เอกสารอ้างอิง

ณพพร ดำรงศิริ. 2542. **พฤกษอนุกรมวิธาน.** มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร.

ปราณี ปาลี และวิไลวรรณ อนุสารสุนทร. 2549ก. **พืชวงศ์ชาฤษีกับศักยภาพในการพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับ.** ในรายงานการประชุมวิชาการโครงการ BRT ครั้งที่ 10, 8-11 ตุลาคม 2549 จังหวัดกระบี่ หน้า 124-131.

ปราณี ปาลี และวิไลวรรณ อนุสารสุนทร. 2549ข. **ดอกไม้เพื่ออนาคต"จากป่าสู่เรือนเพาะชำ เพื่อความสวยงามอย่างยั่งยืน". วันที่** 17-18 พฤษภาคม 2549 หนังสือพิมพ์เชียงใหม่นิวส์ จังหวัดเชียงใหม่

อัจฉรา ธรรมถาวร. 2540. **พฤกษานุกรมวิธาน ตอนพืชใบเลี้ยงคู่.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น.

Barnett, E.C. 1962. Gesneriaceae. Florae Siamensis Enumeratio. Siam Society, Bangkok 3(3):196-238.

Bilkey, P.C. and Cocking, E.C. (1981) Increased plant vigor by in vitro propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. from sub-epidermal tissue. HortSci. 16:643–644

Burtt, B.L. 2000. *Kaisupeea* a new genus of Gesneriaceae in Thailand. Nordic J. Bot. 21(2):115-119.

Burtt, B.L. 2001. Flora of Thailand: annotated checklist of Gesneriaceae. Thai Forest Bull. 29:81-109.

Cassells, A. C. and Plunkett, A. 1984. Production and growth analysis of plants from leaf cuttings, and from tissue cultures of disks from mature leaves and young axenic leaves of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Scientia Hortic. 23 (4):361-369.

Cassells, A. C., Plunkett, A. and Kelleher, D. 1986. Screening of *Saintpaulia ionantha* Wendl. cultivars for caulogenetic potential based on the in vitro responses of young axenic leaves on auxin and cytokinin factorial media. Scientia Hortic. 30(1-2):151-157.

Chayamarit, K. 1996. Progression of the Flora of Thailand Project. A symposium on plant resources of the Himalayan Foothills. Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai, Thailand.

Chaudhury, A., Power, J.B. and Davey, M.R. 2010. High frequency direct plant regeneration from leaf and petals of cape primrose (*Streptocarpus*). Journal of Crop Science Biotechnology 13 (2): 107 –112.

Cooke, R. C. 1977. Tissue culture propagation of African Violet. HortSci. 12(6):549.

de Almeida, V.P. and Shepherd, S.L.K. 1999. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): in vitro cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. Revta brasil. Bot., São Paulo, 22(3):381-384

Cui, J., Chen, J. and Henry, R.J. 2009. Regeneration of *Aeschynanthus radicans* via direct somatic embryogenesis and analysis of regenerants with flow cytometry. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 45: 34–43

Faride, U., Peter, K. and Andrew, R. 2007. Organogenesis plant regeneration from leaf explants of *Exacum* Styer Group. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 89: 105–111.

Jain, S.M. 1993. Somaclonal variation in *Begonia* x elatior and *Saintpaulia ionantha* L. Scientia Hortic. 54(3):221-231.

Kanchanapoom, K. and Wuttisit, M. 1996. Tissue culture propagation of gloxinia. Suranaree J. Sci.Technol. 3(2): 63-67.

Kanchanapoom, K. and Wuttisit, M. 1996. Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Gloxinia. ISSAAS, 2(1-2):1-12.

Molgaard, J. P., Roulund, N., Deichmann, V., Irgens-Moller, L., Andersen, S. B., and Farestveit, B. 1991. *In vitro* multiplication of *Saintpaulia ionantha* Wendl. by homogenization of tissue cultures. Scientia Hortic. 48(3-4):285-292.

Redway, F.A. 1991. Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of *Saintpaulia ionantha* Wendl, (African violet). Plant Sci. 73(2):243-251.

Start, N. D. and Cumming, B.G. 1976. In vitro propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. HortSci. 11:204-206.

Sunpui, W. and Kanchanapoom, K. 2002, Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured in vitro. Songklanakarin J. Sci. Technol. 24(3):357-364.

Wang, W., P. Kaiyu, L. Zhenyu, A.L. Weitzman and L.E. Skoog. 1998. Gesneriaceae. Flora of China 18:244-401.

Weber, A. 2004. "Gesneriaceae." in K. Kubitzki (ed), *The families and genera of vascular plants.* Vol. 7. Dicotyledons. Lamiales except Acanthaceae incl. pp. 63-158.

Zhao-ran, Xu and Burtt, B.L. 1991. Towards a revision of *Paraboea* (Gesneriaceae): I. Edinburgh J. Bot. 48(1):1-18.

Zhao-ran, Xu. 1994. A new species of *Paraboea* Ridley from Thailand. Acta Phytotaxon. Sin. 32(4):359-361.

ภาคผนวก

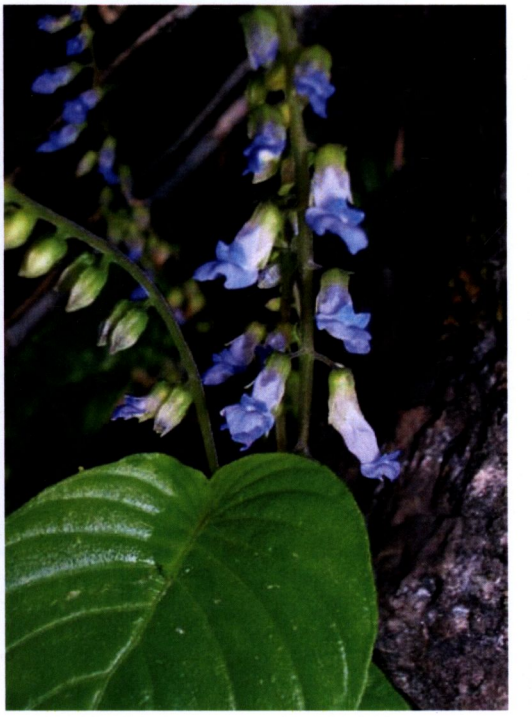
ภาคผนวก ก ภาพถ่ายพืชที่ใช้ศึกษาการงอกของเมล็ด

ชนิดที่ 1 *Chirita micromusa* B. L. Burtt

ชนิดที่ 2 *Didymocarpus biserratus* Barnett

ชนิดที่ 3 *Didymocarpus dongrakensis* B. L. Burtt

ชนิดที่ 4 *Didymocarpus kerrii* Craib

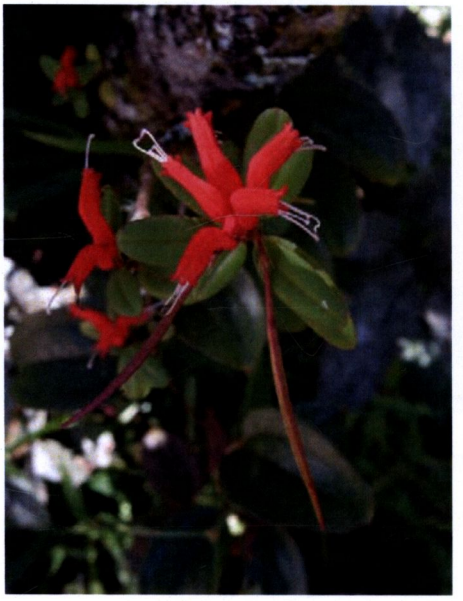


ชนิดที่ 5 *Rhynchoglossum obliquum* Blume

ชนิดที่ 6 *Ornithoboea arachnoidea* (Diels) Craib

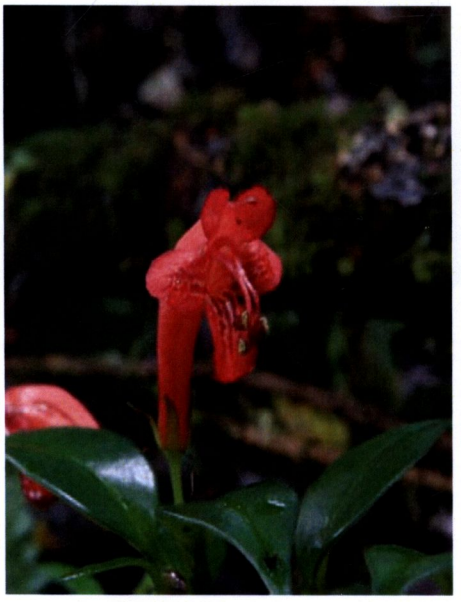
ชนิดที่ 7 *Ornithoboea flexuosa* (Ridl.) B. L. Burtt

ภาคผนวก ข ภาพถ่ายพืชที่ใช้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ชนิดที่ 1 *Aeschynanthus andersondii* Craib

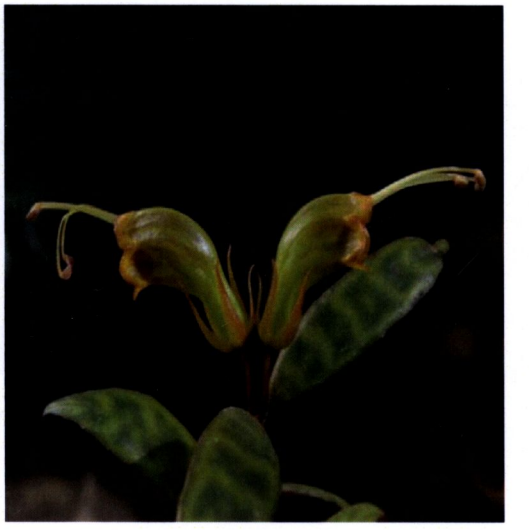
ชนิดที่ 2 *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br.



ชนิดที่ 3 *Aeschynanthus garrettii* Craib

ชนิดที่ 4 *Aeschynanthus hildrebrandii* Hemsl. ex Hook. f.

ชนิดที่ 5 *Aeschynanthus hosseuii* Pellegr.



ชนิดที่ 6 *Aeschynanthus longicaulis* Wall. ex R. Br.

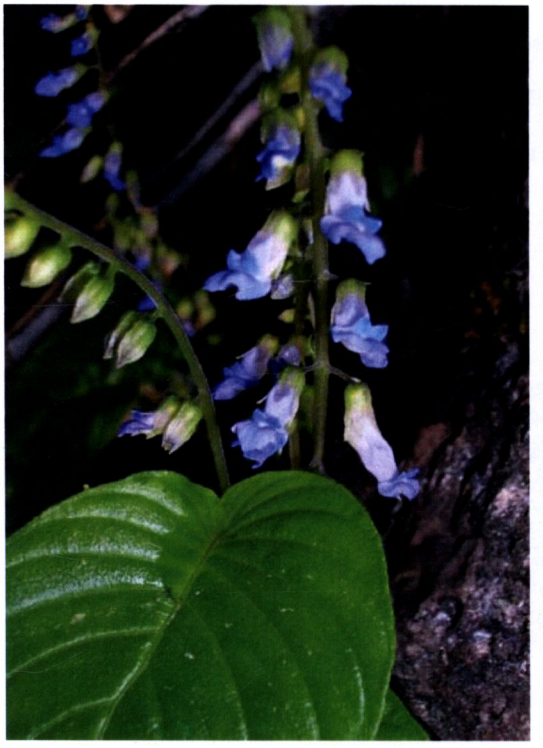
ชนิดที่ 7 *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.

ชนิดที่ 8 *Aeschynanthus permiisilis* Craib

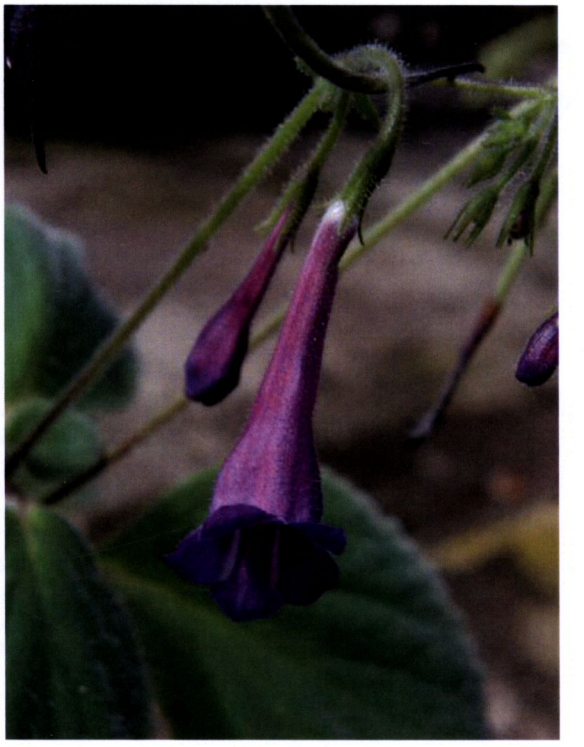
ชนิดที่ 9 *Aeschynanthus radicans* Jack

ชนิดที่ 10 *Aeschynanthus speciosus* Hook.

ชนิดที่ 11 *Chirita micromusa* B. L. Burtt



ชนิดที่ 12 *Rhynchoglossum obliquum* Blume



ชนิดที่ 13 *Streptocarpus orientalis* Craib

ชนิดที่ 14 *Epithema carnosum* Benth.

ภาคผนวก ค ตีพิมพ์เผยแพร่ผลการวิจัย เรื่องที่ 1

ปราณี นางงาม, พันธิตรา กมล และ อนุพันธ์ กงบังเกิด. 2554. **ผลของไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนใบ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. ในสภาพปลอดเชื้อ.** Proceeding การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 3 วันที่ 14-15 มีนาคม 2554 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

ผลของไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนใบ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. ในสภาพปลอดเชื้อ

ปราณี นางงาม, พันธิตรา กมล และอนุพันธ์ กงบังเกิด

Effect of cytokinin on morphological changes of *in vitro* leaf culture of *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br.

Pranee Nangngam, Puntitra Kamol and Anupan Kongbangkerd

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

*Corresponding author. E-mail : ppalee@hotmail.com

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. บนอาหารสูตร Murashige and Skoog, MS (1962) (1962) ที่เติม BA, Kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ นั้น สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่และตายอดใหม่ได้ 2 วิธีคือ direct organogenesis และ indirect organogenesis อย่างไรก็ตาม พบว่า อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่แบบ direct organogenesis (5.0 ยอดต่อชิ้นส่วน) และแบบ indirect organogenesis (55.8 ยอดต่อชิ้นส่วน) เฉลี่ยดีที่สุด

คำสำคัญ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br., ไซโตไคนิน, ออร์แกโนเจเนซิส

Abstract

In vitro leaf culture of *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. was conducted on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with various concentration of BA, Kinetin and TDZ at 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L for 8 weeks. The results showed that direct and indirect organogenesis could be observed in all cytokinin concentrations. However, the highest number of shoots derived from both direct (5.0 shoots per leaf explants) and indirect (55.8 shoots per leaf explants) organogenesis pathways was achieved on the medium with 0.1 mg/L TDZ.

Keyword: *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br., cytokinin, organogenesis

บทนำ

พืชวงศ์ชาฤาษี (Gesneriaceae) หรือวงศ์ African violet พบทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น จัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญ เช่น African violet, gloxinia เป็นต้น ในประเทศไทยพบประมาณ 26 สกุล 150 ชนิด (Burtt , 2001) บางชนิดมีศักยภาพที่จะนำมาปรับปรุงพันธุ์เป็นไม้ดอกไม้ประดับแทน African violet ของต่างประเทศ โดยเฉพาะสกุล *Aeschynanthus* หรือสกุลไก่แดง มีรูปร่างใบและดอกสวยงาม สามารถนำมาทำเป็นไม้กระถางแขวนประดับได้เป็นอย่างดี สำหรับ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. เป็นพืชสกุลไก่แดง ที่มีจุดเด่นที่ดอกมีสีแดงสด อายุการบานของดอกนาน และมีรูปทรงใบสวยงาม แต่เนื่องจากในสภาพธรรมชาติมีการขยายพันธุ์ได้ช้า จึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและใช้ระยะเวลาสั้น จากรายงานการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์

พืชในวงศ์ชาฤาษี เช่น ชิ้นส่วนใบของต้นแอฟริกันไวโอเล็ต *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Start and Cumming, 1967; Hoshino *et al.*, 1995 และ Winkelmann and Grunewaldt, 1995) ชิ้นส่วนของใบและกลีบดอกของ Cape Primrose สกุล *Streptocarpus* (Chaudhury, Power and Davey, 2010) และ *Aeschynanthus radicans* 'Mona Lisa' ซึ่งสามารถใช้เป็นยาสมุนไพรได้ (Cui, Chen and Henry, 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. ยังคงไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน ดังนั้นจุดประสงค์ของการทดลองในครั้งนี้คือ หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน *A. fulgens* ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้เป็นจำนวนมาก

วิธีการทดลอง

นำใบจากต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (1962) ที่แปรผันชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนิน: BA, Kinetin (Kn) และ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ได้รับแสง ความเข้ม 2000 ลักซ์ 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตบันทึกผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองตัดชิ้นส่วนใบจากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมไซโตไคนิน 3 ชนิดคือ BA, Kn และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในสัปดาห์แรกของการทดลองไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์พบว่า บริเวณรอยตัดของใบที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA และ TDZ ทุกความเข้มข้น มีแคลลัสสีเขียวปนขาวเกิดขึ้น โดยเฉพาะอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสมีลักษณะแน่น สีขาว ในขณะที่ชิ้นส่วนใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่มี Kn ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก พบการโค้งงอของใบเล็กน้อย สัปดาห์ที่ 8 ในทุกสูตรอาหารที่เกิดแคลลัส มีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นตายอดและยอดใหม่ โดยอาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่และตายอดใหม่ได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่แบบ direct organogenesis เฉลี่ย 5.0±1.13 ยอดต่อชิ้นส่วน และแบบ indirect organogenesis เฉลี่ย 55.8±1.84 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 1, ภาพ 2 (ก-ค)) เมื่อความเข้มข้นมากขึ้น มีแนวโน้มสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดและจำนวนตายอดมากขึ้น ลักษณะยอดใหม่สีเขียวเข้ม ใบมีขนเล็กน้อย และพบอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydration) บ้างเล็กน้อย และสูตรอาหารที่เติม BA ทุกความเข้มข้น พบการเกิดยอดใหม่ได้ทั้ง 2 แบบ ลักษณะของยอดใหม่ที่ได้ลำต้นสีเขียว ใบสีเขียวเข้ม รากเกิดที่บริเวณข้อหรือชิ้นส่วนใบเริ่มต้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Chaudhury, Power and Davey (2010) ที่นำชิ้นส่วนใบและกลีบดอกของพืชสกุล *Streptocarpus* วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดี รวมไปถึงรายงานของ Faride, Peter and Andrew (2007) ที่เลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Exacum* Styer Group บนสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนใบ *A. fulgens* ในสภาพปลอดเชื้ออายุ 8 สัปดาห์

Hormones		จำนวนยอด		ความยาวยอด (cm)		จำนวนใบ	จำนวนราก	จำนวนตายอด	
cytokinin	mg/l	Direct**	Indirect	Direct	Indirect			Direct	Indirect
BA	0.1	1.43±0.68^{bcd}*	21.86±1.98^{b}	0.68±0.27^{abc}	1.08±0.03^{bc}	2.92±0.22^{ab}	10.57±1.44^{a}	+***	++
	0.5	0.50±0.50^{d}	9.33±2.42^{cd}	0.20±0.20^{bc}	0.90±0.18^{bcd}	2.78±0.67^{abc}	4.00±1.30^{c}	+++	+++
	1.0	0.67±0.49^{bcd}	15.00±4.1^{bc}	0.83±0.53^{ab}	1.52±0.30^{a}	2.42±0.19^{abcd}	6.83±2.44^{b}	+	++
	2.0	0.83±0.54^{bcd}	12.83±3.15^{bc}	0.20±0.13^{bc}	1.21±0.20^{ab}	3.10±0.32^{a}	3.33±1.23^{cd}	++	+++
Kn	0.1	2.83±0.70^{bc}	1.16±1.1^{de}	0.76±0.17^{ab}	0.11±0.11^{d}	2.74±0.30^{abc}	1.83±0.60^{cde}	+	-
	0.5	0.83±0.54^{bcd}	0.00±0^{d}	0.26±0.17^{bc}	0.00±0^{e}	1.06±0.66^{de}	0.17±0.17^{e}	+	-
	1.0	2.00±1.04^{bcd}	0.00±0^{d}	0.40±0.20^{abc}	0.00±0^{e}	1.32±0.64^{cde}	0.85±0.45^{de}	++	+
	2.0	3.00±1.15^{b}	0.00±0^{d}	0.59±0.21^{abc}	0.00±0^{e}	1.46±0.52^{bcd}	1.28±0.61^{cde}	++	+
TDZ	0.1	5.00±1.13^{a}	55.85±1.84^{a}	1.04±1.88^{a}	1.11±0.05^{bc}	2.02±0.16^{abcd}	0.71±0.28^{de}	+	+++
	0.5	0.00±0^{d}	7.43±2.31^{cde}	0.00±0^{d}	0.69±0.18^{cd}	1.68±0.52^{abcd}	0.42±0.30^{de}	+	+++
	1.0	0.00±0^{d}	12.17±7.0^{cd}	0.00±0^{d}	0.60±0.12^{cd}	1.94±0.51^{abcd}	0.83±0.30^{de}	+	+++
	2.0	0.00±0^{d}	6.33±2.27^{de}	0.00±0^{d}	0.71±0.16^{cd}	2.69±0.61^{abc}	0.83±0.47^{de}	+	+++
control		0.00±0^{d}	0.00±0^{d}	0.00±0^{d}	0.00±0^{e}	0.00±0^{e}	0.00±0^{e}	-	-

หมายเหตุ: * ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple range test

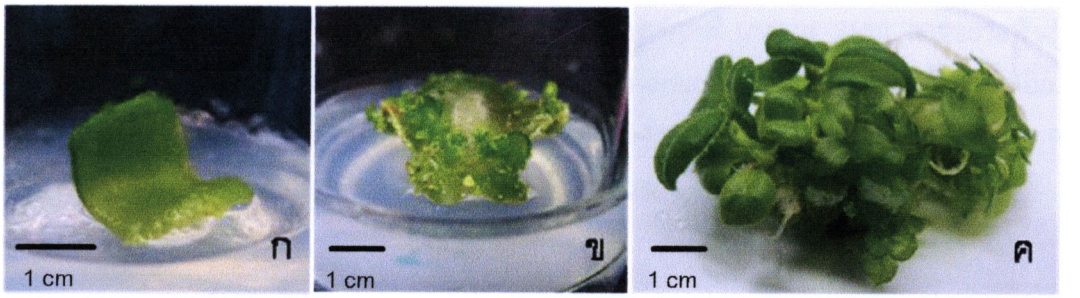
** Direct หมายถึง direct organogenesis

Indirect หมายถึง Indirect organogenesis

*** + หมายถึง จำนวนตายอดน้อยกว่า 10 ตายอดต่อชิ้นส่วน

++ หมายถึง จำนวนตายอดระหว่าง 10-20 ตายอดต่อชิ้นส่วน

+++ หมายถึง จำนวนตายอดมากกว่า 20 ตายอดต่อชิ้นส่วน



รูปที่ 1(ก-ค) การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนใบ *A. fulgens* อายุ 2 สัปดาห์ (1ก), อายุ 6 สัปดาห์ (1ข) และ 8 สัปดาห์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2553 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Burtt, B.L. 2001. Flora of Thailand: annotated checklist of Gesneriaceae. Thai Forest Bulletin 29: 81-109.

Chaudhury, A., Power, J.B. and Davey, M.R. 2010. High frequency direct plant regeneration from leaf and petals of cape primrose (*Streptocarpus*). Journal of Crop Science Biotechnology 13 (2): 107 –112.

Start, N. D. and Cumming, B.G. 1976. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. HortScience 11: 204-206.

Cui, J., Chen, J. and Henry, R.J. 2009. Regeneration of *Aeschynanthus radicans* via direct somatic embryogenesis and analysis of regenerants with flow cytometry. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 45: 34–43

Faride, U., Peter, K. and Andrew, R. 2007. Organogenesis plant regeneration from leaf explants of *Exacum* Styer Group. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 89: 105–111.

ภาคผนวก ง ตีพิมพ์เผยแพร่ผลการวิจัย เรื่องที่ 2

อ่อนรัตน์ อิ่นมะโน, จรัส ช่วยนะ, อนุพันธ์ กงบังเกิด และ ปราณี นางงาม. 2554. **การขยายพันธุ์ *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. (Gesneriaceae) ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** Proceeding การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

การขยายพันธุ์ *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. (Gesneriaceae) ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropopragation of *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. (Gesneriaceae)

อ่อนรัตน์ อิ่นมะโน[1] จรัส ช่วยนะ[2] อนุพันธ์ กงบังเกิด[1] และปราณี นางงาม[1]

Onrut Inmano[1], Charat Chauyna[2], Anuphan Kongbangkerd[1] and Pranee Nangngam[1]

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของ *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. เพื่อเพิ่มจำนวนต้นใหม่ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) ที่เติม TDZ 0.1 mg/l และสูตรที่เติม BA 0.5 mg/l เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ในปริมาณที่มากกว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l และนำต้นอ่อนที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน เพื่อให้ได้จำนวนต้นใหม่ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นก่อนย้ายลงปลูกในกระถางเพื่อเป็นไม้ประดับต่อไป

คำสำคัญ : *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.

ABSTRACT

In vitro leaf culture of *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. were cunducted on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with TDZ 0.1 mg/ l and BA 0.5 mg/l for 12 weeks. The results showed that the medium MS supplemented with TDZ 0.1 mg/l can induce new shoots more than the medium with BA 0.5 mg/l. New shoots regenerated from MS medium supplemented with TDZ 0.1 mg/l were transferred to culture on MS medium without hormone to multiply before growing for pot plant.

Key Words : *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.

E-mail : onrut_nu51411546@hotmail.com

คำนำ

พืชสกุลไก่แดง เป็นชื่อพืชพื้นเมืองของไทยที่อยู่ในสกุล *Aeschynanthus* อยู่ในวงศ์ Gesneriaceae ชื่อสามัญของวงศ์คือแอฟริกันไวโอเลต ส่วนประเทศไทยมักเรียกว่าวงศ์ชาฤาษี พืชสกุลไก่แดงนี้ทั่วโลกมีทั้งหมดประมาณ 160 ชนิด ในประเทศไทยพบประมาณ 20 ชนิด (Burtt, 2001 และ Middleton, 2007) พบทั่วไปในเขต

[1] หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
Plant Tissue Culture Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

[2] กลุ่มงานวนวัฒนวิจัย สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้
Research and Development Forest Division, Royal Forest Department, Jatujak, Bangkok 10900

ร้อนและเขตอบอุ่น มีทั้งเป็นพืชล้มลุกปีเดียวและหลายปี มีทั้งที่เป็นไม้พุ่มและเป็นไม้เถา เป็นไม้ใบเขียวตลอดปี ใบสีเขียวอวบเปราะและฉ่ำน้ำออกตรงข้ามกันเป็นคู่ แต่บางชนิดใบมีลายด่าง หลายชนิดขึ้นเกาะอาศัยอยู่บนกิ่งหรือลำต้นของต้นไม้ใหญ่ ส่วนมากลำต้นจะทอดยาวและทิ้งตัวลง บางชนิดเป็นไม้เลื้อย บางชนิดมีลำต้นสั้นแตกเป็นพุ่ม การออกดอก มีทั้งออกดอกที่ปลายยอดและตามข้อ ใน 1 ช่อมีหลายดอก ซึ่งดอกจะมีสีสันที่สวยงาม ไม่ว่าจะเป็นสีส้ม แดง เขียวและเหลือง ในปัจจุบันเกษตรกรและพ่อค้าได้นำพันธุ์ไก่แดงออกมาจากป่า เพื่อวางขายในท้องตลาด บางครั้งพบว่ามีการตัดกิ่งของต้นไม้ที่ไก่แดงเกาะอาศัยอยู่มาวางขายทั้งกิ่ง ซึ่งเสี่ยงต่อการสูญเสียพันธุกรรมของไก่แดงป่าเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากและใช้เวลาน้อยที่สุด เพื่อเป็นแนวทางป้องกันความเสี่ยงในการสูญพันธุ์ของไก่แดงป่า

ซึ่งก่อนหน้านี้มีนักวิจัยได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. โดย ปราณี และคณะ (2010) โดยนำใบจากต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีเติม TDZ 0.1 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่มากที่สุด ทั้งแบบ direct organogenesis (5.0 ยอดต่อชิ้นส่วน) และแบบ indirect organogenesis (55.8 ยอดต่อชิ้นส่วน) ส่วนการเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ชักนำให้เกิดยอดใหม่มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Cui *et al.* (2009) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Aeschynanthus radicans* Jack โดยใช้ชิ้นส่วนใบที่ปลายยอด เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 6.81 µM ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.68 µM พบว่าสามารถชักนำให้เกิด Somatic embryo ได้ดีที่สุด แต่ถ้าเป็นลำต้นจะเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 9.08 µM ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 µM และนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปปลูกลงกระถางในโรงเรือน เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน เก็บข้อมูลพบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 98% มีรูปร่างของใบที่แตกต่างกัน 5 แบบ แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ DNA โดยวิธี Flow cytometry พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของใบพืชสกุลไก่แดง ชนิด *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. ที่เป็นพืชป่าของประเทศไทย เพื่อเพิ่มชนิดของพืชประดับในตลาดให้แก่เกษตรกร และเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์พืชสกุลไก่แดงชนิดอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการเป็นไม้ประดับต่อไป ทั้งนี้ การเติมฮอร์โมนในสูตรอาหาร MS จะเลือกใช้ตามผลการศึกษาของ ปราณี และคณะ (2010) ที่ได้ผลดีที่สุดคือเติม TDZ 0.1 mg/l เปรียบเทียบกับการเติม BA 0.5 mg/l

ภาพที่ 1 *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. ดอก (ก), ใบอ่อนที่ได้การเลี้ยงในเรือนเพาะชำ (ข)

อุปกรณ์และวิธีการ

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบพืช

พืชสกุลไก่แดงชนิด *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng. ที่ได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร นำมาเพาะเลี้ยงในเรือนเพาะชำของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อให้ได้ใบอ่อน ตามภาพที่ 1 (ข) โดยทำการตัดใบตำแหน่งข้อที่สองจากปลายยอด นำมาทำความสะอาดโดยใช้น้ำยาล้างจาน 1-2 หยด ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปล้างโดยการปล่อยน้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายมาแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 1 นาที และทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการแช่ใบพืชลงใน Clorox 15% ที่ผสมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยด ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และ Clorox 5% ที่ผสมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยด ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยการจุ่มใบลงในน้ำกลั่น ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Chlorox ทำในตู้ปลอดเชื้อ

การศึกษาผลของฮอร์โมน TDZ 0.1 mg/l และ BA 0.5 mg/l ต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ของไก่แดงชนิด *Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.

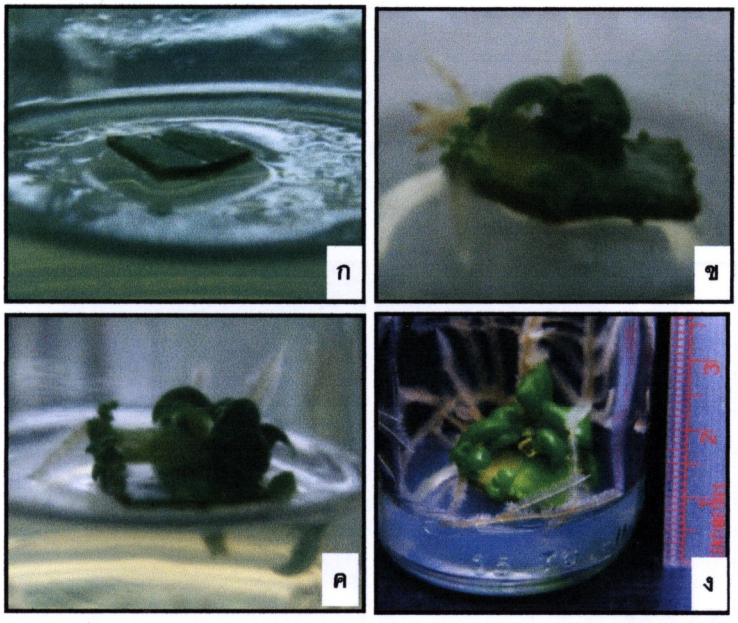
เมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ทำการตัดชิ้นส่วนพืช (ใบ) เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 เซนติเมตร และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l และอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l สังเกตการเกิดยอดใหม่และบันทึกผลทุกๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ หลังจากนั้น เมื่อทราบว่าฮอร์โมนชนิดใดชักนำให้เกิดยอดใหม่มากที่สุดแล้ว ทำการย้ายต้นอ่อนที่ได้เลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

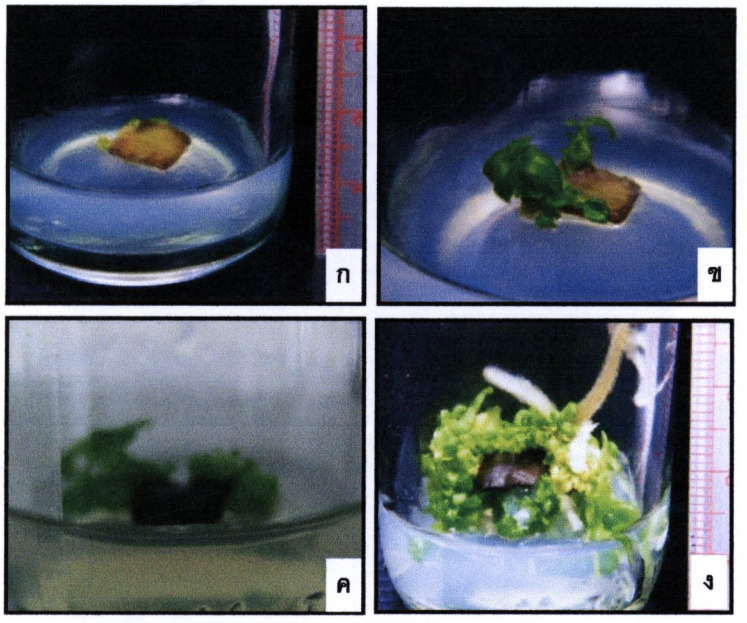
ผลการศึกษา พบว่าชิ้นส่วนใบเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l และ TDZ 0.1 mg/l เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้แตกต่างกัน โดยพบว่า สัปดาห์ที่ 4 อาหาร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดปุ่มเล็กๆ บริเวณขอบของรอยตัด และเกิดยอดใหม่จำนวนเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ชิ้นส่วนพืชมีการเกิดยอดใหม่และมีรากแขนงเพิ่มขึ้นจำนวนมาก ต้นอ่อนมีใบที่เห็นได้ชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 2 ก-ง) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 16.67% (ตารางที่ 1) ส่วนอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นปุ่มเล็กๆ บริเวณขอบของรอยตัดในสัปดาห์ที่ 1 เมื่อสัปดาห์ที่ 4 ชิ้นส่วนเจริญเป็นยอด ในสัปดาห์ที่ 8 ถึงสัปดาห์ที่ 12 ชิ้นส่วนมีการเจริญเป็นยอดใหม่และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 3 ก-ง) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นยอดใหม่ 26.67% (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ปริมาณที่มากกว่าอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l (ภาพ 4 ก-ข) จากนั้นนำยอดใหม่ที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l ย้ายเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน พบว่าต้นอ่อนมีจำนวนมากขึ้นและสามารถเจริญเติบโตได้ดี (ภาพที่ 5 ก-ง) ซึ่งจะนำต้นอ่อนนี้ไปศึกษาความเหมาะสมของวัสดุปลูกที่มีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญของไก่แดงต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบไก่แดง (*Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

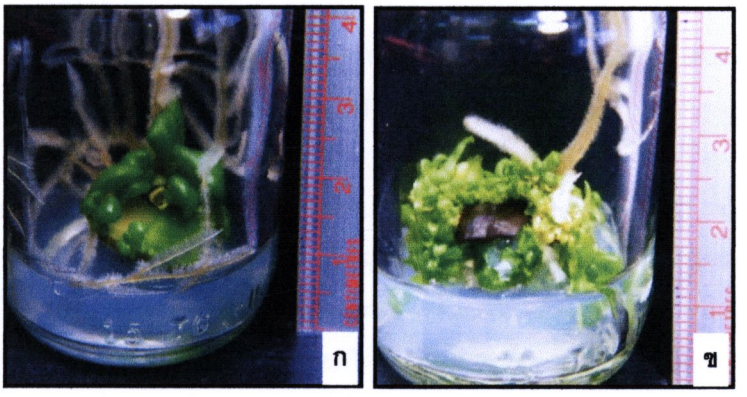
สูตรอาหาร	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอด		จำนวนใบเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย
		Direct organogenesis	Indirect organogenesis		
MS+BA 0.5 mg/l	16.67	2.0	4.4	7.4	2.8
MS+TDZ 0.1 mg/l	26.67	2.5	6.0	13.75	0.37
MS (control)	0	0	0	0	0



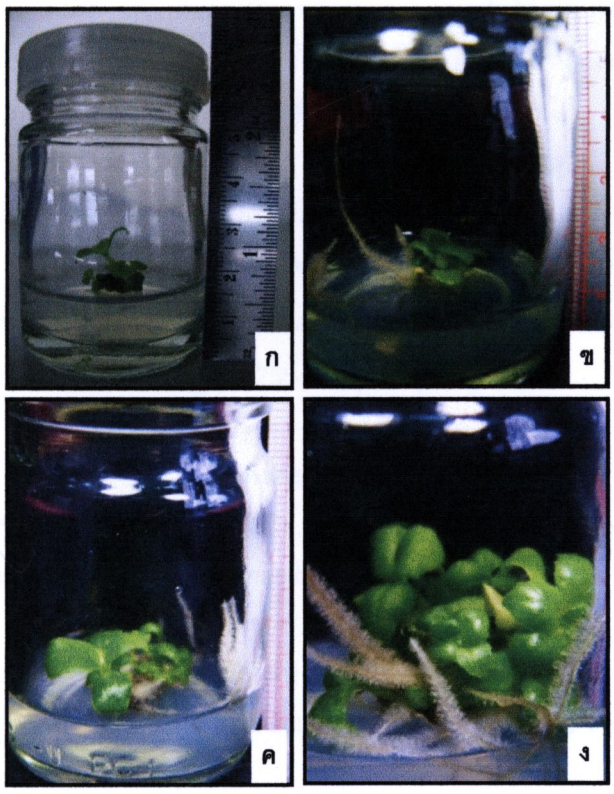
ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบไก่แดง (*Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.) ที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS+BA 0.5 mg/l การเจริญของชิ้นส่วนใบสัปดาห์ที่ 1 (ก), สัปดาห์ที่ 4 (ข), สัปดาห์ที่ 8 (ค), สัปดาห์ที่ 12 (ง)



ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบไก่แดง (*Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.) ที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS+TDZ 0.1 mg/l การเจริญของชิ้นส่วนใบสัปดาห์ที่ 1 (ก), สัปดาห์ที่ 4 (ข), สัปดาห์ที่ 8 (ค), สัปดาห์ที่ 12 (ง)



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนยอดใหม่ของไก่แดง (*Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ การเจริญบนอาหาร MS+BA 0.5 mg/l (ก) และ การเจริญบนอาหาร MS+TDZ 0.1 mg/l (ข)



ภาพที่ 5 การชักนำการเกิดยอดของไก่แดง (*Aeschynanthus parviflorus* (D. Don) Spreng.) ที่ย้ายมาจากอาหาร MS+TDZ 0.1 mg/l เพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS การเจริญของชิ้นส่วนใบสัปดาห์ที่ 1 (ก), สัปดาห์ที่ 4 (ข), สัปดาห์ที่ 8 (ค), สัปดาห์ที่ 12 (ง)

จากการทดลองตัดชิ้นส่วนใบจากธรรมชาติ เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ปริมาณที่มากกว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 mg/l (ภาพที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับ ปราณี และคณะ (2010) ได้ศึกษาการเกิดยอดใหม่ของ *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. จากชิ้นส่วนใบบนอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 2 แบบ คือ direct organogenesis และ indirect organogenesis ได้ดีที่สุด และ Cui *et al*, (2008) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงไก่แดงชนิด *Aeschynanthus radicans* Jack โดยใช้ชิ้นส่วนใบในอาหาร MS ที่เติม TDZ และ BA ร่วมกับ 2,4-D พบว่าสามารถชักนำให้เกิด Somatic embryo ได้ ในส่วนของการเพิ่มจำนวนต้นพืช ได้นำต้นอ่อนจากสภาพปลอดเชื้อในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l ย้ายเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ มีจำนวนต้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 5 ก-ง)

สรุปผล

พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสกุลไก่แดงชนิด *Aeschynanthus parviflorus* (D . Don) Spreng. ในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/l มีเปอร์เซนต์การเกิดยอดใหม่สูงสุด 26.67% และการนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ

0.1 mg/l ย้ายเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้จำนวนที่มากขึ้น เมื่อผ่านไป 12 สัปดาห์ พบว่าได้จำนวนต้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะนำไปขยายให้ได้ต้นใหม่ในอาหารสูตร MS อีกครั้ง จึงจะทำการย้ายต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อนี้ ไปปลูกในกระถาง ที่มีวัสดุปลูกแบบต่างๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ทุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2553 เพื่อสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และทุนการศึกษาค้นคว้าด้วยตนเองสำหรับนิสิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

เอกสารอ้างอิง

ปราณี นางงาม, พันธิตรา กมล และ อนุพันธ์ กงบังเกิด. 2010. **ผลของไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนใบ** *Aeschynanthus fulgens* Wall. ex R. Br. **ในสภาพปลอดเชื้อ**. Proceeding การประชุมวิชาการ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 3 วันที่ 14-15 มีนาคม 2554 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก, หน้า 113-116.

Burtt, B.L. 2001. Flora of Thailand: annotated checklist of Gesneriaceae. **Thai Forest Bulletin (Botany)** 29: 81-10.

Cui, J., Chen, J. and Henry, R. J. 2009. Regeneration of *Aeschynanthus radicans* via direct somatic embryogenesis and analysis of regenerants with flow cytometry. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 45: 34–43.

Middleton, D. J. 2007. A revision of *Aeschynanthus* (Gesneriaceae) in Thailand. **Edinburgh Journal of Botany** 64(3): 363-429.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15(3), 473-497.