เทคนิคการขยายพันธุ์นรีรัตน์ (*Petrocosmea pubescens*) พืชถิ่นเดียวของไทยในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Multiplication Technique of *Petrocosmea pubescens*, an Endemic Species in Thailand

พัฒน์นรี รักษ์คิด[1*] พัชร ปิริยะวินิตร[1] และปราโมทย์ ไตรบุญ[2]

Padnaree Rukkid[1], Phatchara Piriyavinit[1] and Pramote Triboun[2]

Received: October 19, 2023
Revised: January 18, 2024
Accepted: January 23, 2024

Abstract: *Petrocosmea pubescens* found only at Doi Tung, Chiang Rai province is an endemic species of Thailand. According to the International Union for Conservation of Nature (IUCN), it has been classified as vulnerable species. This research aimed to determine sterilization method and plant material which were suitable for micropropagation and conservation of this species. The result showed that the most effective sterilization method was dipping the mature pod of *P. pubescens* in 95% ethanol followed by quick moving the pod over flame before culturing seeds on medium. This sterilization method resulted in 50% sterilized seeds that successfully developed into plantlets. Various types and concentrations of plant growth regulators were also examined. The results indicated that after 3 months of culture, the highest shoot number (16 shoots per explant) was obtained from MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA.

Keywords: gesneriaceae, micropropagation, limestone plant

บทคัดย่อ: นรีรัตน์เป็นพืชถิ่นเดียวของไทยพบได้เฉพาะที่ดอยตุง จังหวัดเชียงราย ปัจจุบันองค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature, IUCN) ได้จัดสถานภาพให้อยู่ในระดับพืชที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ จึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมพืชชนิดนี้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อโดยศึกษาวิธีการและชิ้นส่วนที่เหมาะสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดนรีรัตน์โดยนำฝักแก่จุ่มในเอทานอล 95% และลนผ่านไฟ แล้วเพาะเลี้ยงเมล็ดจะได้ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 50% และศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของต้นนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อคือ อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 16 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

คำสำคัญ: พืชวงศ์ชาฤาษี, การขยายพันธุ์, พืชเขาหินปูน

---

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ปทุมธานี 12110

[1] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani 12110

[2] ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

[2] National Biobank of Thailand, National Science and Technology Development Agency

*Corresponding author: padnaree.r@gmail.com

คำนำ

นรีรัตน์ (*Petrocosmea pubescens* D.J. Middleton & Triboun) เป็นพืชถิ่นเดียวของไทย (endemic of species in Thailand) จัดอยู่ในวงศ์ชาฤาษี (Gesneriaceae) เป็นพืชล้มลุก แผ่นใบเกือบกลมหรือรูปไข่มีขนสั้นนุ่มหนาแน่นทั้งสองด้าน กลีบดอกสีม่วงเข้ม (Middleton and Triboun, 2010) มีศักยภาพเป็นพืชไม้ดอกไม้ประดับประเภทกระถาง โดยอาจพัฒนาให้เป็นพันธุ์ปลูกโดยตรงหรือใช้ในการผลิตเป็นพันธุ์ลูกผสม เนื่องจากดอกมีสีม่วงเข้มและใบมีรูปทรงที่สวยงาม (Shaw, 2011) ซึ่งในประเทศจีนได้มีการศึกษาศักยภาพการใช้ประโยชน์ทางยาและพัฒนาวิธีการผสมข้ามชนิดในพืชสกุล *Petrocosmea* (Ji, 2008) ปัจจุบัน IUCN (International Union for Conservation of Nature Natural resources) ได้จัดสถานภาพอยู่ในระดับ VU: Vulnerable กล่าวคือเป็นพืชที่มีความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติในภายหน้า จากการสำรวจพบประชากรต้นนรีรัตน์น้อยกว่า 500 ต้น พบได้เฉพาะบนหินปูนที่ระดับความสูง 1,350-1,400 เมตร จ.เชียงราย บริเวณที่พบมีการถูกคุกคามจากมนุษย์ (Triboun and Middleton, 2012) ซึ่งหากไม่มีการเร่งขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนประชากร อนาคตอันใกล้นี้ต้นนรีรัตน์อาจอยู่ในสภาวะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพืชโดยเฉพาะพืชถิ่นเดียว พืชหายาก และพืชใกล้สูญพันธุ์ (Siddique *et al*., 2003) มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Gesneriaceae หลายสกุล เช่น Sunpui and Kanchanapoom (2002) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Saintpaulia ionantha* พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบ และอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบ นอกจากนี้ North and Ndakidemi (2012) ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ *Streptocarpus rexii* พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้จำนวนต้นมากที่สุด Tang and Lin (2007) ได้รายงานผลการศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Chirita longgangensis* ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียวและใกล้สูญพันธุ์ของจีนโดยสามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kozak และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด *Kohleria amabilis* พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ แต่รายงานการศึกษาเพาะเลี้ยงพืชสกุล *Petrocosmea* ในสภาพปลอดเชื้อมีค่อนข้างน้อย การทดลองนี้เป็นการศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ต้นนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ และเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรให้มีปริมาณมากก่อนที่จะเข้าสู่การพัฒนาวิธีการนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน และเป็นแนวทางในการคืนพืชสู่ถิ่นธรรมชาติต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมตัวอย่างต้นนรีรัตน์ จากแหล่งธรรมชาติ ที่บริเวณเขาหินปูนยอดดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย จดบันทึกลักษณะพืชและแหล่งที่พบ

2. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์ 4 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อใบนรีรัตน์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Clorox) โดยทำความสะอาดใบนรีรัตน์ด้วยน้ำสบู่ ล้างน้ำแล้วแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที หยดสาร Tween 20 จำนวน 1-2 หยด ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 10-15 นาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 0.6x0.6 เซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยง

บนอาหาร สูตร MS นาน 3 เดือน บันทึกข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

วิธีการที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อใบนรีรัตน์ด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) โดยทำความสะอาดใบนรีรัตน์ด้วยน้ำสบู่ล้างน้ำแล้วแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ จำนวน 4 กรรมวิธีย่อย ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 $HgCl_2$ เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 2 $HgCl_2$ เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที

กรรมวิธีที่ 3 $HgCl_2$ เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 4 $HgCl_2$ เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที

ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 10-15 นาที ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 0.6 x 0.6 เซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 3 เดือน บันทึกข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

วิธีการที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อฝักที่ยังสุกแก่ไม่เต็มที่ โดยนำฝักที่ยังสุกแก่ไม่เต็มที่ของต้นนรีรัตน์จุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปลนผ่านไฟ ตัดปลายฝัก บิดและเคาะฝักเพื่อให้เมล็ดออก เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS นาน 3 เดือน บันทึกข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

วิธีการที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อฝักแก่ โดยนำฝักแก่ของต้นนรีรัตน์จุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปลนผ่านไฟ ตัดปลายฝัก บิดและเคาะฝักเพื่อให้เมล็ดออก เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 3 เดือน บันทึกข้อมูลร้อยละของการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

3. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot induction) จากการเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์บนอาหารสูตรต่าง ๆ โดยใช้ใบที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีขนาดเท่า ๆ กัน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.8 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ จำนวน 15 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 4 ซ้ำ บันทึกข้อมูลโดยการนับจำนวนยอดและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การรวบรวมตัวอย่างต้นนรีรัตน์

จากการสำรวจ และรวบรวม พบต้นนรีรัตน์ขึ้นบนหินปูนในป่าดิบเขาที่ระดับความสูง 1,350-1,400 เมตรจากระดับน้ำทะเล บริเวณดอยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย มีประชากรต้นนรีรัตน์เหลือเพียงไม่เกิน 500 ต้น และพบเพียงจุดเดียว ไม่มีการกระจายตัว ต้นนรีรัตน์เป็นพืชล้มลุก เหง้ามีขนหนาแน่น ใบเรียงแผ่ที่โคน แผ่นใบเกือบกลมหรือรูปไข่และมีขนสั้นนุ่มหนาแน่นทั้งสองด้าน ก้านใบยาวและมีขนหนาแน่น กลีบดอกสีม่วงเข้ม ผลแห้งลักษณะเรียวยาวขนาดประมาณเมล็ดข้าว (Figure 1) ภายในฝักแก่ประกอบด้วยเมล็ดสีน้ำตาลเข้มเป็นผงขนาดเล็กจำนวนมาก ส่วนเมล็ดในฝักที่ยังสุกแก่ไม่เต็มที่เป็นผงสีน้ำตาลอ่อนจำนวนมากและค่อนข้างชื้น

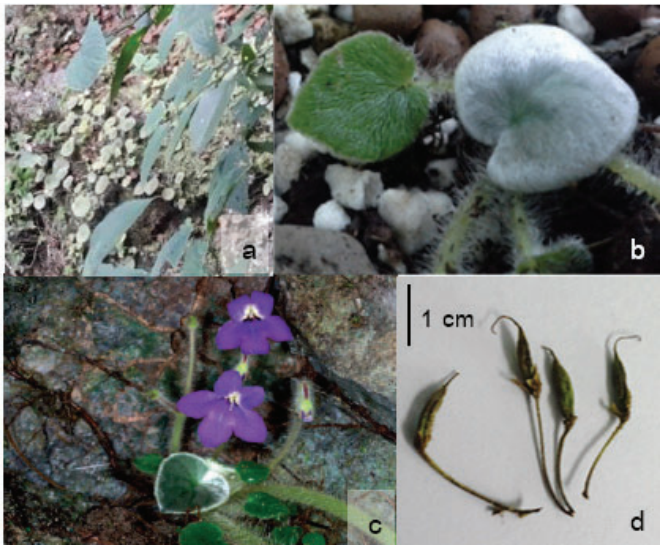

Figure 1 *Petrocosmea pubescens* in natural habitat (a) leaves and stems (b) flowers (c) and pods (d).

การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อต้นนรีรัตน์

การศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์ พบว่าชิ้นส่วนแผ่นใบไม่เหมาะสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากใบของต้นนรีรัตน์มีขนลักษณะสั้น ๆ สีขาวปกคลุมค่อนข้างหนาแน่นและราบไปกับพื้นผิวทั้งบริเวณด้านบนและใต้ของแผ่นใบ (Figure 2a และ b) และสภาพถิ่นที่พบต้นนรีรัตน์ในธรรมชาติเป็นป่าที่มีความชื้นค่อนข้างสูง ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก ทำให้การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ และ Clorox ไม่ประสบผลสำเร็จ คือพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชิ้นเนื้อเยื่อ แม้จะมีการเติมสารจับใบ คือ Tween 20 แล้วก็ตาม (Table 1) ในขณะที่มีรายงานว่าพืชบางสกุลในวงศ์ Gesneriaceae นี้ สามารถฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบและสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายปริมาณพืชได้ เช่น สกุล *Saintpaulia* (Mithila *et al*., 2003; Murch *et al*., 2003) และ *Sinningia* (Yang *et al*., 2022) แต่ใบของต้นนรีรัตน์มีการปกคลุมด้วยขนหนาทั้งด้านบนและด้านล่าง ลักษณะดังกล่าวจะเพิ่มความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้การทำความสะอาดและการฟอกฆ่าเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น มีการรายงานผลการวิจัยการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบในพืชวงศ์ Gesneriaceae โดยใช้สารละลาย Clorox ที่ระดับความเข้มข้น และเวลาต่าง ๆ ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ธีรภัทร และคณะ, 2541)

สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อฝัก พบว่าการนำฝักแก่จุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปลนผ่านไฟทำให้ได้ฝักที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์มากถึงร้อยละ 50 (Table 1) และนำเมล็ดที่อยู่ข้างในฝักเพาะบนอาหารสูตร MS สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (Figure 2c) แต่ถ้าใช้ฝักที่ยังสุกแก่ไม่เต็มที่นั้น ทำให้ได้ชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากตัวฝักเป็นเนื้อเยื่อที่ยังสด มีความชื้นและประกอบกับเมล็ดยังมีการพัฒนาไม่เต็มที่ และมีความชื้นค่อนข้างสูง จึงทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการฟอกฆ่าเชื้อฝักนครินทรา (*Paraboea sangwaniae*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกัน โดยใช้วิธีการนำฝักลนผ่านไฟและเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MS ทันที พบว่าเมล็ดมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าวิธีอื่น (พัชร และคณะ, 2555) อย่างไรก็ตาม ถ้าฝักแก่จัดมีลักษณะที่ปริแตกหรือเสียหาย อาจต้องนำเมล็ดออกมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย H_2O_2 เช่นในกรณีฝักของชาฤาษีดอยตุง (*Paraboea doitungensis*) (พัชร และคณะ, 2561)

Table 1 Effect sterilization methods on the rate of contamination of various explants of *Petrocosmea pubescens*.

Parts of plant	Methods	Sterilization methods	Contamination rate (%)
leaf	Clorox	10% Clorox, 15 min	100
leaf	$HgCl_2$	0.2% HgCl2, 3 min	100
		0.2% HgCl2, 5 min	100
		0.4% HgCl2, 3 min	100
		0.4% HgCl2, 5 min	100
young pod	over flame	95% EtOH + quick moving over the flame	100
mature pod	over flame	95% EtOH + quick moving over the flame	50

Figure 2 0.8x images of ventral leaf pubescence (a) dorsal leaf pubescence (b) plantlets after cultured on MS medium for 3 months (c).

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากแผ่นใบ

ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์เป็นเวลา 3 เดือน บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IBA ทั้ง 15 กรรมวิธี (Table 2) พบว่าให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ โดยอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 16 ยอดต่อชิ้นส่วน ลักษณะยอดใหม่ที่ได้มีความแข็งแรง สีเขียวและไม่ฉ่ำน้ำ (Figure 3) ซึ่งอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดี แต่การเติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้นสูง 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดใหม่ที่สมบูรณ์ลดลง ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 15.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งการเติม BA ที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่สมบูรณ์ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงจะสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี แม้จะเพิ่มปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งกลุ่มออกซิน (IBA) และไซโตไคนิน (BA) เกินกว่าที่ต้องการก็ไม่ช่วยให้ยอดมีความสมบูรณ์แข็งแรงมากขึ้น (*Paraboea doitungensis*) (พัชร และคณะ, 2561) การทดลองสอดคล้องกับการขยายพันธุ์แอฟริกันไวโอเล็ตและกล็อกซิเนียซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับต้นนรีรัตน์โดยทำการเพาะเลี้ยงก้านใบแอฟริกันไวโอเล็ตบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงผลการชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากได้ดีกว่าการใช้ BA ความเข้มข้นสูง ๆ (Bilkey *et al.*, 1978) ซึ่งมีรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ใบแอฟริกันไวโอเลต พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA

ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก และการเติม IBA ในปริมาณมากเกินไปมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ลดลง ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่ไม่เติม IBA ชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 9.3 ยอด (Daud and Taha, 2008; Ghasemi *et al*., 2012) สอดคล้องกับการรายงานของ Ma *et al*. (2010) ที่ได้เพาะเลี้ยงใบ *Metabriggsia ovalifolia* พืชวงศ์ Gesneriaceae พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (IAA, IBA และ NAA) ระดับความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เช่นเดียวกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงใบ Primulima tabacum บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดจำนวน 32 สูตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเฉลี่ย 6-8 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากถึง 21 ยอดต่อชิ้นส่วน (Ma *et al*., 2011)

Table 2 Effect of IBA and BA combination on multiple shoot induction from leaf of *Petrocosmea pubescens* cultured on MS medium for 3 months.

Medium	Number of shoots	Ranks
MS	7.1	9
MS + 0.1 mg/l BA	15.5	2
MS + 0.5 mg/l BA	9.8	5
MS + 1.0 mg/l BA	7.4	7
MS + 1.5 mg/l BA	6.5	11
MS + 0.5 mg/l IBA	16.0	1
MS + 0.5 mg/l IBA + 0.1 mg/l BA	9.6	6
MS + 0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BA	14.6	3
MS + 0.5 mg/l IBA + 1.0 mg/l BA	10.9	4
MS + 0.5 mg/l IBA + 1.5 mg/l BA	6.0	12
MS + 1.0 mg/l IBA	6.6	10
MS + 1.0 mg/l IBA + 0.1 mg/l BA	5.6	13
MS + 1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BA	5.6	14
MS + 1.0 mg/l IBA + 1.0 mg/l BA	7.3	8
MS + 1.0 mg/l IBA + 1.5 mg/l BA	3.9	15
mean	8.8	
F-test (T)	ns	
CV (%)	26.23	

CV : coefficient of variation

ns = non significant

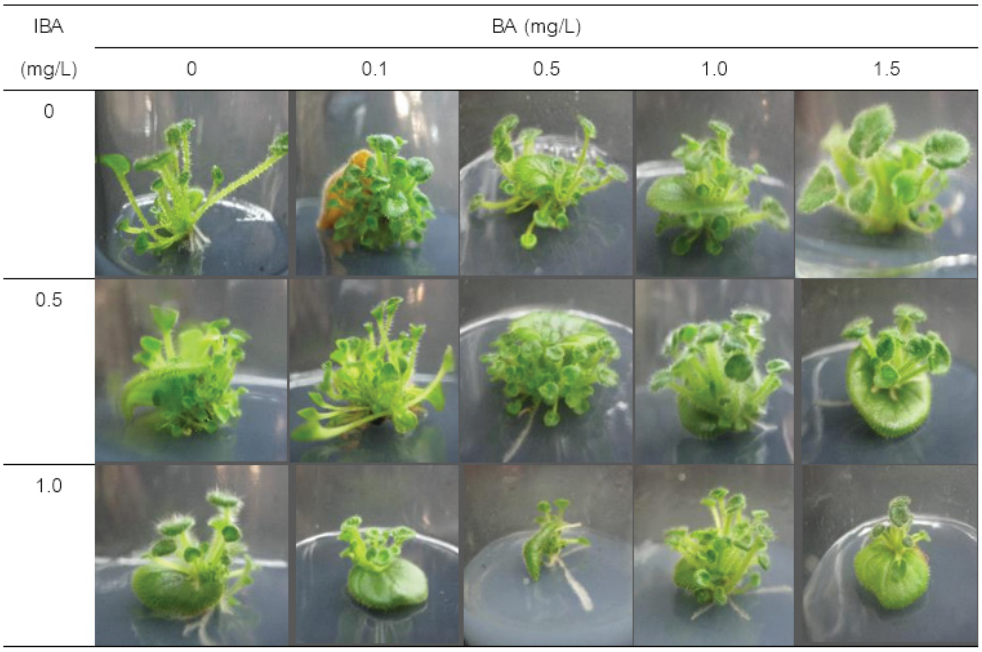

Figure 3 *Petrocosmea pubescens* plantlets after culturing on MS medium supplemented with BA and IBA for 3 months.

นอกจากนี้การย้ายปลูกต้นนรีรัตน์จากสภาพปลอดเชื้อเพื่อปลูกในสภาพโรงเรือน ต้องเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงและมีรากจำนวนมากนำมาปรับสภาพ โดยการนำออกจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคลายฝาขวดเพื่อลดความชื้นสัมพัทธ์ในขวดและมีการถ่ายเทอากาศมากขึ้น ประมาณ 5 - 7 วัน หลังจากนั้นล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด จุ่มยากันเชื้อรา แล้วปลูกโดยใช้วัสดุปลูกที่มีความโปร่งและอุ้มน้ำค่อนข้างดี แต่ต้องไม่รดน้ำจนแฉะเกินไป โดยเลือกใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ พีทมอส : ดินผสม : เพอร์ไลท์ : หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1 พบอัตราการรอดชีวิต 20 เปอร์เซ็นต์

สรุป

จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต้นนรีรัตน์ได้เทคนิคที่เหมาะสม คือ ฟอกฆ่าเชื้อฝักแก่โดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนผ่านไฟและเพาะเลี้ยงเมล็ด และจากการเพาะเลี้ยงใบนรีรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนยอด โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ทำให้เพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 16 ยอด/ชิ้นส่วน รองลงมาคือสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอด 15.5 ยอดต่อชิ้น และ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด 14.6 ยอดต่อชิ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนงบวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สถานที่ทำการวิจัย และขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สนับสนุนและร่วมงานวิจัยอย่างเต็มที่

เอกสารอ้างอิง

ธีรภัทร ศรีรัตนโชติ อนุพันธ์ กงบังเกิด และปราณี นางงาม. 2541. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงพืชวงศ์ชาฤาษีของประเทศไทย ในสภาพปลอดเชื้อ. ปริญญาโท, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

พัชร ปิริยะวินิตร พัฒน์นรี รักษ์คิด ปราโมทย์ ไตรบุญ และปาริฉัตร สังข์สะอาด. 2555. ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์นครินทรา (*Trisepalum sangwaniae*) พืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทยในสภาพปลอดเชื้อ. หน้า 395-400. ใน: การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่นวิทยาเขตหนองคาย ครั้งที่ 2, 30-31 สิงหาคม 2555. มหาวิทยาลัยขอนแก่นวิทยาเขตหนองคาย, หนองคาย

พัชร ปิริยะวินิตร พัฒน์นรี รักษ์คิด และปัณฑารีย์ กาญจนวัฒนาวงศ์. 2561. เทคนิคการขยายพันธุ์ชาฤาษีดอยตุง (*Paraboea doitungensis*) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์. วารสารวิชาการเกษตร 36(3): 268-278.

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

Daud, N. and R.M. Taha. 2008. Plant regeneration and floral bud formation from intact floral parts of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) cultured in vitro. Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 1055-1058.

Ghasemi, Y., G.A. Nematzadeh, V.G. Omran, A. Dehestani and S. Hosseini. 2012. The effects of explants type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency. Biharean Biologist 6(2): 73-76.

Ji, H. 2008. China Papers. Studies on Cytology, Reproductive Biology and Pollen Morphology of *Petrocosmea* (Gesneriaceae) from China. (online): Available source : http://ir.kib.ac.cn:8080/handle/151853/36 (August 29, 2020).

Kozak, D., J. Hetman and M. Witek. 2007. The influence of the mineral composition of the medium on in vitro propagation of *Kohleria amabilis* (Planch. Et Linden) Fritsch shoots. Acta Agrobotanica 60(1): 95-99.

Ma, G.H., A.T. Jaime, J.F. Lü, X.H. Zhang and J.T. Zhao. 2010. Shoot organogenesis and plant regeneration in *Metabriggsia ovalifolia.* Plant Cell Tissue and Organ Culture 105(3): 355-361.

Ma, G.H., C.X. He, H. Ren, Q.M. Zhang, S.J. Li, X.H. Zhang and B. Eric. 2011. Direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulima tabacum*. Biologia Plantarum 54(2): 361-365.

Mithila, J., J. Hall, J.M.R. Victor and P.K. Saxena. 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Plant Cell Reports 21(5): 408-414.

Middleton, D.J. and P. Triboun. 2010. Two new species of *Petrocosmea* (Gesneriaceae) from Thailand. Thai Forest Bulletin (Botany) 38: 42-47.

Murch, S.J., J.M.R. Victor and P.K. Saxena. 2003. Auxin, calcium and sodium in somatic embryogenesis of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cv. Benjamin. Acta Horticulturae 625: 201-209.

North, J.J. and P.A. Ndakidemi. 2012. Evaluation of different ratios of auxin and cytokinin for the *in vitro* propagation

of *Streptocarpus rexii* Lindl. International Journal of Physical Sciences 7(7): 1083-1087.

Shaw, J. 2011. A new species of *Petrocosmea.* The Plantsman 10(3): 177-179.

Siddique, N.A., M.A. Bari, N. Kharn, M. Rahman, M.H. Rahman and S. Huda. 2003. Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R.Br. (Anantamul) an endangered medicinal plant in Bangladesh. Journal of Biological Sciences 3: 1158-1163.

Sunpui, W. and K. Kanchanapoom. 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of african violet. (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. Songklanakarin Journal of Science and Technology 24(3): 357-364.

Tang Z. and H. Lin. 2007. Rapid in vitro multiplication of *Chirita longgangensis* W.T. Wang: An endangered Gesneriaceae species in China. Horticultural Science 42(3): 638-641.

Triboun, P. and D.J. Middleton. 2012. *Petrocosmea pubescens.* The IUCN Red List of Threatened Species 2012. (online): Available source: http://www.iucnredlist.org/details/201813/0 (March 15, 2023).

Yang, H., Y. Yang, Q. Wang, J. He, L. Liang, H. Qiu, Y. Wang and L. Zou. 2023. Adventitious shoot regeneration from leaf explants in *Sinningia Hybrida* 'Isa's Murmur'. Plants.11(1232): 1-11. (online): Available Source: https://doi.org/10.3390/plants11091232 (September 6, 2023).