong, O., 2003, *Ceropegia hirsuta* (Asclepiadaceae), a new record for Thailand, Thai For. Bull. 31: 1-6.

Chandore, A.N., Nimbalkar, M.S., Gurav, R.V., Bapat, V.A. and Yadav, S.R., 2010, A Protocol for Multiplication and Restoration of *Ceropegia fantastica* Sedgw.: A Critically Endangered Plant Species, Curr. Sci. 11: 1593-1596.

Chavan, J.J., Nimbalkar, M., Gaikwad, N. and Yadav, S., 2011, *In vitro* propagation of *Ceropegia spiralis* Wight – An endemic and rare potential ornamental plant of peninsular India, Proc. Nat. Acad. Sci., India. Sec. B Biol. Sci. 81: 120-126.

Chavan, J., Gaikwad, N.B. and Yadav, S.R., 2013, High multiplication frequency and genetic stability analysis of *Ceropegia panchganiensis*, a threatened ornamental plant of Western Ghats: Conservation implications, Sci. Hort. 161: 134-142.

Chavan, J., Nalawade, A.S., Gaikwad, N.B., Gurav, R.V., Dixit, G.B. and Yadav, S.R.,

- 2014, An Efficient *in vitro* regeneration of *Ceropegia noorjahaniae*: An endemic and critically endangered medicinal herb of the Western Ghats, *Physiol. Mol. Biol. Plants* 20: 405-410.
- Dhir, R. and Shekhawat, G.S., 2013, Production, storability and morphogenic response of alginate encapsulated axillary meristems and genetic fidelity evaluation of *in vitro* regenerated *Ceropegia bulbosa*: A pharmaceutically important threatened plant species, *Ind. Crops Prod.* 47: 139-144.
- Dhir, R. and Shekhawat, G.S., 2014a, *In vitro* propagation using transverse thin cell layer culture and homogeneity assessment in *Ceropegia bulbosa* Roxb., *J. Plant Growth Regul.* 33: 820-830.
- Dhir, R. and Shekhawat, G.S., 2014b, Eco rehabilitation and biochemical studies of *Ceropegia bulbosa* Roxb.: A threatened medicinal succulent, *Acta Physiol. Plant* 36: 1335-1343.
- Kalimuthu, K. and Prabakaran, R., 2013, Micropropagation of *Ceropegia pusilla* – Medicinally important plant, *J. Trop. Med.* 14: 37-42.
- Kidyoo, M., 2014a, *Ceropegia suddeeii* sp. nov. (Apocynaceae, Asclepiadoideae) from northeastern Thailand, *Nord. J. Bot.* 32: 569-574.
- Kidyoo, M., 2014b, Two new species of *Ceropegia* (Apocynaceae, Asclepiadoideae) from eastern Thailand, *Phytotaxa* 162(2): 091-098.
- Kidyoo, M., 2015a, *Ceropegia tribounii* (Apocynaceae, Asclepiadoideae), a new species from western Thailand, *Phytotaxa* 205(1): 059-064.
- Kidyoo, M., 2015b, *Ceropegia cochleata* sp. nov. (Apocynaceae, Asclepiadoideae) from Thailand, *Nord. J. Bot.* 33: 668-672.
- Kidyoo, M. and Paliyavuth, C., 2017a, *Ceropegia digitiformis* sp. nov. (Apocynaceae, Asclepiadoideae) from northeastern Thailand, *Taiwania* 62: 24-28.
- Kidyoo, M. and Paliyavuth, C., 2017b, *Ceropegia thaithongiae* sp. nov. (Apocynaceae, Asclepiadoideae) from northern Thailand and preliminary observations on impacts of climate change on its only known population, *Nord. J. Bot.* 35: 281-288.
- Kidyoo, M., 2018a, *Ceropegia foetidiflora* sp. nov. (Asclepiadoideae, Apocynaceae), a new species from northeastern Thailand, *Taiwania* 63: 327-332.
- Kidyoo, M., 2018b, A new species of *Ceropegia* (Asclepiadoideae, Apocynaceae) from eastern Thailand, *Phytotaxa* 385(1): 031-036.
- Krishnareddy, P.V. and Pullaiah, T., 2012, *In vitro* conservation of *Ceropegia elegans*, an endemic plant of South India, *Afr. J. Biotechnol.* 11: 12443-12449.
- Kondamudi, R. and Murthy, K.S.R., 2011, Micropropagation and *in vitro* flowering of *Ceropegia pusilla*, *J. Trop. Med.* 12: 41-47.
- Kondamudi, R., Vijayalakshmi, V. and Murthy, K.S.R., 2010, Induction of orphogenetic

- callus and multiple shoot egeneration in *Ceropegia pusilla* Wight and Arn., Biotechnol. J. 9: 141-148.
- Meve, U., 2009, *Ceropegia thailandica* (Asclepiadoideae-Ceropegieae), a spectacular new Thai species, Bradleya 27: 161-164.
- Muthukrishnan, S., Benjamin, J.H.F., Sathishkannan, G., Kumar, T.S. and Rao, M.V., 2013, *In vitro* propagation of genus *Ceropegia* and retrosynthesis of cerpegin – A review, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 22: 315-330.
- Muthukrishnan, S., Kumar, T.S. and Rao, M.V., 2015, An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia thwaitesii*: An endemic species from Western Ghats, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 30: 202-211.
- Nikam, T.D., Patil, J.G., Ahire, M.L., Ghane, S.G., Nithaware, K.M. and Naikaw, V.R., 2012, Axillary multiplication of *Ceropegia mahabalei* Hemadri & Ansari and *Ceropegia media* (Huber) Ansari: Critically endangered ethnomedicinal herbs of western ghats, maharashtra state of India, Int. J. Dev. Biol. 6: 27-33.
- Nikam, T.D., Savant, R.S. and Pagare, R.S., 2008, Micropropagation of *Ceropegia hirsute* Wt. & Arn.: A starchy tuberous asclepid, Indian J. Biotechnol. 7: 129-132.
- Pandit, S.S., Nair, A., Naik, D.D., 2008, Towards conservation of threatened *Ceropegia* species endemic to a biodiversity hotspot: *In vitro* microtuber production and proliferation, a novel strategy, J. For. Sci. 24(2): 79-88.
- Parihar, S., 2017, *In vitro* conservation protocol of *Ceropegia bulbosa*: An important medicinal and threatened plant species of Western Rajasthan, Plant Sci. Today 4: 21-26.
- Patil, M.V., 1998, Micropropagation Studies in *Ceropegia* spp., *In Vitro* Cell. Dev. Biol., Plant 34: 240-24.
- Phulwaria, M., Shekhawat, N.S., Rathore, J.S. and Singh, R.P., 2013, An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb. – A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert, Ind. Crops Prod. 42: 25-29.
- Reddy, C., Bramhachari, P.V. and Murthy, K.S.R., 2015, Optimized plant tissue culture protocol for *in vitro* morphogenesis of an endangered medicinal herb *Ceropegia ensifolia* Bedd., Trop. Subtrop. Agroecosystems 18: 95-101.
- Silva, da T.A.J., 2015, The *in vitro* culture of *Ceropegia* species, important medicinal and ornamental plants: A review, EEB 13: 1-11.
- Subbaiyan, B. and Thangapandian, V., 2017, Plant regeneration from cotyledon and leaf explants of *Ceropegia bulbosa* Roxb., an endangered medicinal plant, Bot. Pac. 6(2): 35-42.
- Thaithong, O., Kidyoo, A. and Kidyoo, M., 2018, Handbook of Asclepiads of Thailand, Amarín Printing and Publishing Public Company Ltd., Bangkok.