การประชุมวิชาการระดับชาติ เกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ครั้งที่ 8
The 8th King Mongkut's Agriculture Conference: KMAC 2025

เทคนิคการขยายและอนุรักษ์พันธุกรรม *Paraboea bhumiboliana* ในสภาพปลอดเชื้อ

พัชร ปิริยะวินิตร* พัฒน์นรี รักษ์คิด และปราโมทย์ ไตรบุญ

บทคัดย่อ

ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์กูมิพลินทร์ พืชวงศ์แอฟริกันไวโอเลต (Gesneriaceae) ซึ่งจัดเป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศไทย มีการกระจายในพื้นที่จำกัด โดยเฉพาะบริเวณยอดเขาหินปูนในจังหวัดลำพูนและตาก ศึกษาเทคนิคฟอกฆ่าเชื้อกูมิพลินทร์ด้วยการใช้ผ้านวมไฟฟ่าเชื้อ การใช้น้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ และการใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 5% ผลการศึกษาพบว่าวิธีจุ่มฝักในเอทานอล 95% ตาม ด้วยการผ่านไฟฟ่าเชื้อ และเคาะเมล็ดเลี้ยงบนอาหารเป็นวิธีที่เหมาะสม ทำให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนได้ถึง 55.55% การศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดกูมิพลินทร์ โดยเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ระดับ คือ 0 0.1 และ 1.0 มก./ล. ผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับการเติม BA 0.1 มก./ล. สามารถชักนำยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ย 12.1 ยอด/ชิ้นส่วน สำหรับการศึกษาวิธีชะลอการเจริญเติบโตของกูมิพลินทร์ โดยเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/8MS 1/4MS 1/2MS และ MS ผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร 1/2MS สามารถชะลอการเจริญเติบโต โดยพืชคงความมีชีวิตได้นานถึง 12 เดือน แม้ปราศจากการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

Abstract

The study on micropropagation technique for *Paraboea bhumiboliana*, an endemic species classified in Gesneriaceae Family and found around the montane and limestone areas in Lamphun and Tak Province of Thailand, was conducted. Capsule sterilization by burning, steriled water and 5% H_2O_2 was carried out in this study. The result showed that the immersion of mature seed capsules in 95% ethanol followed by burning the capsule's outer surface was the optimum sterilization method which reached to 55.55% non-contamination. The study on shoot was also carried out. The findings revealed that 0.1 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA induced average vigorous shoot at 12.1 shoots per explant. *In vitro* conservation through slow growth storage technique of *P. bhumiboliana* by culturing on MS, 1/2MS, 1/4MS and 1/8MS. was attempted. It was revealed that after being cultured on 1/2MS, the plants maintained viabilities for 12 months without any subculture and developed their new plantlets.

คำนำ

กูมิพลินทร์ (*Paraboea bhumiboliana* Triboun & Chuchan) มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากเป็นพืชที่มีการกระจายในพื้นที่จำกัดในบริเวณยอดเขาหินปูน จังหวัดลำพูนและจังหวัดตาก (Triboun and Middleton, 2012) ด้วยปัจจุบันมีสภาวะการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมอย่างกะทันหันและต่อเนื่อง ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบันเป็นเทคนิคหนึ่งที่ปลอดจากภัยธรรมชาติน่ามาใช้ในการขยายและอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช โดยการชะลอการเจริญเติบโตหรือ Slow growth เป็นการอนุรักษ์ในระยะเวลาสั้นถึงปานกลาง ด้วยการเลี้ยงให้ให้เนื้อเยื่อพืชเกิดอัตราการเจริญเติบโตช้าลง แต่สามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ในเวลานาน เพื่อลดการย้ายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนถ่ายอาหารบ่อยๆ (Chauhan et al., 2019)

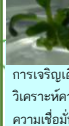
วิธีการศึกษา

รวบรวมตัวอย่างกูมิพลินทร์จากพื้นที่ยอดเขาหินปูน จ.ตากและลำพูน มีการออกดอกและติดฝักช่วงกรกฎาคม - ธันวาคม

ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนฝักกูมิพลินทร์โดยวิธีการเผาฝักแบ่งเป็น 3 กรรมวิธี

1. จุ่มฝักในเอทานอล 95% แล้วผ่านไฟฟ่าเชื้อ บิดฝักให้แตกและเคาะเมล็ดบนอาหาร MS
2. จุ่มฝักในเอทานอล 95% แล้วผ่านไฟฟ่าเชื้อ นำเมล็ดออกจากฝักใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใส่เมล็ด 1 ฝักต่อน้ำ 3 มล. จากนั้นดูดเมล็ดจำนวน 0.5 มล. พ่นบนอาหาร MS

3. จุ่มฝักในเอทานอล 95% แล้วผ่านไฟฟ่าเชื้อ นำเมล็ดออกจากฝักใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อที่เติม H_2O_2 เข้มข้น 5% อัตราส่วน 2:1 โดยใส่เมล็ด 1 ฝักต่อน้ำ 3 มล. จากนั้นดูดเมล็ดจำนวน 0.5 มล. พ่นบนอาหาร MS



ชักนำการเกิดยอดกูมิพลินทร์ในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนกูมิพลินทร์ขนาด 1 ซม. ที่ได้จากการเพาะเมล็ด เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 0.1 และ 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 0.1 และ 1.0 มก./ล. วางแผนการทดลอง Factorial in CRD จำนวน 5 ซ้ำ บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตที่สังเกตได้ จำนวนยอดที่สมบูรณ์ และขนาดของกลุ่มเนื้อเยื่อ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ชะลอการเจริญเติบโตกูมิพลินทร์ในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดกูมิพลินทร์ที่มีจำนวน 4 ข้อต่อยอดเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 1/8 MS, 1/4 MS, 1/2 MS, และ MS วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 8 ซ้ำ บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตที่สังเกตได้ และรัอยละการรอดชีวิต

สรุปผลการศึกษา

1. การฟอกฆ่าเชื้อฝักกูมิพลินทร์ โดยนำฝักมาพูดขนที่อยู่บนผิวฝักล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาด จุ่มฝักในเอทานอล 95% แล้วผ่านไฟฟ่าเชื้อ บิดเกลียวฝักให้แตกและเคาะเมล็ดเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ทำให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 55.55%
2. การขยายพันธุ์ต้นอ่อนกูมิพลินทร์บนสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสมบูรณ์เฉลี่ย 12.1 ยอด/ชิ้น
3. เลี้ยงต้นกูมิพลินทร์บนอาหาร 1/2 MS ทำให้ยังคงอัตราการรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้เมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 1 ปี โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร
4. พบอุปสรรคไม่สามารถย้ายต้นกูมิพลินทร์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกสู่สภาพธรรมชาติ ซึ่งการเปลี่ยนถ่ายอาหารในสภาพปลอดเชื้อส่งผลต่อความอ่อนแอของเชื้อพันธุกรรม

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อฝักของกูมิพลินทร์พบว่าควรขูดขนที่อยู่บนผิวฝักกูมิพลินทร์ให้สะอาด ล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาด หลังจากนั้นจุ่มฝักในเอทานอล 95% แล้วนำฝักมาผ่านไฟฟ่าเชื้อ บิดฝักที่เป็นเกลียวให้แตกและเคาะเมล็ดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งสอดคล้องกับการฟอกฆ่าเชื้อฝักของนครินทรา (*Paraboea sangwaniae*) (Piriyavinit et al., 2012) ซึ่งลักษณะรูปทรงกระบอกกว้าง (ellipsoid capsule) แต่แตกต่างจากฝักชาฤๅษีดอยลุง (*Paraboea doitungensis*) (Piriyavinit et al., 2018a) มีรูปทรงที่แตกต่างคือเป็นรูปทรงกระบอกแคบ (narrowly cylindric capsule) แม้จะเป็นพืชสกุลเดียวกันซึ่งมีลักษณะของฝักเป็นแบบแห้งแตกบิดเป็นเกลียว ภายในมีเมล็ดเล็กเป็นผงจำนวนมาก (Triboun and Middleton, 2012) โดยลักษณะรูปทรงที่แตกต่างกันนี้มีผลต่อการได้รับความเสียหายหรือการปริแตกของฝักระหว่างการฟอกฆ่าเชื้อ หากเป็นฝักรูปทรงกระบอกกว้างจะสามารถใช้วิธีผ่านไฟและเคาะเมล็ดนำไปเพาะบนอาหารสูตร MS ได้ทันที ทำให้ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน รวมถึงลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจากขั้นตอนต่างๆ ในขณะที่ฝักทรงกระบอกแคบจะปริแตกได้ง่ายกว่าจึงควรฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยการใช้สาร H_2O_2 ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับฟอกฆ่าในเมล็ด เช่น เมล็ด *Cannabis sativa* (Sorokin et al., 2021) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้หากพบการแตกของฝักอาจใช้ H_2O_2 สำหรับการเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนของเชื้อจากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกูมิพลินทร์ได้

Table 1 Effect of seed pods sterilization on the rate of survival.

Methods of Sterilization	Uncontaminated plantlets (%)
Burning seed capsules	55.55
Burning seed capsules + dipping in sterile water (H_2O)	0
Burning seed capsules + dipping in 5% hydrogen peroxide (H_2O_2)	22.22

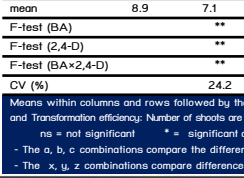


Figure 1 Pod of *Paraboea bhumiboliana* (a), *P. sangwaniae* (b) and *P. doitungensis* (c).

การชักนำให้เกิดยอดจากต้นอ่อนกูมิพลินทร์ พบว่าการเกิดกลุ่มยอดอ่อนขนาดเล็กหนาแน่นเป็นจำนวนมากแม้เลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยบางยอดพัฒนาเป็นยอดขนาดใหญ่และสมบูรณ์ได้ โดยเมื่อเติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.1 มก./ล. เกิดยอดขนาดใหญ่ที่สมบูรณ์มากที่สุด 12.1 ยอด/ชิ้น ซึ่งเมื่อเติม 2,4-D 1.0 มก./ล. ชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อได้มากที่สุดขนาด 2.59 ซม. โดยพืชสกุลนี้มีแนวโน้มการเกิดกลุ่มยอดขนาดเล็กที่สักษณะไม่แข็งแรงจำนวนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA แต่เมื่อเติมสารกลุ่มออกซินชักนำเกิดยอดสมบูรณ์ เช่น การเลี้ยงต้นอ่อนนครินทราบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D หรือ IBA เพียงอย่างเดียว (Piriyavinit et al., 2012; 2018b) และ การใช้ NAA ชักนำเกิดยอดสมบูรณ์จากใบชาฤๅษีดอยลุง (Piriyavinit et al., 2018a) แต่ทั้งนี้หากเพิ่มสารที่ควบคุมการเจริญเติบโตทั้งออกซินหรือไซโตไคนินมากกว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมมีแนวโน้มทำให้เกิดกลุ่มยอดขนาดเล็กที่มีแข็งแรงหนาแน่นจำนวนมากขึ้นและเกิดยอดที่สมบูรณ์ลดลง

Table 2 Effect of 2,4-D and BA combination on shoot multiplication from microplants of *Paraboea bhumiboliana* cultured on MS medium for 6 months.

2,4-D (mg/l)	Number of vigorous shoots				Shoot formation (cm)			
	BA (mg/l)				BA (mg/l)			
	0	0.1	1.0	mean	0	0.1	1.0	mean
0	8.3 a x	4.9 b y	3.7 b xy	**5.9**	2.18	2.36	2.40	**2.31 y**
0.1	9.2 b x	12.1 a x	5.5 c x	**8.8**	2.20	2.36	2.20	**2.25 y**
1.0	9.3 a x	3.8 b y	2.3 b y	**5.1**	2.58	2.58	2.62	**2.59 x**
mean	**8.9**	**7.1**	**3.8**		**2.32 b**	**2.43 a**	**2.41 a**	
F-test (BA)	**				**			
F-test (2,4-D)	**				*			
F-test (BA×2,4-D)	**				ns			
CV (%)	24.2				14.9			

Means within columns and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT and Transformation efficiency: Number of shoots are log (X+1) transformed value.
ns = not significant * = significant at 5% level ** = significant at 1% level
- The a, b, c combinations compare the difference in concentration of cytokinin (BA)
- The x, y, z combinations compare differences in concentrations of auxin (2,4-D)

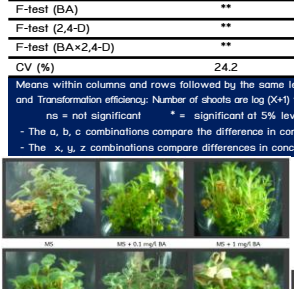


Figure 2 Shoot proliferation after microplants of *Paraboea bhumiboliana* being cultured on MS medium supplemented with different concentration of 2,4-D and BA for 6 months.

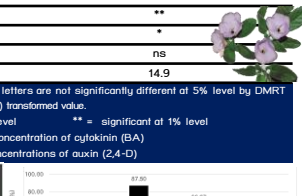


Figure 3 Effect of concentrations of MS medium on survival rate from shoot explants of *Paraboea bhumiboliana* for 8 months.

การชะลอการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 8 เดือน ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (subculture) อย่างน้อยหนึ่งครั้งเนื่องจากมีการแตกยอดเป็นกลุ่มยอดหนาแน่นจำนวนมาก ส่วนการปรับลดปริมาณสูตรอาหาร MS ลงการเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/8 MS และ 1/4 MS มีอาการแห้งเหี่ยวของยอดที่สมบูรณ์เกิดมากขึ้น เป็นสาเหตุให้ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างน้อยหนึ่งครั้งเมื่อเลี้ยงนาน 8 เดือน แต่เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร 1/2 MS สามารถเพาะเลี้ยงได้นาน 1 ปี แม้ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงยอดนครินทราบนอาหารสูตร 1/2 MS ได้นาน 1 ปี โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารและต้นยังคงสมบูรณ์ (Piriyavinit et al., 2018b)

เอกสารอ้างอิง

Chauhan, R., Singh, V., & Quraishi, A. (2019). *In vitro* conservation through slow-growth storage, pp. 397-416. In Faisal, M. and Alatar, A. A. (eds.). 2019. **Synthetic Seeds**. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19.

Piriyavinit, P., Rukkid, P., Triboun, P., & Sangkaso-ad, P. (2012). Study on Micropropagation technique of *Tilasoplum sangwaniae* an endemic species in Thailand. In **2th National Conference Khon Kaen University, Nongkhai Campus**, pp. 395-400. Khon Kaen University, Nongkhai Campus. (in Thai).

Piriyavinit, P., Rukkid, P., & Kanjanawattanawong, P. (2018a). Micropropagation technique of *Paraboea doitungensis* for conservation. **Thai Agricultural Research Journal**, 36(3), 268-278. (in Thai).

Piriyavinit, , Rukkid, P., Sangkaso-ad, P., & Triboun, P. (2018b). *In vitro conservation* technique of *Paraboea sangwaniae*. In **The 12th Botanical Conference of Thailand**, pp. 187-188. Mahasarakham University, (in Thai).

Sorokin, A., Yadav, N. S., Gaudat, D., & Kovalchuk, I. (2021). Development and standardization of rapid and efficient seed germination protocol for *Cannabis sativa*. **Bio-protocol**, 11(1), e3875. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3875.

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

จัดทำโดย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี