การขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อ (*Vatica diospyroides* Symington) โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

In vitro propagation of Chan Ka Pho (*Vatica diospyroides* Symington)

โดย

ดร. ธีร ศรีสวัสดิ์

สมอ
QK495.D564
ธ64
2555

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ วิทยาเขตหาดใหญ่

ประเภทพัฒนานักวิจัย ประจำปี 2550

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ในฐานะหน่วยงานที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยตลอดโครงการวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ นักวิจัยที่ปรึกษาในโครงการ ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลืองานวิจัยนี้จนสำเร็จ ขอขอบคุณ นายวิโรจน์ ศิริอุมากุล อดีตหัวหน้าและเจ้าหน้าที่ทุกท่านของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าหนองทุ่งทอง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าจันทน์กะพ้อ และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่สนับสนุนสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

ดร. ธีร ศรีสวัสดิ์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2555

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ : การขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อ (*Vatica diospyroides* Symington) โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

ชื่อนักวิจัย : ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

E-mail: theera918s@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: มีนาคม 2550 ถึง มีนาคม 2555

คัพภะและใบอ่อนของจันทน์กะพ้อถูกตัดแยกออกมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige & Skoog (MS, 1962) ที่มีการเติมผงถ่าน 0-0.3 เปอร์เซ็นต์ และ/หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), α-Naphthaleneacetic acid (NAA) และ 3,6-Dichloro-2-methoxybensoic acid (Dicamba) ที่ระดับความเข้มข้น 0-20 มก/ล จากการทดลอง พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีผงถ่าน ชิ้นส่วนไม่มีการตอบสนองใด ๆ แต่อาหารที่มีผงถ่าน 0.1-0.15 เปอร์เซ็นต์ คัพภะมีการเจริญเป็นยอดที่สมบูรณ์ทั้งหมด ขณะที่การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะโดยการวางเลี้ยงคัพภะบนอาหารที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดต่าง ๆ พบว่าคัพภะทั้งหมดเจริญเป็นยอด มีเพียงอาหารที่มี Dicamba ระดับความเข้มข้น 10-15 มก/ล ที่โคนของยอดอ่อนเกิดการเจริญเป็นแคลลัสได้ การชักนำให้เกิดแคลลัสสามารถชักนำได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงส่วนของใบอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่มี Dicamba 20 มก/ล เช่นกัน แต่ต้องวางเลี้ยงในสภาพมืดเท่านั้น แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส พบว่าการใช้ 6-Benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 0-20 มก/ล ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ แม้จะมีการวางเลี้ยงนานถึง 60 วัน ดังนั้นการขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อโดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: แคลลัส จันทน์กะพ้อ Dipterocarpaceae เพาะเลี้ยง

Abstract

Project title: ***In vitro*** **propagation of Chan Ka Pho (*Vatica diospyroides* Symington)**

Researcher: Dr. Theera Srisawat, Faculty of Science and Industrial technology, Prince of Songkla University, Suratthani campus

E-mail address: theera918s@hotmail.com

Project period: March 2008 to March 2012

Abstract

Embryos and young leaves of Chan Ka Pho were excised sterilely and then cultured on Murashige & Skoog (1962, MS) medium supplemented with 0-0.3% Activated Charcoal (AC) and/or 0-20 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), α-Naphthaleneacetic acid (NAA) and 3,6-Dichloro-2-methoxybensoic acid (Dicamba). The results showed that vigorous shoot development was carried out from embryo axes cultured on MS medium supplemented with all types and concentrations of plant growth regulator used and 0.1-0.15% AC. Calli were only induced successfully by culturing embryo axes on MS medium containing 10-15 mg/l Dicamba and 0.1% AC in darkness. Interestingly, vigorous calli were induced by culturing young leaves on the medium containing 20 mg/l Dicamba. These were successfully transferred to callus multiplication medium (MS) supplemented with 20 mg/l Dicamba prior transferring to shooting induction MS medium supplemented with 0-20 mg/l 6-benzyladenine (BA). Unfortunately, shoots were unsuccessfully induced from calli when culturing on shooting induction medium for 2 months interval. Therefore the successful protocol of *in vitro* Chan Ka Pho should be investigated more extensively.

Keyword: Calli, Chan Ka Pho, Dipterocarpaceae, Tissue culture

Executive summary

การขยายพันธุ์ไม้เนื้อแข็ง โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นความพยายามเพื่อเพิ่มจำนวนต้นพืชเหล่านั้นให้มีจำนวนที่มากขึ้น เพราะการขยายพันธุ์พืชกลุ่มนี้โดยวิธีธรรมชาติทำได้ยาก ทำให้ไม้เนื้อแข็งหลายชนิดอยู่ในภาวะเสี่ยงใกล้สูญพันธุ์ จันทน์กะพ้อ เป็นพืชในวงศ์ Dipterocarpaceae ที่มีความเสี่ยงใกล้สูญพันธุ์เช่นกัน เพราะเป็นไม้เนื้อแข็งที่มีการลักลอบใช้ประโยชน์ 2 ประการคือ หนึ่ง เป็นพืชที่มีดอกหอม กลิ่นหอมของจันทน์กะพ้อทำให้เกิดความต้องการลักลอบตัดเอาดอกในธรรมชาติไปเพื่อสกัดน้ำหอม เมื่อดอกถูกตัด การเกิดผลจึงไม่เกิดขึ้น จึงเป็นปัญหาที่ทำให้การขยายพันธุ์ในธรรมชาติทำได้ยากยิ่งขึ้น และสอง คือการลักลอบขุดทั้งต้น เพื่อนำไปปลูกในสถานที่ส่วนบุคคล ตามคำสั่งของผู้มีอำนาจ เพื่อปลูกไว้เชยชมกลิ่นหอมของดอกจันทน์กะพ้อ ทั้ง 2 กรณี เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปริมาณต้นจันทน์กะพ้อในธรรมชาติลดจำนวนลง

ประกอบกับจันทน์กะพ้อมีฤดูการออกดอกและออกผลในหนึ่งปีเพียงแค่ฤดูเดียว จึงต้องมีการศึกษาการขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อโดยการใช้หลักเทคโนโลยีชีวภาพ (เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนจันทน์กะพ้อให้ได้จำนวนต้นมาก ในระยะเวลาอันรวดเร็ว วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนจันทน์กะพ้อ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสม จึงถูกกำหนดให้เป็น parameters หลักสำหรับการศึกษา เนื่องจาก ชิ้นส่วนไม้เนื้อแข็งจะปล่อยสารกลุ่ม Phenolic compound ออกมาจากรอยตัด และจะเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อดังกล่าว จึงต้องกำหนดระดับความเข้มข้นของผงถ่านเป็น parameter รอง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และระดับความเข้มข้นของผงถ่าน ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของจันทน์กะพ้อ ระดับปัจจัยที่เหมาะสมดังกล่าว ช่วยให้การขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จมากขึ้น

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ชิ้นส่วนคัพภะจากผลของจันทน์กะพ้อ เป็นชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อสามารถนำมาชักนำให้เกิดเป็นยอดที่แข็งแรงได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่น่าสังเกตพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด 2, 4-D และ NAA ไม่สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนคัพภะแบ่งเซลล์เป็นแคลลัสได้ มีเพียง Dicamba ระดับความเข้มข้นสูง 15-20 มก/ล เท่านั้นที่มีผลต่อการตอบสนองการเกิดเป็นแคลลัสของจันทน์กะพ้อ ทั้งจากชิ้นส่วนคัพภะและใบอ่อน ขณะที่ BA ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสสร้างยอดได้ แม้จะมีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลาร่วมกว่า 2 เดือน มีเพียงการเกิดรากจากชิ้นส่วนแคลลัสเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยเพื่อการขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
Executive summary	ง
สารบัญ	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
1. บทนำ	1
2. ตรวจเอกสาร	3
3. วิธีการวิจัย	8
4. ผลการทดลอง	10
5. วิจารณ์ผลการทดลอง	20
6. สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	27

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. ลักษณะสัณฐานของดอก (ก) และผล (ข) ของจันทน์กะพ้อ 4
2. แสดงการเจริญและเปลี่ยนแปลงของคัพภะจันทน์กะพ้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ก) คัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ข) คัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน และ (ค) คัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน 13
3. แสดงลักษณะต้นอ่อนจันทน์กะพ้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน 13
4. แสดงการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของจันทน์กะพ้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาเป็นเวลา 2 เดือน 17-18
5. แสดงลักษณะของแคลลัสเมื่อย้ายลงอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BAที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (ก) BA ระดับความเข้มข้น 0 มก/ล (ข) BA ระดับความเข้มข้น 5 มก/ล (ค) BA ระดับความเข้มข้น 10 มก/ล (ง) BA ระดับความเข้มข้น 15 มก/ล และ (จ) BA ระดับความเข้มข้น 20 มก/ล 19

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลของปริมาณผงถ่านต่อการเจริญของยอดจากแกนคัพภะ	10
2. แสดงการเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตเป็นยอดของจันทน์กะพ้อเมื่อเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	11
3. ประสิทธิภาพของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เป็นแคลลัสจากแกนคัพภะ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน	12
4. การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อใบอ่อนของจันทน์กะพ้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล เป็นเวลา 2 เดือน	14
5. แสดงการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของใบอ่อนจันทน์กะพ้อและน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน	16

บทที่ 1
บทนำ

จันทน์กะพ้อ (*Vatica diospyroides* Symington) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae จัดเป็นไม้หวงห้าม และหายาก เป็นพันธุ์ไม้ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (อยู่ในลำดับ Critical endangered ใน IUCN Plant Red Data Book) (Lucas และ Synge, 1978) ทั้งนี้เนื่องจากจันทน์กะพ้อเป็นพันธุ์ไม้ที่อาศัยอยู่ในป่าบึงน้ำจืดซึ่งเป็นป่าที่มีสภาพน้ำท่วมขังเป็นเวลานานหรือตลอดปี เอื้ออำนวยแก่การพักพิงอาศัยและการทำเกษตร จึงทำให้มีการบุกรุกเข้าครองพื้นที่เพื่อตั้งบ้านเรือนและทำการเกษตรเป็นจำนวนมาก ทำให้พื้นที่ดังกล่าวถูกทำลาย โดยการแผ้วถางพันธุ์ไม้ที่มีอยู่เดิมออก เปลี่ยนสภาพจากป่าที่เขียวชอุ่มเป็นทุ่งโล่ง และที่สำคัญจันทน์กะพ้อมีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดเพียงอย่างเดียว และโอกาสที่จะเพาะขึ้นเป็นต้นในธรรมชาตินั้นมีน้อยมาก ไม่เกินร้อยละยี่สิบ เพราะเมล็ดมีอัตราการงอกต่ำ และยังถูกทำลายจากการกัดกินของแมลงและยังมีการลักลอบตัดดอก และขโมยต้นจันทน์กะพ้อออกมาจากป่า จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้จันทน์กะพ้อใกล้สูญพันธุ์ ในปัจจุบัน ต้นจันทน์กะพ้อสามารถพบการแพร่กระจายพันธุ์มากที่สุดในธรรมชาติ ณ พื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าหนองทุ่งทอง ต. เขาตอก อ. เคียนซา จ. สุราษฎร์ธานี แต่พบว่ามีจำนวนต้นจันทน์กะพ้อในพื้นที่ดังกล่าวไม่เกิน 200 ต้น เท่านั้น (วิโรจน์, Personal communication) จึงควรมีการศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นจันทน์กะพ้อให้ได้ต้นจำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของจันทน์กะพ้อ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวนต้นจันทน์กะพ้อในธรรมชาติให้มากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากจันทน์กะพ้อ เป็นไม้เนื้อแข็ง และยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน จึงมีแนวโน้มที่จะขยายพันธุ์ด้วยวิธีการดังกล่าวค่อนข้างยาก เพื่อให้การขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เข้าใกล้ความสำเร็จมากที่สุด การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของจันทน์กะพ้อ โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซินและไซโทไคนินเป็นฮอร์โมนกระตุ้น ผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์เพื่อต่อยอดงานวิจัยการอนุรักษ์ต้นจันทน์กะพ้อในธรรมชาติมิให้สูญพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1) เพื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนจันทน์กะพ้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2) เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของชิ้นส่วนจันทน์กะพ้อในสภาพปลอดเชื้อ

3) เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของจันทน์กะพ้อ

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 ข้อมูลทั่วไป

จันทน์กะพ้อมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vatica diospyroides* Symington มีชื่ออื่นว่า จันทน์พอ จันทน์พ้อ (ภาคใต้) เขี้ยวงูเขา (พังงา) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae ต้นแตกกิ่งจำนวนมาก เรือนยอดเป็นทรงกลม เปลือกแตกและมียางใสซึมออกมา โตเร็วใช้เวลา 5 - 7 ปี จึงจะออกดอก ชอบความชื้นสูง ทนน้ำท่วมขัง เหมาะจะปลูกในที่โล่งแจ้งริมน้ำหรือในที่มีน้ำหลากน้ำท่วม ในประเทศไทยพบต้นจันทน์กะพ้อได้เฉพาะที่ภาคใต้ (Endemic peninsular) (Pooma, 2002) เท่านั้น สำหรับพื้นที่ที่พบการแพร่กระจายพันธุ์มากที่สุด คือพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าหนองทุ่งทอง ตั้งอยู่ในเขตตำบลเขาตอก อำเภอเคียนซา จังหวัดสุราษฎร์ธานี จัดเป็นไม้ที่มีค่าและเป็นไม้หวงห้ามของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ถิ่นกำเนิด	เอเชียเขตร้อน
ลักษณะ	ไม้ต้นสูง 5-15 เมตร เรือนยอดทรงกลม เปลือกต้นเรียบ สีน้ำตาลอมเทา สีเทาคล้ำ มักมียางใสซึมตามรอยแผล เปลือกชั้นในมีสีเหลือง
ใบ	ใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบรูปขอบขนาน กว้าง 5 – 7 ซม. ยาว 14 – 20 ซม. ปลายใบเป็นติ่งแหลม โคนใบสอบและเบี้ยวเล็กน้อย ผิวใบเกลี้ยง เส้นแขนงใบ 15 – 18 คู่ ปลายเส้นโค้งจรดขอบใบ ก้านใบยาวประมาณ 1.5 ซม. สีเขียวเข้มเป็นมัน ใบอ่อนมีขนสีน้ำตาลแดง
ดอก	ออกเป็นช่อสั้นตามง่ามใบและปลายกิ่ง มีกลีบดอก 5 กลีบ สีขาวนวลหรือเหลืองอ่อน เมื่อดอกบานมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 ซม. ยาวประมาณ 3 ซม. ด้านนอกของกลีบมีขนนุ่มสีน้ำตาล ดอกทยอยบานนาน1-2 สัปดาห์ ดอกบานเพียงวันเดียว ดอกมีกลิ่นหอมแรง (ภาพที่ 1ก)
ฤดูออกดอก	ออกดอกเดือนพฤศจิกายน-มีนาคม กลิ่นหอมมากในเวลากลางคืน
ผล	ผลแก่เดือนมีนาคม-กรกฎาคม ผลกลมรีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 – 3 ซม. ผิวผลเป็นขุยสีน้ำตาล เมื่อแก่แตกเป็น 3 กลีบ มีกลีบประดับ 5 กลีบสั้นกว่าตัวผล (ภาพที่ 1ข)

การกระจายพันธุ์มีการกระจายพันธุ์ในป่าดิบชื้นที่ลุ่มต่ำ และชายขอบพรุทางภาคใต้ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 0-350 ม. (Smitinand, 1966)

สภาพปลูก ดินชุ่มชื้น แสงแดดจัด ชอบน้ำมาก

ขยายพันธุ์ ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด แต่เมล็ดมีอัตราการงอกต่ำ

(ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2542)

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานของดอก (ก) และผล (ข) ของจันทน์กะพ้อ

ประโยชน์ของจันทน์กะพ้อ

ต้นจันทน์กะพ้อปัจจุบันสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น

ไม้ประดับ ความน่าสนใจของไม้ชนิดนี้คือ รูปทรงลำต้นตรง แตกกิ่งก้านต่ำ เรือนยอดเป็นพุ่มกว้างกลมใบเขียวตลอดปี ให้ร่มเงาได้ดี และที่สำคัญมีดอกสีขาวนวลที่มีกลิ่นหอมแรง ดอกดก ปลูกในป่าอนุรักษ์ สนามหน้าบ้านหรือในการจัดสวนหย่อมได้ดี ปลูกได้กว้างขวาง

เครื่องมือต่าง ๆ เนื้อไม้จันทน์กะพ้อมีสีน้ำตาลอมเหลือง ใช้สำหรับก่อสร้างและทำด้ามเครื่องมือเครื่องใช้ได้หลายชนิด

สมุนไพร ส่วนที่ใช้เป็นสมุนไพรและมีสรรพคุณทางยาคือ **ดอก** ปรุงเป็นยาหอม แก้ลม บำรุงหัวใจ **เนื้อไม้** รสร้อนหอม แก้ไข้เพื่อลม แก้สันนิบาต แก้เสมหะและโลหิต ขับลม แก้ลมวิงเวียน ล่าสุดสามารถสกัดสารกลุ่ม resveratrol tetramer ได้แก่ vatdiospyridol และ vaticaphenol A ออกมาจากส่วนของลำต้นเพื่อใช้เป็นยาต้านโรคมะเร็งปาก มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งเต้านม (Kinghorn, 2000; Kinghorn และคณะ, 2011; Seo และคณะ, 1999;) เป็นต้น

อุตสาหกรรมน้ำหอม กลีบดอกจันทน์กะพ้อสามารถนำมากลั่นเพื่อสกัดเป็นหัวน้ำหอม โดยสมัยก่อนคนโบราณใช้ดอกกลั่นทำน้ำมันใส่ผม ในปัจจุบันโรงงานทำน้ำหอมมีความต้องการสกัดน้ำหอมจากดอกจันทน์กะพ้อเป็นอย่างมาก เนื่องจากส่วนของดอกจันทน์กะพ้อให้กลิ่นหอม

แรง แม้ว่าในประเทศไทยจะมีไม้หอมหลายชนิดที่สามารถนำส่วนของดอกมาสกัดเพื่อทำน้ำหอมหรือน้ำปรุงดอกไม้ได้ แต่ความนิยมในการใช้น้ำปรุงดอกไม้จากดอกจันทน์กะพ้อมีมากกว่าดอกไม้ชนิดอื่น ๆ และในจำนวนดอกไม้ที่สามารถนำมาสกัดน้ำปรุงดอกไม้ได้ ดอกจันทน์กะพ้อจัดว่าหายากที่สุด เพราะต้นจันทน์กะพ้อออกดอกเพียงปีละครั้ง ดังนั้นการทำอุตสาหกรรมผลิตน้ำปรุงดอกไม้จากจันทน์กะพ้อ จึงต้องอาศัยจำนวนต้นจันทน์กะพ้อเป็นจำนวนมากทั้งที่ในธรรมชาติมีจำนวนต้นจันทน์กะพ้อน้อย เพราะโอกาสที่จะเพาะเมล็ดขึ้นเป็นต้นในธรรมชาตินั้นมีน้อยมาก ไม่เกินร้อยละยี่สิบ หากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นเพื่อเพิ่มจำนวนต้นยังทำไม่ได้ โอกาสในการประสบความสำเร็จในเรื่องการทำอุตสาหกรรมน้ำปรุงดอกไม้จากจันทน์กะพ้อจึงมีน้อย จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ต้นจันทน์กะพ้อมีราคาแพงและหายาก ยิ่งไปกว่านั้น ในการจัดทำบัญชีรายชื่อและสถานภาพของชนิดพันธุ์ที่สำคัญ ที่ใกล้สูญพันธุ์และหายากและชนิดพันธุ์เฉพาะถิ่นของพรรณพฤกษชาติในประเทศไทย จันทน์กะพ้อยังถูกจัดเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ (Critically endangered) อีกด้วย

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบัน รายงานการขยายพันธุ์พืชไม้เนื้อแข็งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังมีอยู่จำกัด เนื่องจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อสภาวะเพาะเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม สำหรับจันทน์กะพ้อ ยังไม่มีรายงานวิจัยใด ๆ ที่รายงานผลความสำเร็จในการขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีเพียงรายงานวิจัยในพืชยืนต้นที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน และพืชยืนต้นสายพันธุ์อื่น ๆ ดังต่อไปนี้

ในปี 1989 Ishii และคณะ ได้มีการขยายพันธุ์กระบาก (*Anisoptera costata*) โดยใช้ส่วนบริเวณข้อที่ต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 Gamborg (B5) (Gamborg et al.,1968) พบว่าในอาหารสูตร 1/2 B5 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 6- Benzylaminopurine (BAP) 1 มก/ล สามารถชักนำให้เกิด Axillary shoot ได้ ในขณะเดียวกัน ก็พบว่า *Dryobolanops lanceolata* สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยเลี้ยงส่วนคัพภะ บนอาหารสูตร 1/2 MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มก/ล เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากได้

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) และยางกราด (*D. intricatus* Dyer) มีการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนของข้อที่ติดกับใบเลี้ยง โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเกิดและการยืดยาวของยอดยางนา และยางกราด คือ BA เมื่อนำยอดจุ่มลงใน Indole butyric acid (IBA) ที่มีความเข้มข้น 10^{-3} ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวก็จะกระตุ้นการเกิดรากได้ (Lining, 1991)

Scott และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.) โดยใช้ส่วนของคัพภะ วางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 หรือ MS ที่มีการดัดแปลงสูตรซึ่งมีสารควบคุมการ

เจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2.2 - 22.2 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิด Axillary shoots และชักนำให้เกิดรากบนอาหาร Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1981) ที่มีส่วนผสมของ NAA เท่านั้น ต่อมาในปี 1998 Scott และคณะ ยังได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพะยอม *(Shorea roxburghii* G. Don) โดยการเพาะเลี้ยงส่วนแกนคัพภะของเมล็ด ในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 5 มก/ล พบว่าสามารถชักนำให้เกิด Axillary shoots ได้

สำหรับพืชยืนต้นสายพันธุ์อื่น ๆ ที่สามารถขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงได้มีดังนี้

ไม้สัก (*Tectona grandis* Linn.f) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการนำเมล็ดอ่อนมาวางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 0.5 มก/ล ร่วมกับ Kinetin (Kn) 0.25 มก/ล สลับกับสูตร MS ร่วมกับ NAA 0.7 มก/ล และ Kn 0.3 มก/ล จะเพิ่มจำนวนและความแข็งแรงของเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด (จำนรรจ์, 2549) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้สักยังสามารถใช้ส่วนตาข้างโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 ไมโครโมลาร์ และ NAA 1.0 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดยอด และชักนำให้เกิดรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 15 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้นมีการปรับสภาพให้แข็งแรงใน Mist chamber ก่อนย้ายลงปลูกในโรงเรือน (Shirin และคณะ, 2005)

Du และ Pijut (2008) ผลิตต้นกล้า Green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) โดยการวางเลี้ยงส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอด และชักนำยอดที่ได้ให้เกิดรากโดยการวางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ร่วมกับ Indole-3-acetic acid (IAA)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้กฤษณา (*Aquilaria crassna*) โดยนำเนื้อเยื่อส่วนของตายอดและตาข้างวางเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และWPM ที่มี BA ความเข้มข้น 0 - 5 มก/ล พบว่าอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 3 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงที่สุดประมาณ 12 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดในอาหาร สูตร WPM ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง 1/2 เท่า (ยุพา และคณะ, 2550) ขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้เนื้อแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ *Balanites aegyptiaca*, *Citrus limon* และ *Syzygium cuminii* บนอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 0.45 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดการแตกหน่อและเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ (Rathore และคณะ, 2004)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยูคาลิปตัส (*Eucalyptus urophylla*) สามารถชักนำชิ้นส่วนของยูคาลิปตัสให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้ส่วนผสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 ไมโคร

โมลาร์ และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะแวดล้อมควบคุมที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ (lux) และระยะเวลาการให้แสงสว่างนาน 12 ชั่วโมง/วัน สามารถชักนำชิ้นส่วนให้เกิดยอดได้ดีที่สุดประมาณ 3-4 ยอด ภายในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ (ปัญจรัตน์ และพนิดา, 2545)

ในการชักนำชิ้นส่วนไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) ให้เกิดยอดในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ระดับความเข้มข้น 20ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ควบคุมด้วยอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ และระยะเวลาการให้แสงสว่างนาน 12 ชั่วโมง/วัน ปรากฏว่าสามารถชักนำชิ้นส่วนให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยเกิดจำนวนยอดเฉลี่ย 4.75 ยอด ภายในระยะเวลา 3 - 4 สัปดาห์ และผลการศึกษาการยืดตัว (Shoot elongation) ของยอดที่เกิดขึ้น พบว่าการเติม GA_3 0.6 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถช่วยให้ยอดยืดตัวได้ดี สำหรับการทดลองชักนำรากจากยอดที่ได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ร่วมกัน ชนิดละ 1 ไมโครโมลาร์ ภายในระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี (ปัญจรัตน์ และคณะ, 2544)

ชิ้นส่วนไม้ชิงชัน *(D. oliveri)* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ ในระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ (ปัญจรัตน์ และคณะ, 2544) ขณะที่เมล็ดอ่อนของสำรอง (*Scaphium macropodum* Beaum.) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่มีการเติม TDZ และ BA พบว่าอาหารสูตร WPM ที่มี BA 4 มก/ล แต่ไม่มี TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Khamparat และคณะ, 2005) ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว เช่นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) สามารถนำส่วนของใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Dicamba หรือ 2,4 – D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนสร้างแคลลัสได้เช่นเดียวกัน (Te - chato และคณะ, 2004) นอกจากนี้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมเทเนอร่าสุราษฎร์ธานี 3 พบว่าคัพภะอ่อนเกิดแคลลัสได้สูงสุด 83.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม dicamba 10 ไมโครโมลาร์ นาน 4 เดือน และใบอ่อน (young leaf primordia) ที่ฝังตัวอยู่ข้างในส่วนยอดของปาล์มน้ำมันเกิดแคลลัสได้ 24.63 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร MS ที่เติม dicamba 15 ไมโครโมลาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 เดือน (ชยานิจ, 2552)

เท่าที่กล่าวมา ยังไม่มีรายงานใดที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อในหลอดทดลอง และในประเทศไทยยังไม่มีนักวิจัยกลุ่มใดศึกษาในเรื่องนี้ ดังนั้นความรู้ที่ได้จากโครงการนี้จะมีส่วนช่วยในการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนต้นจันทน์กะพ้อในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุพืช (Plant materials)

การทดลองครั้งนี้ใช้เมล็ดและต้นกล้าจันทน์กะพ้อจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าหนองทุ่งทอง ต. เขาตอก อ. เคียนซา จ. สุราษฎร์ธานี โดยความอนุเคราะห์ของหัวหน้าและเจ้าหน้าที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าหนองทุ่งทอง

3.2 การเพาะเลี้ยงคัพภะและการชักนำให้เกิดแคลลัสจากแกนคัพภะ (Embryo culture and callus initiation from embryo axes)

นำเมล็ดจันทน์กะพ้อมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน หลังจากนั้นแช่ในด่างทับทิมหรือโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMn_4O) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10 - 20 นาที นำขึ้นใส่ตะกร้าทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ ซับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์จนแห้ง หลังจากนั้นแกะเปลือกนอกออกจะได้เมล็ดในมีใบเลี้ยงสีขาว (Cotyledon) นำเมล็ดที่แกะเปลือกนอกออกแล้วจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว ตัดเอาส่วนคัพภะ แล้วนำส่วนคัพภะที่ได้วางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0 - 0.3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, 2,4 - D และ Dicamba ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มก/ล ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วางขวดเพาะเลี้ยงไว้ในสภาพได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญของต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ และชักนำให้เกิดแคลลัส บันทึกอัตรารอดของต้นกล้าและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

3.3 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อน (Callus initiation from young leaves)

เก็บตัวอย่างใบอ่อนจันทน์กะพ้อโดยการตัดใบอ่อนที่มีอายุประมาณ 1 สัปดาห์ จากต้นกล้าที่มีอายุ 3 เดือน นำใบอ่อนที่ได้ล้างทำความสะอาดผ่านน้ำก๊อกและแช่น้ำยาล้างจาน 10 นาที จากนั้นล้างน้ำยาล้างจานออกให้สะอาด ตัดแยกใบอ่อนแล้วนำใบอ่อนเข้าตู้ปลอดเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 2 - 3 หยด นาน 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำมาตัดแต่งชิ้นส่วนออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1.0 ตารางเซนติเมตร วางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล ระดับความเข้มข้นละ 30 ซ้ำ วางเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืดเป็นเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส สังเกตผล

ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เมื่อครบ 1 เดือน ทำการย้ายเลี้ยงลงบนอาหารใหม่ (Subculture) บันทึกเปอร์เซ็นต์ของการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัส ลักษณะสีของแคลลัส และชั่งน้ำหนักสด

3.4 การชักนำให้เกิดยอด (Shoot induction)

นำแคลลัสที่ได้ ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล) ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วางเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด และมีแสงสว่าง 2000 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงทุกเวลา 1 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดยอด บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดต่อขวด ลักษณะทางกายภาพของแคลลัสและยอดจันทน์กะพ้อที่เกิดขึ้น

3.5 การบันทึกผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ (Data analysis)

ทำการสังเกตผลการชักนำให้เกิดแคลลัสทุก ๆ 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลา 2 เดือน ภายใต้สภาวะมืด เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตโดยการชั่งนำหนักสดแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี One - way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงคัพภะและการชักนำให้เกิดแคลลัสจากแกนคัพภะ (Embryo culture and callus initiation from embryo axes)

4.1.1 ความเข้มข้นของผงถ่านที่เหมาะสม

จากการทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะของจันทน์กะพ้อในอาหารสูตร MS ที่มีการเติมผงถ่านและไม่เติมผงถ่าน พบว่าในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมผงถ่านไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อตายทั้งหมด แต่ในอาหารสูตร MS ที่มีการเติมผงถ่าน แกนคัพภะมีการเจริญเติบโตเป็นยอดที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะในอาหารที่มีผงถ่าน 0.1- 0.15 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของปริมาณผงถ่านต่อการเจริญของยอดจากแกนคัพภะ

ปริมาณผงถ่าน (เปอร์เซ็นต์)	ร้อยละของจำนวนยอดที่เจริญ	ร้อยละของจำนวนเนื้อเยื่อที่ตาย
0	0	100
0.05	25	0
0.10	100	0
0.15	100	0
0.20	25	0
0.30	60	0

4.1.2 การเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo culture)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะของจันทน์กะพ้อในอาหารสูตร MS ที่มีการเติมผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าคัพภะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แต่การพัฒนายังไม่สมบูรณ์ในระยะเวลา 2 เดือน (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของจันทน์กะพ้อเมื่อเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

สัปดาห์	Parameter (%) *			
	ปนเปื้อน	ปลอดเชื้อ	ตาย	การพัฒนาของต้นอ่อน
1	3.68	96.32	0	100
2	3.05	96.95	0	100
3	5.51	94.49	0	100
4	0	100	0	100
5	1.6	98.4	0	100
6	0.85	99.15	0	100
7	0	100	0	100
8	0	100	0	100

* จำนวนขวดเพาะเลี้ยงทั้งหมด 136 ขวด

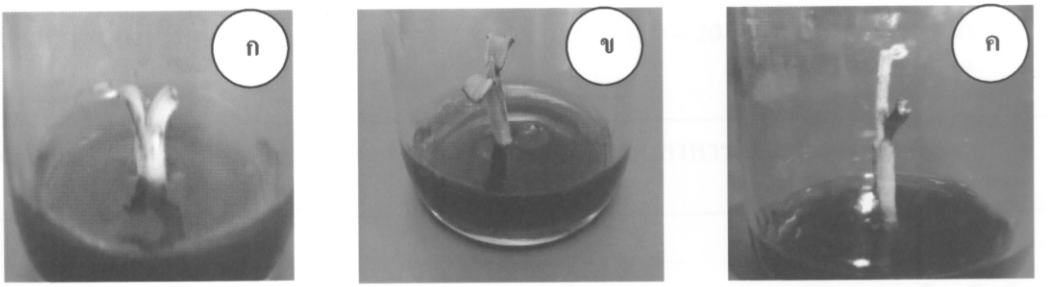
4.1.3 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากแกนคัพภะ (Callus initiation from embryo axes)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแกนคัพภะลงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0-0.3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, 2, 4 - D และ Dicamba ระดับความเข้มข้น 0 -15 มก/ล เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าสูตรอาหารทั้งหมดไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากแกนคัพภะได้ (ตารางที่ 3) เพราะคัพภะทั้งหมดไม่ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกชนิด และมีการเจริญเป็นต้นอ่อนแทน และเมื่อครบเวลา 6 เดือน ต้นอ่อนดังกล่าวแสดงลักษณะของต้นอ่อนที่แข็งแรง แต่ในอาหารที่มี Dicamba ความเข้มข้น 10-15 มก/ล จะเริ่มมีการปรากฏของแคลลัสที่ตรงรอยตัด (ภาพที่ 3)

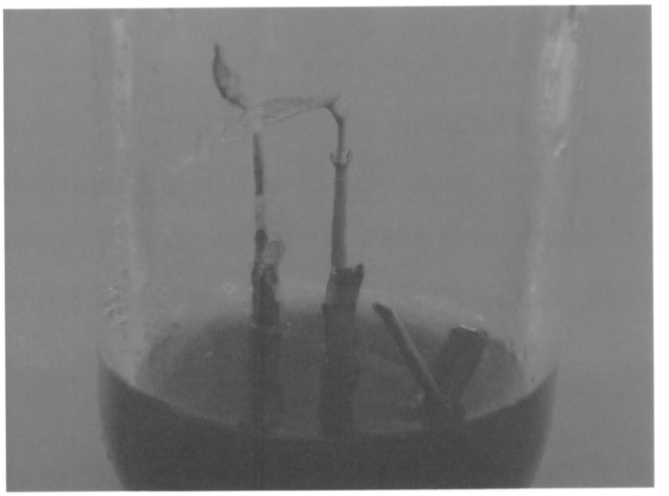
ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เป็นแคลลัสจากแกนคัพภะ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

อาหารชนิด	ระดับความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์แคลลัส
NAA	0	0
	5	0
	10	0
	15	0
2,4-D	0	0
	5	0
	10	0
	15	0
Dicamba	0	0
	5	0
	10	0*
	15	0*

* สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 2 แสดงการเจริญและเปลี่ยนแปลงของคัพภะจันทน์กะพ้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ก) คัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ข) คัพภะเมื่อเพาะปืนเวลา 2 เดือน และ (ค) คัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะต้นอ่อนจันทน์กะพ้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแกนคัพภะบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

4.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อนของจันทน์กะพ้อ (Callus initiation from young leaves)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนจันทน์กะพ้อบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล โดยเพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ส่วนของใบอ่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยการโค้งงอของใบ และตอบสนอง ต่ออาหารตั้งแต่เริ่มนำชิ้นส่วนของใบอ่อนวางลงบนอาหารจนกระทั่งเกิดแคลลัส ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อใบอ่อนของจันทน์กะพ้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล เป็นเวลา 2 เดือน

สัปดาห์ที่	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อใบอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส
2	-สำหรับใบอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก/ล และ 5 มก/ล จะไม่มีการตอบสนองต่ออาหารเลยใบอ่อนจะราบเรียบไปกับอาหารและใบอ่อนบนอาหารบนอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 10 มก/ล จะมีการตอบสนองต่ออาหารโดยมีการโค้งงอของใบแต่ไม่มีการแคลลัสเกิด (ภาพที่ 4)
4	- ใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี Dicamba 20 มก/ล จะมีลักษณะเต่งตึงบางแห่งมีรอยปริและเริ่มมีแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันหลวม ๆ สามารถหลุดได้ง่าย เรียกว่า soft หรือ friable callus เป็นตุ่มเล็ก ๆ ขึ้นตามรอยตัด มีสีน้ำตาลเหลืองในบางขวด บางขวดจะมีสีขาวอมเขียว ทำการย้ายชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสลงอาหารชนิดเดิม เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส
6	-ใบอ่อนบนอาหารบนอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 20 มก/ล จะมีการเพิ่มขึ้นของแคลลัส และแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น
8	- เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ 2 เดือนนำแคลลัสที่ได้ย้ายลงอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เพื่อการชักนำให้เกิดยอด แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้

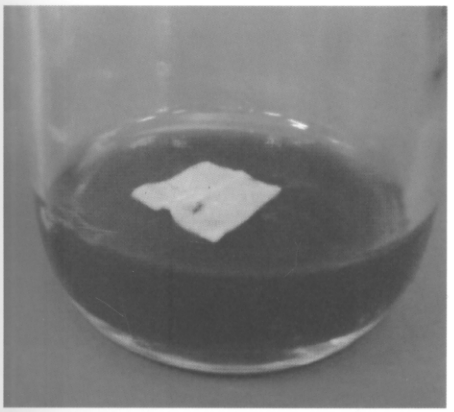
จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนของจันทน์กะพ้อบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 2 เดือนในที่มืด พบว่า Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 5 มก/ล ไม่มีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ส่วนDicamba ที่ระดับความเข้ม 10 มก/ล มีการตอบสนองต่ออาหารโดยการโค้งงอแต่ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น สำหรับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 20 มก/ล ใบอ่อนมีการโค้งงอและมีแคลลัสเกิดขึ้นซึ่งลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นลักษณะ Friable callus คือประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันหลวม ๆ สามารถหลุดได้ง่าย มีสีน้ำตาลเหลือง และเมื่อนำแคลลัสที่เกิดขึ้น เปลี่ยนถ่ายลงขวดใหม่ในอาหารสูตรเดิมพบว่าแคลลัสมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ภาพที่ 4) สำหรับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น15 และ 20 มก/ล จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 16 เปอร์เซ็นต์ และ 63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 2 เดือนนำแคลลัสที่ได้มาชั่งหาน้ำหนักสดของแคลลัส พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม Dicamba ที่ระดับความเข้มข้นของ 20 มก/ล เท่ากับ 0.4006 กรัม ซึ่งมากกว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส ที่ Dicamba ระดับความเข้มข้น 15 มก/ล (0.0469 กรัม) ($P<0.05$) (ตารางที่ 5) ซึ่งมีแนวโน้มว่าระดับความเข้มข้นของ Dicamba เพิ่มขึ้นน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

ตารางที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของใบอ่อนจันทน์กะพ้อและน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

ระดับความเข้มข้น Dicamba (มก/ล)	Parameter (%)*			น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส** (กรัม)
	แคลลัส	ปลอดเชื้อ	ปนเปื้อน	
0	0	97	3	0.00[b]
5	0	74	26	0.00[b]
10	0	70	30	0.00[b]
15	16	74	26	0.0469[b]
20	63	84	16	0.4006[a]

* จำนวนเพาะเลี้ยงทั้งหมด 30 ซ้ำการทดลอง

**ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test



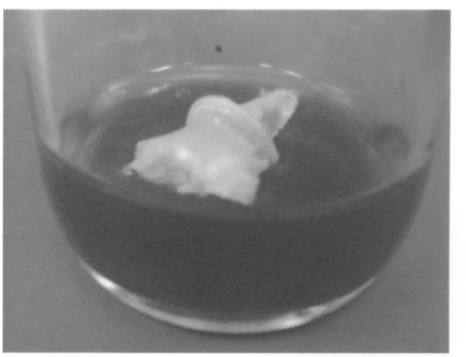
0 mg/l Dicamba

0 mg/l Dicamba

5 mg/l Dicamba

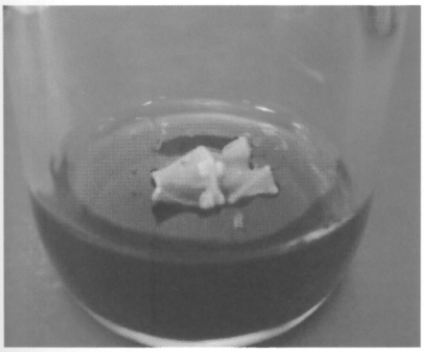
5 mg/l Dicamba

10 mg/l Dicamba

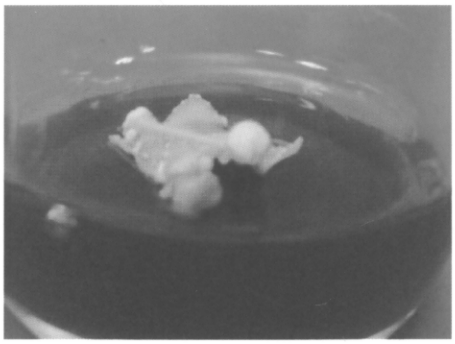


10 mg/l Dicamba

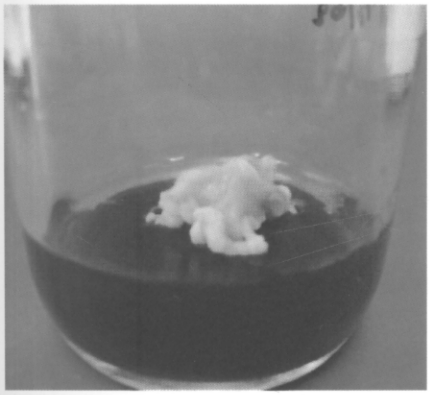
ภาพที่ 4 แสดงการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของจันทน์กะพ้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาเป็นเวลา 2 เดือน



15 mg/l Dicamba



15 mg/l Dicamba



20 mg/l Dicamba

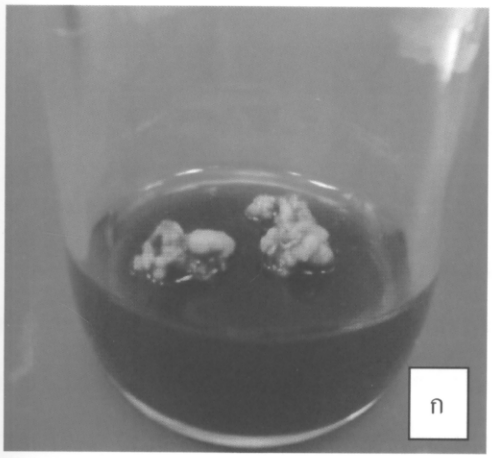
20 mg/l Dicamba

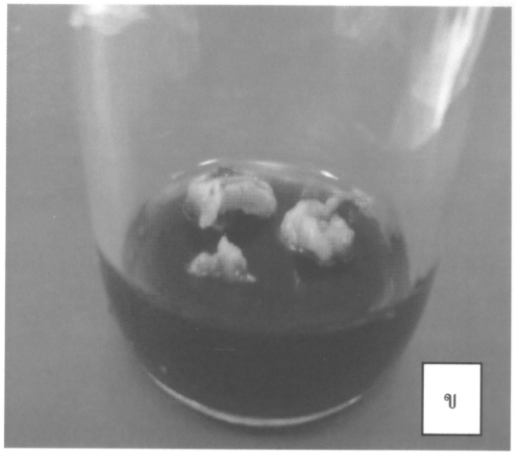
(ก) **(ข)**

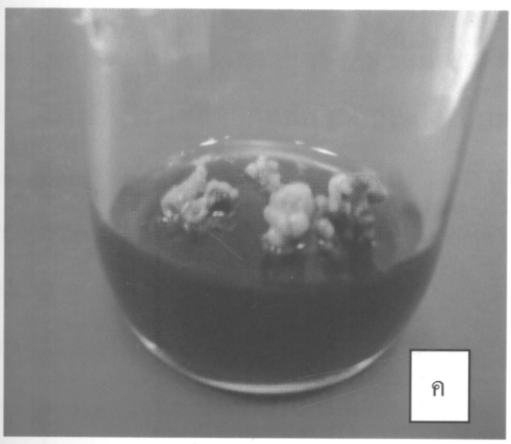
ภาพที่ 4 (ต่อ) แสดงการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของจันทน์กะพ้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาเป็นเวลา 2 เดือน

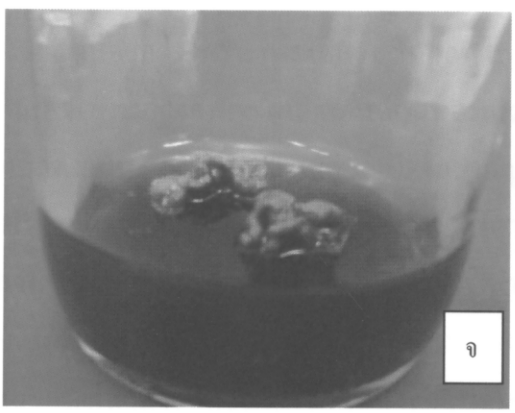
4.3 การชักนำให้เกิดยอด (Shoot induction)

เมื่อนำแคลลัสที่เจริญได้ดีที่สุดจากอาหาร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 20 มก/ล ย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 20 มก/ล เพื่อชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแคลลัสยังไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (ภาพที่ 5)









ภาพที่ 5 แสดงลักษณะของแคลลัสเมื่อย้ายลงอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (ก) BA ระดับความเข้มข้น 0 มก/ล (ข) BA ระดับความเข้มข้น 5 มก/ล (ค) BA ระดับความเข้มข้น 10 มก/ล (ง) BA ระดับความเข้มข้น 15 มก/ล และ (จ) BA ระดับความเข้มข้น 20 มก/ล

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้และเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการขยายพันธุ์จันทน์กะพ้อโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าเมื่อนำส่วนคัพภะของจันทน์กะพ้อมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของผงถ่าน 0.05 – 0.30 เปอร์เซ็นต์ คัพภะสามารถเจริญเป็นต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่มีผงถ่าน 0.10 – 0.15 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่ไม่มีผงถ่าน เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนาและตายไปในที่สุด และพบว่าเมื่อนำต้นกล้าที่ได้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ระดับความเข้มข้น 10-15 มก/ล หลังจากเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลาถึง 6 เดือน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น (2, 4-D และNAA) ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้และเกิดเป็นยอดทั้งหมด แสดงว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ คืออาหารสูตร MS ร่วมกับผงถ่าน 0.1เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเป็นต้นกล้า จากการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจันทน์กะพ้อโดยใช้ส่วนใบอ่อนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่มีระดับความเข้มข้นของ Dicamba 15 และ 20 มก/ล เป็นเวลา 2 เดือน ในที่มืด ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ จะเห็นได้ว่าการชักนำแคลลัสจากส่วนใบอ่อนของจันทน์กะพ้อดีกว่าการชักนำแคลลัสจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะเนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่า เพราะการใช้ส่วนต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อชักนำให้เกิดแคลลัส จะต้องเสียเวลาในการเพาะเลี้ยงคัพภะให้เกิดต้นอ่อนที่สมบูรณ์ประมาณ 3 เดือน และใช้เวลาในการชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 6 เดือน แสดงว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสของจันทน์กะพ้อนั้นได้แก่ ชิ้นส่วนใบอ่อน อาหารสูตร MS ที่มี Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 20 มก/ล ร่วมกับผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงในสภาวะมืด สำหรับจันทน์กะพ้อจะมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba เพียงอย่างเดียวซึ่งแตกต่างกับพืชชนิดอื่นในวงศ์เดียวกันที่สามารถตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นได้ (Vaario, 1996) เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Shorea curtisii* ซึ่งเป็นไม้เนื้อแข็งในวงศ์เดียวกับจันทน์กะพ้อโดยใช้ส่วนใบเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 5×10^{-6} โมลาร์ และ 2, 4 – D ระดับความเข้มข้น 8×10^{-7} โมลาร์ (Smits และ Struycken, 1983) ซึ่งความเข้มข้นของ Dicamba ที่เหมาะสมและส่งผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อนของจันทน์กะพ้ออยู่ระหว่าง 15 – 20

มก/ล ต่ำกว่า 15 มก/ล ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ในเวลา 2 เดือน แต่ที่ระดับความเข้มข้นของ Dicamba 20 มก/ล จะสามารถชักนำแคลลัสได้เร็วกว่าและมีขนาดแคลลัสที่ใหญ่กว่า เนื่องจากจันทน์กะพ้อมีการตอบสนองต่อ Dicamba ที่ระดับความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ที่น่าสนใจคือไม่ปรากฏพืชชนิดใดที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตสูงถึง 20 มก/ล และยังมีแนวโน้มว่าที่ระดับ Dicamba สูงกว่า 20 มก/ล ชิ้นส่วนจันทน์กะพ้ออาจจะมีการตอบสนองได้ดีกว่าด้วย แม้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตจะเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสก็ตาม ปัจจัยอื่น ๆ ก็มีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย ได้แก่

1. การวางขวดเพาะเลี้ยงไว้ในที่มืด เนื่องจากการเลี้ยงไว้ในที่มืดจะช่วยให้ชิ้นส่วนใบอ่อนเกิดการชักนำแคลลัสหรือยอดได้ หากเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนพืชในสภาวะแสงปกติ พืชจะใช้กระบวนการต่าง ๆ ในการสังเคราะห์แสงแทนการชักนำแคลลัสหรือยอด (สกุณา, 2550) และปล่อยสารกลุ่ม Phenolic compounds ออกมา ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืช

2. ชิ้นส่วนใบอ่อนจันทน์กะพ้อเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เพราะประหยัดเวลา และลดการสูญเสียเมล็ดที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนจากการทดลองได้ นอกจากนี้การฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนยังเป็นสิ่งสำคัญในการทดลองนี้เนื่องจากจันทน์กะพ้อเป็นพืชที่ใบอ่อนมีขนและยาง ในการทดลองจึงต้องใช้ คลอรอกซ์ความเข้มข้นถึง 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ยังพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เกิดขึ้น 21 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจจะเกิดมาจากใบอ่อนของจันทน์กะพ้อที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นลักษณะใบมีขน ทำให้โอกาสที่จะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดจากการฟอกฆ่าเชื้อมีมากกว่าใบอ่อนของไม้ชนิดอื่น ดังนั้นชิ้นส่วนตาข้างและตายอด ซึ่งเป็นตำแหน่งบริเวณซอกใบจึงไม่ถูกเลือกใช้ในการทดลองนี้ เพราะมีแนวโน้มการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าใบ และยังพบว่าบริเวณที่เกิดแคลลัส คือตามรอยตัดหรือรอยปริที่เกิดขึ้นบนใบอ่อน โดยทั่วไปแคลลัสจะเกิดขึ้นบริเวณที่เป็นรอยตัดของชิ้นส่วนใบอ่อนก่อนบริเวณอื่น ๆ เนื่องจากเหตุผลหลายประการคือ

1) บริเวณรอยตัดของใบมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่เป็นส่วนผสมอาหาร

2) บริเวณรอยตัดมีการแลกเปลี่ยนก๊าซ ได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน เนื่องจากสัมผัสอาหารเพาะเลี้ยงได้มากกว่า ซึ่งในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นสูงของ Dicamba มีผลต่อการชักนำแคลลัส

3) บริเวณรอยตัดจะสามารถรับสารอาหารได้โดยตรง

3. อาหารสูตร MS จะต้องมีการเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากจันทน์กะพ้อเป็นไม้เนื้อแข็งเมื่อนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในช่วงระยะเวลาหนึ่งก็จะพบว่าจันทน์กะพ้อจะมีการสร้างสาร

Phenolic compounds ขึ้น มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืช การเติมผงถ่านลงไปในอาหารจะสามารถแก้ไขปัญหาเหล่านี้ได้ เนื่องจากผงถ่านจะไปช่วยในการดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (บุญยืน, 2544)

สำหรับการชักนำให้เกิดยอดจาก แคลลัส ในอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่านร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล เป็นเวลา 1 เดือน ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยเนื้อเยื่อจะเริ่มมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และมีลักษณะแข็งเป็น compact callus เมื่อเลี้ยงไว้นานถึง 6 เดือน พบการเกิดรากจากชิ้นส่วนดังกล่าว ดังนั้นการตอบสนองของแคลลัสต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อนำไปสู่การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสจันทน์กะพ้อ

ข้อสังเกตของผู้วิจัย แนะนำว่าการใช้คัพภะชักนำให้เกิดต้นอ่อนแล้วนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อที่ได้มาชักนำให้เกิดแคลลัสไม่เหมาะสำหรับการใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะใช้เวลาในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนเป็นเวลานาน ควรนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนและนำใบอ่อนของจันทน์กะพ้อมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะนอกจากจะประหยัดเวลาและลดขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงแล้วยังจะสามารถลดการสูญเสียเมล็ดในธรรมชาติได้อีกด้วย

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดของจันทน์กะพ้อ โดยใช้ชิ้นส่วนคัพภะและใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่านร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า

1. สูตรอาหารที่สามารถชักนำต้นอ่อนได้ดีและเร็วที่สุด ในระยะเวลา 1 เดือน คือ อาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโตทุกชนิดไม่มีผลยับยั้งการเจริญของต้นอ่อนได้

2. เมื่อเพาะเลี้ยงคัพภะเป็นเวลา 3 เดือน คัพภะดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้

3. ชิ้นส่วนใบอ่อนจันทน์กะพ้อเหมาะสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้และเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงคัพภะ และไม่ทำให้สูญเสียเมล็ดในการทดลอง

4. ชิ้นส่วนใบอ่อนจันทน์กะพ้อก่อนทำการเพาะเลี้ยงต้องทำการล้างทำความสะอาดโดยการล้างผ่านน้ำก๊อก และแช่ทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน ล้างทำความสะอาดอีกครั้ง หลังจากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ Clorox ที่ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที

5. เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสพบว่า อาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 20 มก/ล มีน้ำหนักสดมากที่สุดเท่ากับ 0.4006 กรัม และมีแนวโน้มการตอบสนองที่ดีขึ้นหากเพิ่มระดับความเข้มข้นมากกว่า 20 มก/ล

6.การเพาะเลี้ยงใบอ่อนจันทน์กะพ้อต้องวางเพาะเลี้ยงไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

7.การชักนำแคลลัสให้เกิดยอดโดยการย้ายเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่มีการเติมผงถ่านและสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มก/ล เป็นเวลา 1 เดือน ยังไม่สามารถสามารถชักนำให้เกิดยอดได้

เอกสารอ้างอิง

จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้สักจากเมล็ดอ่อน. ในรายงานการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา ครั้งที่ 8 เทคโนโลยีวนวัฒนเพื่อขจัดความยากจน กลุ่ม งานวนวัฒนวิจัย สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ. หน้า 55 - 63.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง กษิดิศ ดิษฐบรรจง ภุมรินทร์ วนิชชนานันท์ อรรัตน์ วงศ์ศรี และอรุณี ใจเถิง. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช. กรุงเทพฯ. หน้า 268 – 275.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: หจก. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

ปัญจรัตน์ จินตนา และพนิดา รุ่งรัตนกุล. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์พันธุ์ไม้ *Eucalyptus urophylla*. รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ส่วนวนวัฒนวิจัย สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า 193 - 201.

ปัญจรัตน์ จินตนา ไพโรจน์ ชัยเลิศพงษา และประสิทธิ์ เพียรอนุรักษ์. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ชิงชัน. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 300 - 306.

ยุพา มงคลสุข รุ่งอรุณ สุ่มแก้ว ปฏิมา ลิขิตธรรมนิตย์ พนิดา วงษ์แหวน และ วิลาสินี กวีกิจธรรกุล. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกฤษณา (*Aquilaria crassna*). ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาพืช. กรุงเทพฯ. หน้า 532 – 538.

สกุณา สิทธิชัยรุ่งโรจน์. 2550. การศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดโกสน. โครงงานนักศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1 - 29.

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2542. พรรณไม้ต้นของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: บริษัทไดมอนด์ พริ้นติ้ง จำกัด.

Du, N. and Pijut, M. P. 2008. Regeneration of plants from *Fraxinus pennsylvanica* hypocotyls and cotyledons. Sci. Hortic. 118: 74–79.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50: 151 – 158.

Ishii, K., Sutedjo and Suzuki, S. 1989. Tissue culture of Dipterocarpaceae in Indonesia (I). Screening of sterilization of explants and initial culture. Pages 505 – 506 of: Trans Meet. of Jpn. For. Soc. (Injapanese)

Khamparat, S., Swasdipan, N., Palasarn, W., Rodrangboon, P. and Pimmongkol, A. 2005. Callus formation of Makjong (*Scaphium macropodum* Beuam.) via immature seed culture. 31st Congress on Sci. Technol. Suranaree University of Technology, pp18 – 20.

Kinghorn, A. D. 2000. Plant secondary metabolites as potential anticancer agents and cancer chemopreventives. Molecules. 5: 285-288.

Kinghorn, A. D, Pan, L., Fletcher, J. N and Chai, H. 2011. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. J Nat Prod. Dx.doi.org/10.1021/np200391c.

Lining, I. M. 1991. *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. Plant cell Tiss. Org. Cult 27: 81-88.

Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30, 421–427 (Publ. 1981).

Lucas, G. and Synge, H. 1978. The IUCN Plant Red Data Book. Surrey : Unwin Brothrers Limited.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Pl. 15: 473 - 497.

Pooma, R. 2002. Further notes on Thai Dipterocarpaceae. Thai For Bull. (Bot). 30: 7-27.

Rathore, J. S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M. and Dagla H. R. 2004. Plant Biotechnology and Molecular Markers. 195 - 205.

Scott, E. S., Rao, A. N. and Loh, C.S. 1995. Preliminary studies of micropropagation of *Hopea odorata*, a dipterocarp tree. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 41: 193 - 196.

Scott, E. S., Rao, A. N. and Loh, C.S. 1998. Production of Plantlets of Shorea roxburghii G. Don. from Embryonic Axes Cultured *In Vitro*. Ann. Bot. 61: 233 - 236.

Seo, E. K., Chai, H., Constant, L.H., Santisuk, T., Reutrakul, V., Beecher, W. W. C., Farnworth, R. N., Cordell A. G., Pezzuto, M.J. and Kinghorn D. A. 1999. Resveratrol Tetramers From *Vatica diospyroides*. J. Org. Chem. 64: 6976 - 6983.

Shirin, F., Rana P.K. and Mandal, A.K. 2005. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. J. Forest Res. 10: 465 – 469.

Smitinand, T. 1966. The distribution of the Dipterocarpaceae in Thailand. XIth Pacific Science Congress, Tokyo. 67-76 p.

Smits, W.T.H. and Struychen, B. 1983. Some preliminary results of experiments with *in vitro* culture of dipterocarps. Neth. J. Agric. Sci. 31: 233 – 238.

Te-chato, S., Hilae, A. and Yeedum, I. 2004. Induction of embryogenic callus and plantlet regeneration from young leaves of high yielding mature oil plam. Songklanakarin J.Sci. Technol. 26 (5): 617-628.

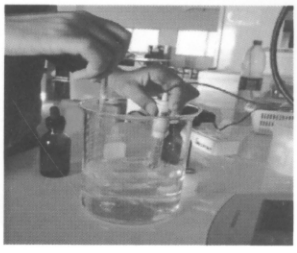
Vaario, L.M. 1996. Establishment of Advanced Tissue Culture Techniques in *Betula platyphylla* var. *japonica* and in Dipterocarpaceae Species. Bull. Tokyo Univ. For. 96: 51 – 118.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) สูตร MS

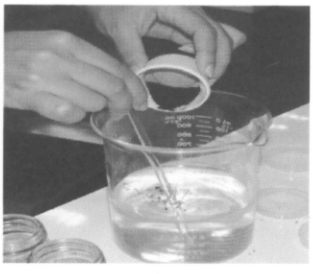
องค์ประกอบ	ความเข้มข้น		ปริมาตรที่ใช้ (มล/ล)
	อาหาร (มก/ล)	สารละลายเข้มข้น	
1. **Macronutrients**		กรัม/1000 (10x)	100
NH_4NO_3	1,650	16.5	
KNO_3	1,900	19.0	
$CaCl_2.2H_2O$	440	4.4	
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.7	
KH_2PO_4	170	1.7	
2. Micronutrients		มิลลิกรัม/100 (100x)	1
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	2230	
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6	860	
H_3BO_3	6.2	620	
KI	0.83	83	
$Na_2MO_4.2H_2O$	0.25	25	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5	
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5	
3. Vitamins		กรัม/100 (100x)	1
Glycine	2	0.2	
Thiamine HCl	0.1	0.01	
Nicotinic acid	0.5	0.05	
Pyridoxine HCl	0.1	0.01	
4. Iron		กรัม/1000 (100x)	10
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25	3.73	
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	2.785	
5. Myo - inositol			100 มิลลิกรัม/ลิตร
6. Sucrose			30 กรัม/ลิตร
7. Activated charcoal			1 กรัม/ลิตร
8. Phytagel			2.4 กรัม/ลิตร

1. การเตรียมอาหารสูตร MS



2. ปรับ pH

3. ละลาย Phytagel

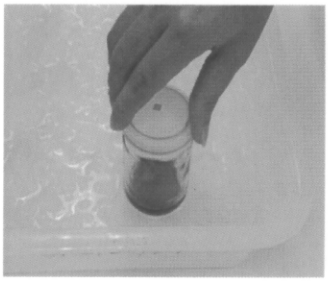


4. เติมผงถ่าน และคนให้เข้ากัน

5. เติมใส่ขวดเพาะเลี้ยง 20 มล.

6. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อความดันไอ

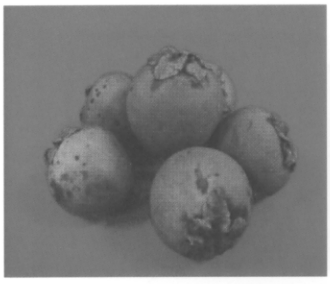
7. ปิดฝาขวดให้แน่น



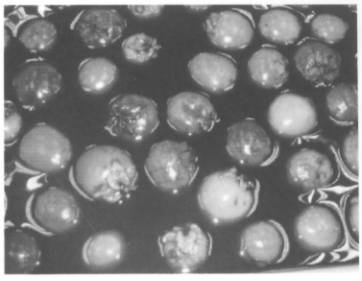
8. แกว่งในน้ำแข็ง

หมายเหตุ : เก็บไว้ 3 วันก่อนนำมาใช้เพาะเลี้ยง

ภาพภาคผนวกที่ 1 ภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS

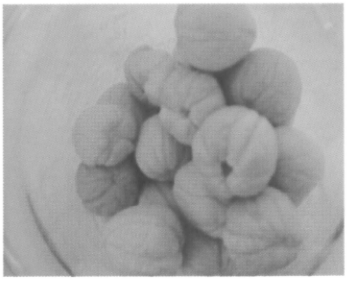


1. ล้างทำความสะอาดเมล็ด



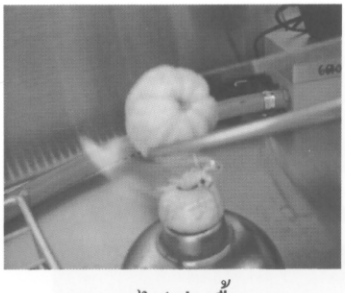
2. แช่ด่างทับทิม 10 นาที

3. ซับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ให้แห้ง

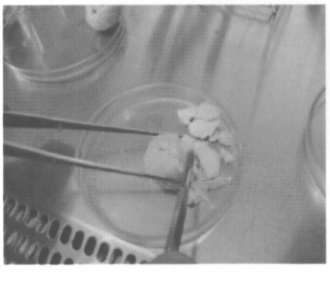


4. แกะเปลือกออกจะได้เมล็ดสีขาว นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ

5. จุ่มแอลกอฮอล์



6. ลนไฟฆ่าเชื้อ



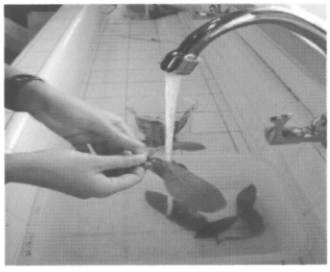
7. แกะเอาส่วนคัพภะ

8. วางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 0.1%AC

ภาพภาคผนวกที่ 2 ภาพแสดงขั้นตอน การเพาะเลี้ยงคัพภะจันทน์กะพ้อ

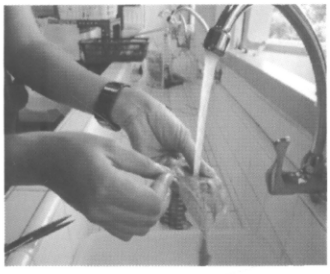
1. ต้นกล้าจันทน์กะพ้อ

2. เก็บตัวอย่างใบอ่อนจันทน์กะพ้อ

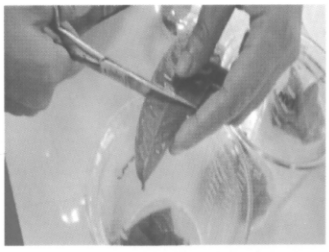


3. ล้างผ่านน้ำก๊อก

4. แช่ทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน

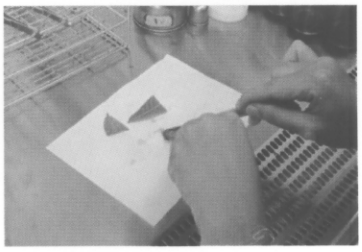


5. ล้างทำความสะอาดอีกครั้ง



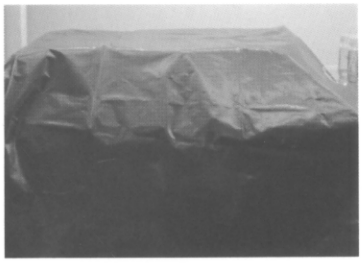
6. ตัดแยกก่อนเข้าตู้ปลอดเชื้อ

7. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์



8. ตัดแต่งชิ้นส่วน

9. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS +Dicamba ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 20 มก/ล



10. วางเลี้ยงในที่มืด

ภาพภาคผนวกที่ 3 ภาพแสดงขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อนจันทน์กะพ้อ