วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.1) January – April 2021 บทความวิจัย

การขยายพันธุ์จันทน์ผาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

Micropropagation of *Dracaena loureiroi* Gagnep.

ธงชัย ศรีตะปัญญะ[1*] และ กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์[2]

Thongchai Sritapunya[1*] and Kittisak Chotikadachanarong[2]

[1] *ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่*

[2] *ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่*

[1] *Science center, Faculty of Science and technology,* Chiang Mai Rajabhat University

[2] *Center of excellence in Plant Biotechnology, Faculty of Science and technology,* Chiang Mai Rajabhat University

Received : 16 October 2019

Revised : 16 November 2019

Accepted : 22 April 2020

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์จันทน์ผาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช ผลของการผ่าเมล็ดต่อการงอกของเมล็ดและสัดส่วนของอาหารที่ช่วยขยายพันธุ์พืช ในการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม โดยนำเมล็ดจันทน์ผามาฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น Murashige and Skoog (1962) (MS) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 10 เปอร์เซ็นต์ 10 นาทีมีประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นศึกษาผลของการผ่าเมล็ดต่อการงอกของเมล็ด โดยนำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที ชุดทดลองทำการผ่าเมล็ด และชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่าเมล็ด ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดจันทน์ผาแบบผ่าเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกถึง 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำยอดจันทน์ผาที่ปลอดเชื้อไปศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 6-Benzyladenine (BA) ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด จากนั้นนำยอดย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมด้วย Indoleacetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าการย้ายต้นอ่อนออกปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิต 56.25%

คำสำคัญ : จันทน์ผา ; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ; การฟอกฆ่าเชื้อ

Abstract

Tissue culture technique was introduced for *Dracaena loureiroi* Gagnep. micropropagation. The objectives of this study were to investigate the seed sterilization method, the effect of cutting on seed germination and ratios of culture medium that gave high shooting proliferation and survival rate. For the seed sterilization, seeds were sterilized with a bleach solution in the concentration of 5, 10 and 15% for 5, 10 and 15 minutes, respectively, followed by washing with sterile distilled water for 3 times before culturing on Murashige and Skoog (MS) medium for 4 weeks. It was found that the best sterilization method was at 10% bleach solution for 10 minutes and showed 90% aseptic explants. After that the seeds were cut and set as the experimental treatment, while controls were uncut before culturing on MS medium for 4 weeks according to the investigation of the effect of seed cutting on seed germination. The cut seed germination percentage was up to 70%. Then, the ratios of culture medium that gave high shooting proliferation and survival rate was studied. The seeds were cultured on MS media containing 0, 1, 2, 3 and 4 mg/L of 6-benzyladenine (BA). It was found that a 3 mg/L BA in MS media was able to induce the highest shooting number. After subculturing on MS media supplemented with 0, 1, 2, 3 and 4 mg/L of Indoeacetic acid (IAA), 3 and 4 mg/L IAA in MS media was able to induce the highest root number. Moreover, the transplant survival rate in the greenhouse for 4 weeks was 56.25%.

Keywords : micropropagation , *Dracaena loureiroi* Gagnep., sterilization

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

บทนำ

ปัจจุบันมีพันธุ์พืชหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปเนื่องจากการบุกรุกทำลายพื้นที่ป่าจากมนุษย์ ประกอบกับสภาวะแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและผิดปกติทำให้พันธุ์พืชหลายชนิดสูญพันธุ์ ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่จะช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมพืชที่หายากและใกล้สูญพันธุ์เอาไว้ให้คงอยู่ ไม่ว่าจะเป็นการนำชิ้นส่วนของพืชที่มีเนื้อเยื่อเจริญอยู่หรือเมล็ดที่ในธรรมชาติงอกได้ยากมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่ปลอดเชื้อ จนได้ต้นพันธุ์ที่แข็งแรงและปลอดโรคสามารถนำกลับไปปลูกคืนสู่ป่าธรรมชาติได้ ซึ่งต้นจันทน์ผาเป็นไม้ป่าประเภทหนึ่งที่ใกล้สูญพันธุ์เกิดขึ้นในธรรมชาติได้น้อยและมีแนวโน้มใกล้จะสูญพันธุ์ นอกจากจะเป็นไม้ประดับแล้วต้นจันทน์ผายังมีสรรพคุณเป็นยารักษากลุ่มอาการทางระบบไหลเวียนโลหิตในตำรับยาหอมเทพพิจิตรและตำรับยาหอมนวโกฐ และยาแก้ไข้ตำรับยาจันทน์ลีลา จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของจันทน์ผาพบว่ามีสาร loureiriol, 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)-4-chromanone, 4,4'-dihydroxy- 2,6- dimethoxydihydrochalcone, 2,4'- dihydroxy- 4,6- dimethoxydihydrochalcone, 4'- hydroxy- 2,4,6-trimethoxydihydrochalcone, 4,6,4'-trihydroxy-2-methoxydihydrochalcone, 4,3',5'-trihydroxystilbene, 4,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene และ 4-hydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (Likhitwitayawuid *et al.*, 2002) ในธรรมชาติเมล็ดของจันทน์ผาจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ค่อนข้างต่ำมากด้วยเหตุนี้จึงทำให้พืชชนิดนี้มีการขยายพันธุ์โดยธรรมชาติที่ยาก เกษตรกรจะทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการการเพาะเมล็ด และปักชำเป็นส่วนใหญ่ แต่เนื่องจากพืชชนิดนี้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และการปักชำถูกจำกัดโดยจำนวนของต้นพันธุ์ อีกทั้งต้องใช้เวลานานและมีโอกาสที่พืชจะติดเชื้อในเนื้อเยื่อ เป็นเหตุให้เกษตรกรไม่สามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ดีได้เพียงพอต่อความต้องการในปริมาณมาก ๆ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการขยายพันธุ์จันทน์ผาให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นและได้ต้นพันธุ์ที่แข็งแรงปราศจากโรค เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดอุตสาหกรรมในอนาคตต่อไป อีกทั้งยังเป็นการแก้ปัญหาอัตราการงอกของเมล็ดต่ำของต้นจันทน์ผาชนิดที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชตามแนวโครงการอันเนื่องมากจากพระราชดำริ สามารถผลิตต้นจันทน์ผาได้จำนวนมาก ในระยะเวลาสั้นเพื่อคืนสู่ป่าธรรมชาติหรือใช้เป็นไม้ประดับตกแต่งสวน และเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ในธรรมชาติด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพืชตัวอย่าง

เก็บเมล็ดจันทน์ผาจากต้นที่ปลูกใน ตำบลเมืองพาน อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำผสมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยด และคัดเลือกเมล็ดจันทน์ผาที่สมบูรณ์โดยเลือกเมล็ดจันทน์ผาที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการทดลอง

การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดจันทน์ผา

นำเมล็ดจันทน์ผาที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วห่อด้วยผ้าขาวบางห่อ ห่อละ 10 เมล็ด จำนวน 9 ห่อ หลังจากนั้นเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นทำการฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที รวม 9 ชุดการทดลอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวด ขวดละ 5 นาที นำตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาที่ทำการทดลองฟอกฆ่าเชื้อแต่ละความเข้มข้นที่เวลาต่าง ๆ เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000 – 3,000 ลักซ์ บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของการผ่าเมล็ดต่อการงอกของเมล็ดจันทน์ผาในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดจันทน์ผาที่ทำความสะอาดเรียบร้อยมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ดีที่สุดจากการทดลองแรก หลังจากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดควบคุมคือเมล็ดจันทน์ผาปกติที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว และชุดทดลองคือการผ่าครึ่งเมล็ดตามแนวยาวแล้วนำส่วนของเอ็มบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000 - 3,000 ลักซ์ บันทึกผลการการงอกของเมล็ดจันทน์ผาทั้ง 2 ชุดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำยอดของเนื้อเยื่อจันทน์ผา

นำต้นจันทน์ผาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตัดตามขวางของลำต้นให้ได้ความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร นับจากบริเวณโคนต้นขึ้นมาประมาณ 3 ชิ้นต่อต้น แล้วนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้มาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962) ที่เติม 6-Benzyladenine (BA) เพื่อชักนำให้เกิดยอดที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรความเข้มข้นละ 20 ขวดแล้วนำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000 - 3,000 ลักซ์ บันทึกผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงการงอกยอดของต้นจันทน์ผาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของ IAA ต่อการชักนำรากจากยอดจันทน์ผา

นำยอดของต้นจันทน์ผาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม Indoleacetic acid (IAA) ความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 20 ขวด เพื่อชักนำให้เกิดราก นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000 - 3,000 ลักซ์ บันทึกผลการเกิดราก จำนวนรากและความยาวรากของยอดจันทน์ผาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การย้ายต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกปลูกในโรงเรือน

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีรากแล้วมาทำการคลายเกลียวฝาขวดทิ้งไว้ 1 วัน และเปิดฝาขวดทิ้งไว้อีก 1 วัน ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำต้นอ่อนออกมาล้างวุ้นออกจากรากจนหมด แล้วปลูกในกาบมะพร้าวแช่น้ำไว้แล้วเป็นเวลา 1 คืน นำใส่ถุงพลาสติกใส มัดปากถุงเพื่อป้องกันการคายน้ำของพืช นำไปไว้ในโรงเรือนที่มีการพลางแสง 50% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงทำการเปิดปากถุงวันละ 1 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เพื่อลดความชื้นในถุง จนครบ 1

สัปดาห์ จึงนำถุงพลาสติกออก แล้วย้ายต้นอ่อนลงปลูกใน ดิน ผสม ขี้เถ้าแกลบ และกาบมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 นำไปอนุบาลในโรงเรือนที่พลางแสน 50% รดน้ำวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการอดชีวิต

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomize design) โดยแสดงผลการทดลองเป็นร้อยละ และค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

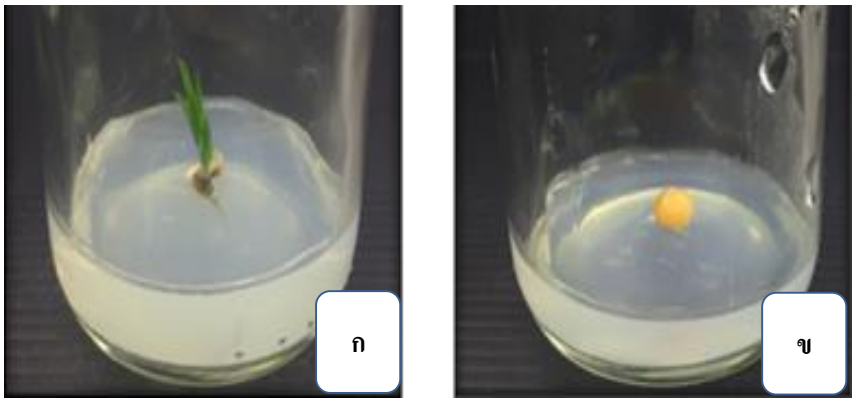
การศึกษาผลความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ และระยะในการฆ่าเชื้อต่อเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อของเมล็ดจันทน์ผา โดยใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นทำการฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที รวม 9 ชุดการทดลอง แล้วนำเมล็ดไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 และ 15 นาที เมล็ดจะมีอัตราการปลอดเชื้อสูงที่สุด คือ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้นสูง และระยะเวลานาน จะมีผลให้เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อของเมล็ดเพิ่มมากขึ้น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อในการใช้ความเข้มข้นของน้ำยาฟอกผ้าขาวที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นน้ำยาฟอกผ้าขาว	เวลา(นาที)	อัตราการปลอดเชื้อ (%)
5%	5	50
	10	60
	15	70
10%	5	60
	10	90
	15	90
15%	5	80
	10	90
	15	90

การศึกษาผลของการผ่าเมล็ดต่อการงอกของเมล็ดจันทน์ผาในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเมล็ดจันทน์ผาที่มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ดีที่สุดจากการทดลองแรก ได้แก่ น้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาทีหลังจากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดควบคุมคือเมล็ดจันทน์ผาที่ไม่ได้ผ่า และชุดทดลองคือนำเมล็ดมาผ่าตามแนวยาวของเอ็มบริโอ นำส่วนของเอ็มบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดที่ไม่ได้ผ่าไม่เกิด

การงอกในขณะที่เมล็ดซึ่งได้ผ่าแยกเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นอ่อนที่งอกออกมาจากเอ็มบริโอมีลักษณะดังภาพที่ 1 คือมียอด และใบสีเขียวเข้ม อีกทั้งมีรากแก้วงอกออกมา



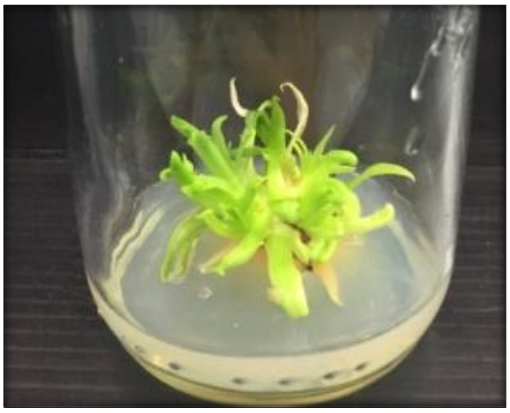
ภาพที่ 1 การงอกของต้นจันทน์ผาที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก)แบบผ่าเมล็ด (ข) แบบไม่ผ่าเมล็ด

การศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนลำต้นของจันทน์ผาโดยนำต้นอ่อนจันทน์ในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองก่อนหน้ามาตัดตามขวางของลำต้นให้ได้ความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร นับจากบริเวณโคนต้นขึ้นมาประมาณ 3 ชิ้นต่อต้น แล้วนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.56 cm เท่ากัน ซึ่งทั้ง 2 ความเข้มข้นมีความสูงยอดเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และนอกจากนี้ยังพบว่า BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.51 ยอด ดังตารางที่ 2 โดยยอดมีลักษณะเป็นกระจุกเกิดจากตาเดียวกัน ปลายยอดสีเขียวเข้ม โคนสีเขียวอ่อน ดังภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของ BA ต่อความสูงเฉลี่ย (cm±SD) และจำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด±SD) ของเนื้อเยื่อจันทน์ผาภายหลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	**ความสูงเฉลี่ย** (cm±sd)	**จำนวนยอดเฉลี่ย** (cm±sd)
BA 0 mg./L.	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}
BA 1 mg./L.	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}
BA 2 mg./L.	0.02±0.07 ^{b}	0.15±0.49 ^{b}
BA 3 mg./L.	0.55±0.10 ^{a}	2.55±1.04 ^{a}
BA 4 mg./L.	0.56±0.13 ^{a}	2.38±0.77 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



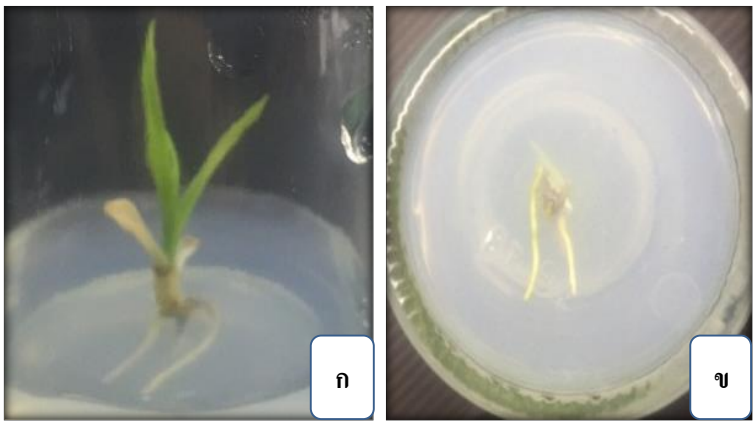
ภาพที่ 2 ยอดต้นจันทน์ผาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของ IAA ต่อการชักนำรากของเนื้อเยื่อจันทน์ผาโดยนำยอดของต้นจันทน์ผาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า IAA ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้จำนวนมากที่สุด คือ 0.67 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เท่ากัน และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นอกจากนี้ยังพบว่า IAA ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังสามารถชักนำให้รากมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.37 และ 0.34 cm ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุด คือ 66.66 % แสดงดังภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของ IAA ต่อความยาวรากเฉลี่ย (cm±SD) จำนวนรากเฉลี่ย (ราก±SD) และร้อยละการเกิดราก ของเนื้อเยื่อจันทน์ผาภายหลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

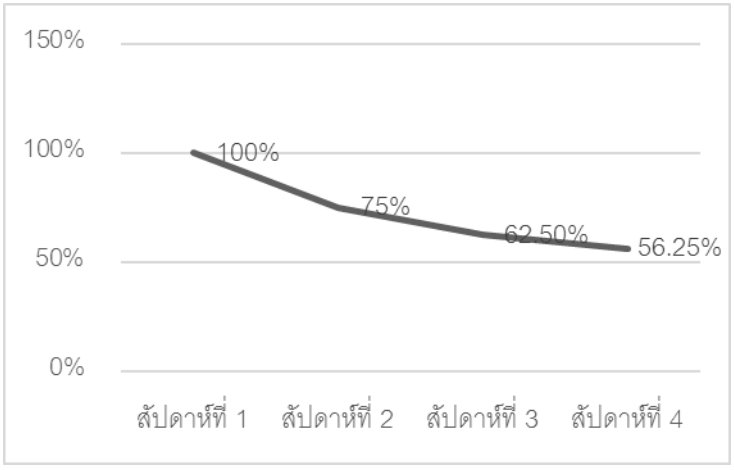
ชุดการทดลอง	ความยาวราก (cm.)	จำนวนราก	ร้อยละการเกิดราก
IAA 0 mg/L	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00
IAA 1 mg/L	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00
IAA 2 mg/L	0.16±0.17^{b}	0.55±0.51^{b}	55.00
IAA 3 mg/L	0.37±0.28^{a}	0.67±0.49^{a}	66.66
IAA 4 mg/L	0.34±0.27^{a}	0.67±0.49^{a}	63.15

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 3 ลักษณะของรากต้นจันทน์ผาที่ทำการทดลองเพิ่มจำนวนรากด้วย Indoleacetic acid (IAA)

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตต้นจันทน์ผาภายหลังการย้ายออกปลูกในโรงเรือนโดยนำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 44สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนจะลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิต 56.25% ดังภาพที่ 4 และต้นอ่อนภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าใบสามารถสร้าง wax ขึ้นมาปกคลุมเพื่อลดการคายน้ำได้ และใบยืดยาวออก ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนจันทน์ผาภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์

ภาพที่ 5 ต้นจันทน์ผาก่อนออกปลูกและภายหลังการย้ายออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

วิจารณ์ผลวิจัย

การฆ่าเชื้อเมล็ดจันทน์ผาด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ที่มีสารออกฤทธิ์ คือ Sodium hypochlorite ที่มี available Chlorine 6% w/w โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 และ 15 นาที เมล็ดจะมีอัตราการปลอดเชื้อสูงที่สุด คือ 90 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้นสูง และระยะเวลานาน จะมีผลให้อัตราการปลอดเชื้อของเมล็ดเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเมล็ดจันทน์ผามีเปลือกหุ้มเมล็ดหนา จนสามารถทนการกัดทำลายของน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อได้ดี เช่นเดียวกับรายงานการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดของไผ่กวนอิมด่าง (*Dracaena sanderiana* Sander ex Mast) ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับจันทน์ผาโดยใช้ Clorox ที่มีสารออกฤทธิ์ คือ Sodium hypochlorite (available Chlorine 4.5% w/w) โดยใช้ Clorox ความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 10, 15 และ 20 นาที พบว่าการใช้ Clorox ความเข้มข้นสูง และระยะเวลาในการฟอกนาน ๆ คือ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที สามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื้อเยื่อทั้งหมดเกิดอาการช้ำเนื่องจากถูกน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อกัดทำลาย (Kakuei & Salehi, 2015) ดังนั้นการใช้เมล็ดจะสามารถฟอกฆ่าเชื้อได้ง่ายกว่า และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดจันทน์ผาทั้งเมล็ดนั้นไม่สามารถเกิดการงอกได้ ในขณะที่การผ่าแยกส่วนของเอ็มบริโอออกมาเพาะเลี้ยงจะทำให้เกิดการงอกได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการนำเปลือกหุ้มเมล็ดออกจะเป็นการทำลายระยะพักตัวของเมล็ดพืช เช่นเดียวกับต้นมะม่วงหิมพานต์การเพาะเลี้ยงด้วยเมล็ด นั้นจะต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1นาที แล้วแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ 7 % 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 72 ชั่วโมง แล้วแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกเพื่อเร่งการงอกของเมล็ดให้เร็วขึ้น (B.T. Jean-Immocent nanti *et al*., 2018)

การศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนลำต้นของจันทน์ผา พบว่า BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดเฉลี่ยมากที่สุด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA จาก 1 ถึง 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดจะเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรจะพบว่าจำนวนยอดลดน้อยลง เนื่องจากการใช้

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมากเกินไป โดยทำให้อวัยวะของพืชมีการเติบโตที่ไม่สัมพันธ์กัน เช่น แบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นแต่เซลล์ไม่ขยายขนาด อวัยวะบิดเบี้ยวเสียรูปทรง การเจริญของพืชลดลง และหยุดไปในที่สุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Aslam *et al.* (2013) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสของไผ่กวนอิมด่าง (*Dracaena sanderiana* Sander ex Mast) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับจันทน์ผา บนอาหารวุ้นที่เติม BA ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.00 - 8.96 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 7.84 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 5.7 ยอด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 8.96 ไมโครโมลาร์ จำนวนยอดจะลดลงเหลือเพียง 5.0 ยอด

การศึกษาผลของ IAA ต่อการชักนำรากของเนื้อเยื่อจันทน์ผาโดยนำยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า IAA ความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากได้จำนวนมากที่สุด คือ 0.67 รากต่อชิ้นยอด และมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.37 และ 0.34 cm ตามลำดับ เนื่องจากจันทน์ผาเป็นไม้ที่พบในธรรมชาติขึ้นสภาพที่แห้งแล้ง เช่นตามภูเขาหินปูน ป่าหินทราย หรือชายทะเลซึ่งพื้นที่เหล่านี้มีน้ำและอาหารจำนวนน้อยจึงทำให้ต้นจันทน์ผาต้องสร้างรากที่แข็งแรงโดยใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินปริมาณมากกว่าพืชชนิดอื่นแต่เมื่อมีปริมาณออกซินมากเกินฮอร์โมนกลุ่มออกซินซึ่งมีคุณสมบัติยับการเจริญของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aslam *et al.* (2013) ที่รายงานว่าการนำยอดในสภาพปลอดเชื้อของไผ่กวนอิมด่าง (*Dracaena sanderiana* Sander ex Mast) ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 11.41 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากกว่าถึง 8.3 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนยอดดังกล่าวได้มาจากกระบวนการ indirect organogenesis จึงมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังรายงานว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin ชนิดอื่น ได้แก่ indolebutyric acid (IBA) ความเข้มข้น 7.78 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยได้มากถึง 12.0 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เนื่องจากภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ IAA ในอาหารจะสลายตัวถึง 40% ในขณะที่ IBA สลายตัวเพียง 20% ดังนั้น IBA จึงสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากกว่า (Nissen & Sutter, 1990)

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายต้นอ่อนออกปลูกในโรงเรือนโดยนำต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงได้จากอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนจะลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิต 56.25% ต่างจากงานวิจัยของ Liu *et al.* (2010) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นไผ่ฟิลิปปินส์ด่าง (*Dracaena surculosa*) แล้วทำการย้ายออกปลูกในโรงเรือนพบว่ามีอัตราการรอดถึง 100% ทั้งนี้เนื่องจากต้นอ่อนจันทน์ที่ได้จากการวิจัยนี้มีจำนวนรากที่น้อยและสั้นทำให้กระบวนการขนส่งสารอาหารและน้ำไปเลี้ยงในส่วนของลำต้นและใบมีจำนวนที่น้อยตามไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของต้นจันทน์ผาทำให้อัตราการรอดชีวิตอัตราของต้นอ่อนจันทน์ผาภายหลังการย้ายออกปลูกที่เวลา 4 สัปดาห์เหลือเพียงร้อยละ 56.25 และในการทดลองควรเพิ่มเวลาหรือปรับเปลี่ยนชนิดของฮอร์โมนในการเร่งรากเพื่อให้ต้นจันทน์ผาเกิดรากที่ยาวแข็งแรงและมีจำนวนมากขึ้น

สรุปผลการวิจัย

การขยายพันธุ์จันทน์ผาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำได้โดยการนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกผ้าขาวเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที แล้วผ่าแยกส่วนเอ็มบริโอมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น

3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด จากนั้นนำยอดที่ได้ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม IAA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก และเมื่อทำการย้ายต้นอ่อนออกปลูกในโรงเรือนพบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 56.25% ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการขยายพันธุ์ต้นที่ปลอดโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัย จากกองทุนมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ประจำปีประมาณ 2560 และขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่สนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Aalam, J., Mujib, A. & Sharma, M. P. (2013). *In vitro* micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sabder ex Mast: An important indoor ornamental plant. *Journal of Biological Science*, *20*, 63-68.

B.T. Jean-Immocent nanti , B. A. Soumahoro, Y. G. Gnamien, T. Kone, N. Silue, K. E. Djaha, K. L. Kouakou, M. Kone. (2018). Invotro seed Geminaton and seedling growth of cashew (*Anacardium Occidentalel*). *Agronomie Africaine* ,*30* (3), 271-278.

Kakuei, F. & Salehi, H. (2015). Factors affecting *in vitro* propagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast. cultivars. I. Sterilization, explant browning, and shoot proliferation. *Adv. Hort. Sci*., *29*(4), 159-164.

Likhitayawuid, K., Sawasdee, K. & Kirtikara, K. (2002). Flavonoids and stilbenoids with COX-1 and COX-2 inhibitory acticity from *Dracaena loureiri*. Planta Medica, *68*(9), 841-843.

Liu, J., Deng, M., Henny, R. J. & Chen, J. (2010). Regeneration of *Dracaena surculosa* through indirect shoot organogenesis. *HortScience*, *45*(8), 1250-1254.

Nissen, S. J. & Sutter, E. G. (1990). Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortScience*, *25*(7), 800-802.

Siril, E. A. & Dhar, U. (1997). Micropropagation of mature Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum* Roxb.). *Plant Cell Rep*., *16*, 637-640.

Sujatha, M. & Dhingra, M. (1993). Rapid plant regeneration from various explants of *Jetropha integerrima*. *Plant Cel Tissue Cult., 35*, 293-296.