



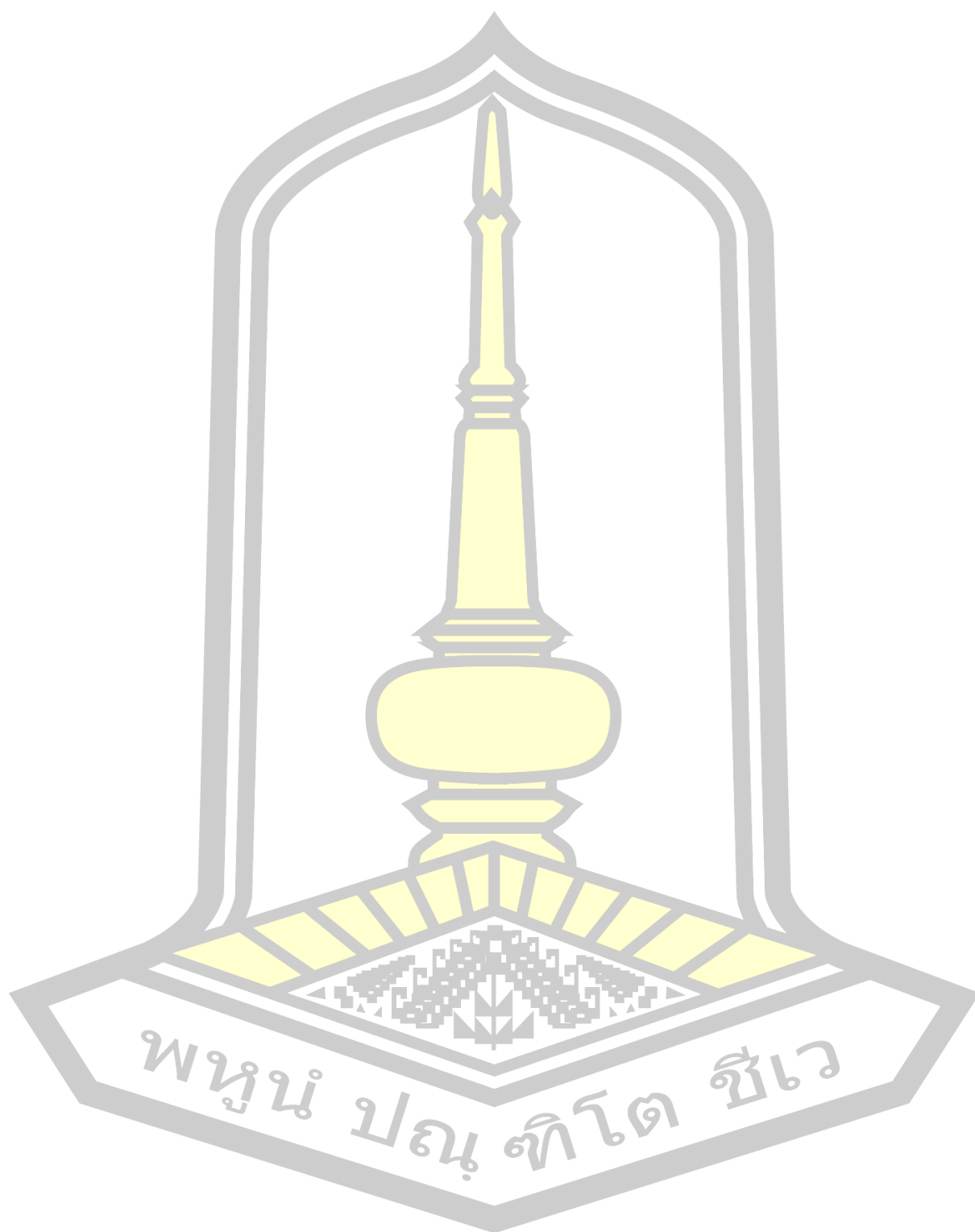
ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการอนุรักษ์ต้นพะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ใน
หลอดแก้ว

วิทยานิพนธ์
ของ
เบญจรัตน์ พรหมเพ็ญ

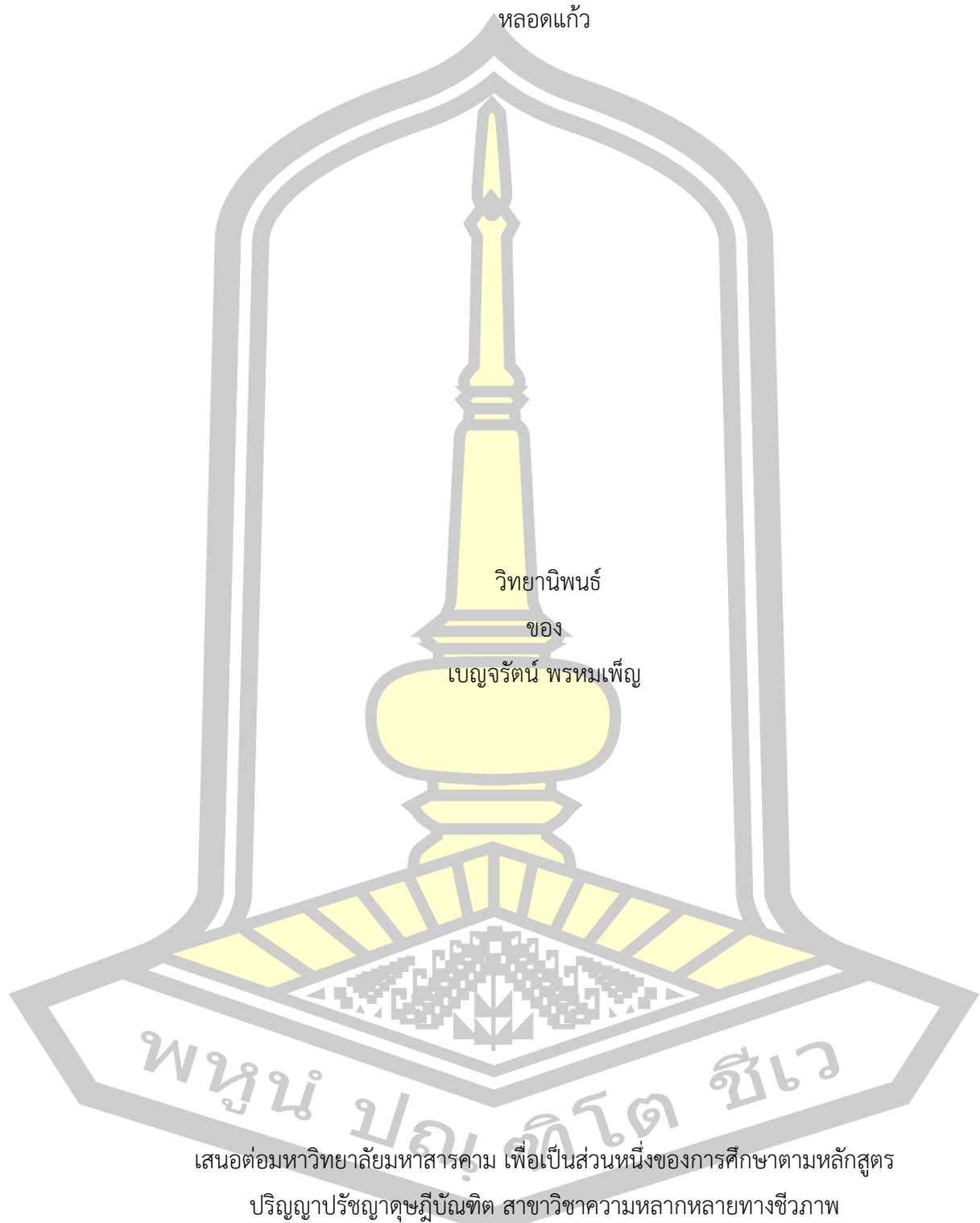
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาความหลากหลายทางชีวภาพ

มิถุนายน 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม



ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการอนุรักษ์ต้นพะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ใน
หลอดแก้ว



เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

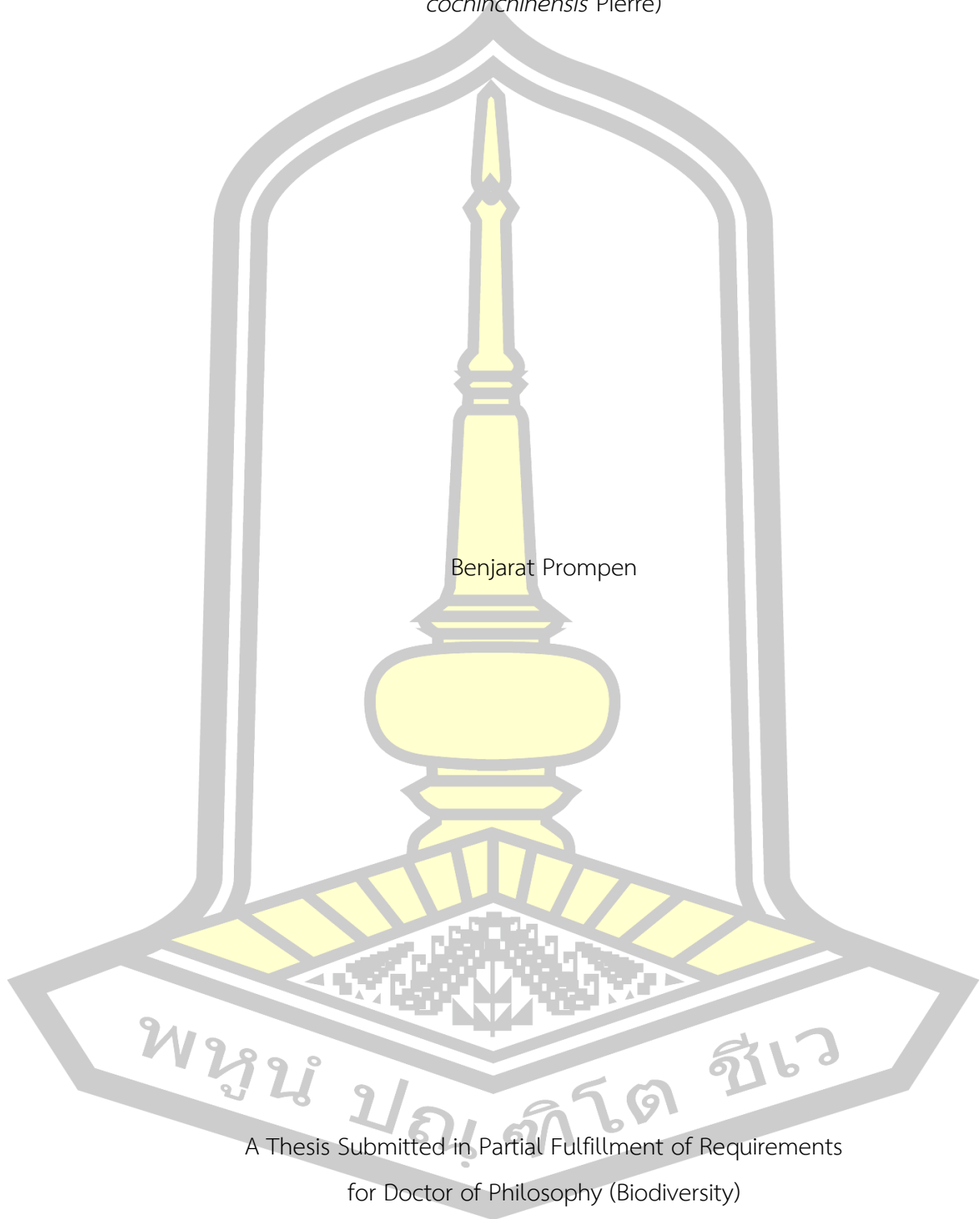
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาความหลากหลายทางชีวภาพ

มิถุนายน 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic Diversity and *In Vitro* Conservation of Siamese Rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre)

Benjarat Prompen



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Doctor of Philosophy (Biodiversity)

June 2023

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางเบญจรัตน์ พรหมเพ็ญ
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา
ความหลากหลายทางชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. ปรียกมล กลั่นฤทธิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. สุดาร์ตน์ ถนอมแก้ว)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ. ดร. วีระชัย สายจันทา)

กรรมการ

(รศ. ดร. สุรพล แสนสุข)

กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(รศ. ดร. พรเทพ ถนอมแก้ว)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาความหลากหลายทางชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ผศ. ดร. สุดาร์ตน์ ถนอมแก้ว)

คณบดีสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการอนุรักษ์ต้นพะยุง (<i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre) ในหลอดแก้ว		
ผู้วิจัย	เบญจรัตน์ พรหมเพ็ญ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ ถนอมแก้ว รองศาสตราจารย์ ดร. วีระชัย สายจันทา		
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	สาขาวิชา	ความหลากหลายทางชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2566

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการอนุรักษ์ต้นพะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ในหลอดแก้ว มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยุงโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมและไมโทคอนเดรียจีโนม และพัฒนาเทคนิควิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้พะยุงสายพันธุ์ในระยะยาวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเสริมสร้างการอนุรักษ์พันธุกรรมพะยุงสายพันธุ์และแนวทางการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ซึ่งเป็นการความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยุงจากป่าธรรมชาติ 13 ถิ่นกำเนิด ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA) และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน *maturase K (matK)* ในคลอโรพลาสต์ และยีน Internal Transcribed Spacer 4 (*ITS4*) ตลอดจนการศึกษาหาแนวทางการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุงด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการศึกษาพบว่าสามารถสร้างแผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของพะยุงที่วิเคราะห์ด้วยลำดับเบสบริเวณ *matK* และด้วยลำดับเบสบริเวณ *ITS4* โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุลเดียวกันที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ พืชกลุ่มสกุล *Dalbergia* 78 ตัวอย่าง โดยใช้ประดู่ป่า *Pterocarpus macrocarpas* Kurz (AB924813) เป็น out-group สามารถแบ่งเป็น 2 clades อย่างชัดเจน โดยตัวอย่างพะยุงที่ใช้ในการศึกษานี้จัดอยู่ใน Clades A ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยค่า Haplotype diversity (*h*) และค่า Nucleotide diversity (π) พบว่ารูปแบบของยีน (alleles) *matK* ของพะยุงทั้งหมด 48 ตัวอย่าง จาก 13 กลุ่มประชากร Unique haplotype ทั้งหมด 34 haplotypes โดยมีค่า Haplotype diversity (*h*) และค่า Nucleotide diversity (π) ในพะยุงแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-1.000 และ 0.000-0.014 ตามลำดับ ในขณะที่ยีน *ITS* จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 65 ตัวอย่าง มีทั้งหมด 31 haplotypes โดยพบ Unique haplotypes จำนวน 15 haplotypes ความหลากหลายของ Haplotype ที่ 0.000 ± 1.000 และ Nucleotide diversity ที่ 0.000-0.008 ตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมซึ่งเป็นการถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่ฝ่ายเดียวเท่านั้น ทำให้รูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกับแม่และมีความพิเศษ (unique) ของแต่ละสายพันธุ์แม่ไม้ การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่ายีน *ITS* สามารถใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมได้ชัดเจนกว่ายีน *matK* แต่ยีน *matK* เป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์เป็นยีนกึ่งอนุรักษ์ (conserve gene) มากกว่า จึงควรใช้ศึกษาด้านการส่งต่อพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก

คำสำคัญ : พะยุง, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, เทคโนโลยีชีวภาพ, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

TITLE	Genetic Diversity and <i>In Vitro</i> Conservation of Siamese Rosewood (<i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre)		
AUTHOR	Benjarat Prompen		
ADVISORS	Assistant Professor Sudarat Thanonkeo , Ph.D. Associate Professor Weerachai Saijuntha , Ph.D.		
DEGREE	Doctor of Philosophy	MAJOR	Biodiversity
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2023

ABSTRACT

Research on Genetic Diversity and *In Vitro* Conservation of Siamese Rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) was to assess the genetic diversity of Siamese Rosewood using DNA data from chloroplast genomes and nuclear genome, as well as strengthening the development of good rosewood genetic preservation and sustainable utilization practices for *In Vitro* conservation. This study examined the diversity of Siamese Rosewood plus trees from 13 sources, whereas DNA was extracted using the DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) and using *matK* in chloroplasts and *ITS4* in nucleus , as well as the study of *In Vitro* conservation of Siamese Rosewood. The results showed that evolutionary relationships can be mapped. The phylogenetic tree of Siamese rosewood was analyzed with the *matK* sequencing and the internal transcribed spacer 4 (*ITS4*) sequencing together with the nucleotides of the same genus retrieved from the GenBank database, i.e., 78 specimens of the genus *Dalbergia* and *Pterocarpus macrocarpus* Kurz (AB924813) were used as an out-group which category in B clades. The rosewood specimens used in this study were classified as Clades A. The results of genetic diversity analysis using haplotype diversity (*h*) and nucleotide diversity (π) showed that alleles of *matK* genes were found in 48 samples can be divided into 34 haplotypes, all 34 haplotypes are unique haplotypes with haplotype diversity (*h*) and nucleotide diversity (π) between 0.000-1.000 and 0.000-0.014, respectively. Genetic nucleotide sequences with Internal Transcribed Spacer 4 (*ITS4*) showed that out of a total of 65 samples, 31 haplotypes were found, 15 were unique haplotypes with haplotype diversity (*h*) and nucleotide diversity (π) values between 0.000-1.000 and 0.000-0.008. The chloroplast portion of the genome that are inherited only through the mother gene. This makes the DNA unique to each species and source. *ITS* gene has higher genetic diversity than the *matK* gene. From this study, *ITS* gene can be used to study on genetic variation, but *matK* gene is chloroplast gene which is conserve gene, suitable for study on the genetic inheritance from mother tree to seedling.

Keyword : Siam Rosewood, Genetic diversity, Biotechnology, Tissue Culture

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความช่วยเหลือจากผู้คนหลากหลายส่วนหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ได้แก่ ผศ.ดร.สุดารัตน์ ถนอมแก้ว และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ได้แก่ รศ.ดร.วีรชัย สายจันทา ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ผศ.ดร. ปรียกมล กลั่นฤทธิ์ รศ.ดร.พรเทพ ถนอมแก้ว รศ.ดร.สุรพล แสนสุข ที่ให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ ขอขอบคุณ คณะจารย์สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคามทุกท่านที่ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า ตลอดช่วงเวลาของการเรียนระดับปริญญาเอก ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบัน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ดร.ณมล บุญชม ดร.วรายุทธ พิลาก นายณัฐพล สุกพวงแก้ว ที่ช่วยสนับสนุนทั้งกำลังกายและให้กำลังใจในการทำงานในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและมีประสิทธิภาพ

ที่สำคัญที่สุดนั้นคือครอบครัวของข้าพเจ้า ได้แก่ นางลิ ภูมิบัลลังก์ จิบหนองแขว (มารดา) ผศ.ดร.ชัยนันท พรหมเพ็ญ (สามี) และเด็กหญิงรัชมกร พรหมเพ็ญ (บุตร) ตลอดจนพี่น้อง เพื่อนร่วมงาน ที่เป็นทั้งแรงผลักดันและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าต่อสู้กับอุปสรรคทุกประการตลอดการศึกษาระดับปริญญาเอกในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณกรมป่าไม้ ตลอดจนผู้บังคับบัญชาทุกระดับของสำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าลาศึกษาต่อระดับปริญญาเอก และอนุเคราะห์ตัวอย่างใบพะยูนในแปลงรวบรวมกิ่งพันธุ์พะยูนในศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) การศึกษาระดับปริญญาเอกครั้งนี้ทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสเพิ่มพูนความรู้ความสามารถทั้งในด้านวิชาการและด้านการวางแผนงานวิจัย ซึ่งจะได้นำความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาต่อในครั้งนี้ไปใช้ในการทำงานและพัฒนางานด้านพันธุศาสตร์ป่าไม้ของกรมป่าไม้ต่อไป

เบญจรัตน์ พรหมเพ็ญ

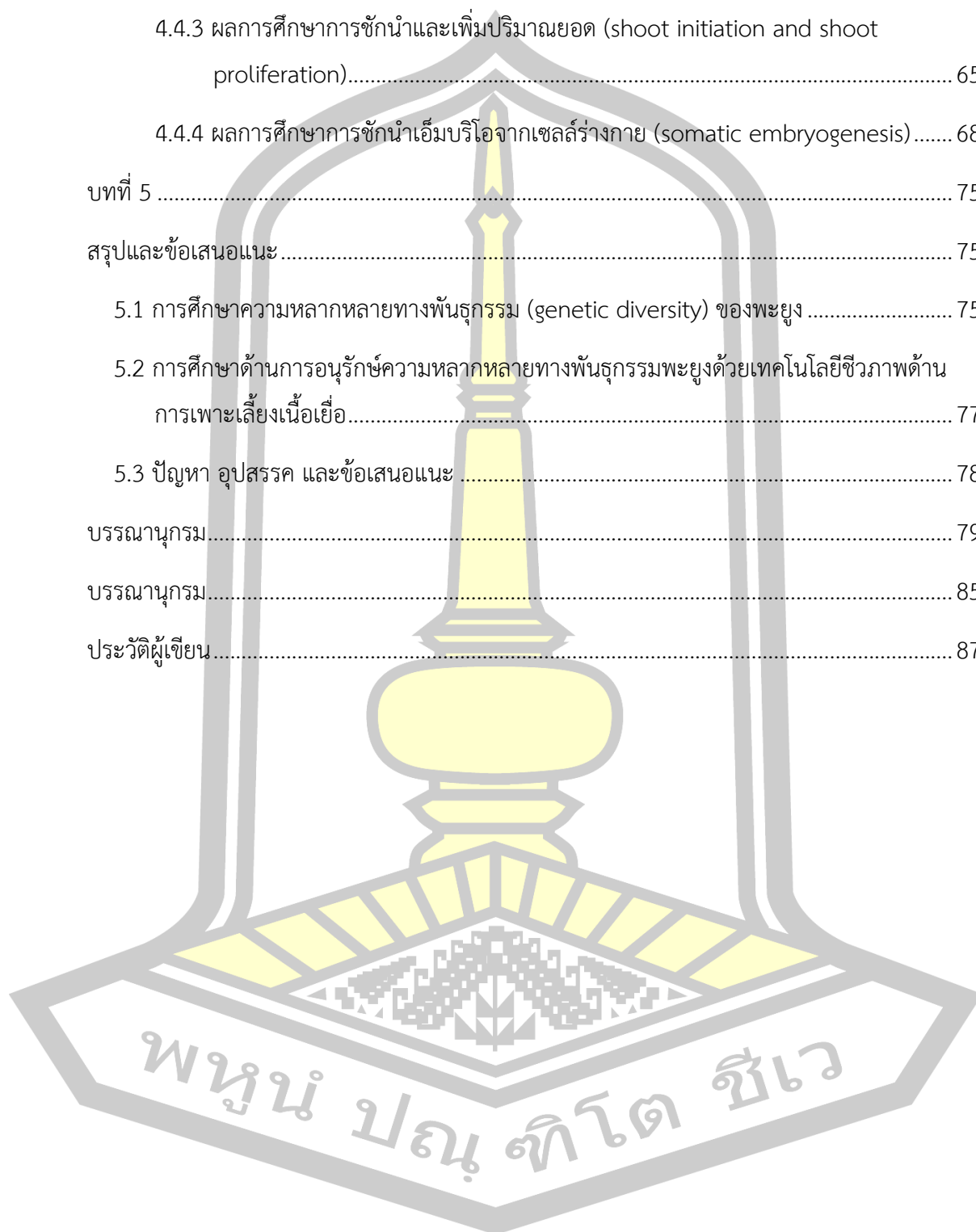
พูน ปณ จิตโต ชีเว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
List of Tables.....	ญ
List of Figures.....	ฎ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
1.1 หลักการและเหตุผล.....	1
1.2 ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย.....	4
บทที่ 2.....	5
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล.....	5
2.1 ไม้พะยุง.....	5
2.2 พันธุศาสตร์ป่าไม้และความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุง.....	8
2.2.1 การศึกษาพันธุศาสตร์ป่าไม้.....	8
2.2.2 พื้นฐานของพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพืช.....	10
2.2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุง.....	13
2.2 การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุงด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ.....	16

2.2.1 การอนุรักษ์พันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	20
2.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้นสกุล Dalbergia	24
2.2.3 หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว	25
2.2.4 การเก็บรักษาไม้พะยุงสายพันธุ์ดีด้วยเทคนิค Artificial Seeds Encapsulation	28
บทที่ 3	33
วิธีดำเนินการวิจัย	33
3.1 การคัดเลือกวัสดุพันธุกรรมพะยุงที่ใช้ในการวิจัย	33
3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	34
3.3 ระเบียบวิธีวิจัย	36
3.3.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของพะยุง.....	36
3.3.2 การศึกษาหาแนวทางการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุงด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ	41
บทที่ 4	44
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	44
4.1 การกระจายของพะยุงในแหล่งธรรมชาติที่นำมาศึกษา	44
4.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	47
4.3 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของพะยุง.....	49
4.3.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยยีน maturase K (<i>matK</i>) ในคลอโรพลาสต์.....	49
4.3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยยีนนิวเคลียส Internal transcribed spacer 4 (<i>ITS4</i>)	51
4.3.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพะยุง (Genetic differentiation).....	58
4.3.4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะด้านสัณฐานวิทยาของแม่ไม้พะยุง	59
4.4 ผลการศึกษาด้านการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุงด้วยเทคโนโลยีชีวภาพด้าน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	63
4.4.1 ผลการศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ.....	63

4.4.2 ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด.....	64
4.4.3 ผลการศึกษาการชักนำและเพิ่มปริมาณยอด (shoot initiation and shoot proliferation).....	65
4.4.4 ผลการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis)	68
บทที่ 5	75
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
5.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของพะยูน	75
5.2 การศึกษาด้านการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	77
5.3 ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ	78
บรรณานุกรม.....	79
บรรณานุกรม.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	87



List of Tables

	หน้า
Table 1 Ratio of <i>matK</i> gene amplification solution.	38
Table 2 PCR reaction procedure for amplification of the <i>matK</i> gene.	38
Table 3 Ratio of <i>ITS4</i> gene amplification solution.	38
Table 4 PCR reaction procedure for amplification of the <i>ITS4</i> gene	39
Table 5 MS media supplemented with BA and NAA at different concentrations for shoot initiation.	42
Table 6 MS media supplemented with Kinetin+2,4-D at different concentrations for Callus Induction.	43
Table 7 PCR products used of Sample for nucleotide sequencing analysis from 13 sources.	47
Table 8 Plant sample data in the GenBank database and accession number.	54
Table 9 Nucleotide sequence variation in the <i>matK</i> and ITS genes of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre	57
Table 10 Pairwise genetic differentiation (Φ_{ST}) of 13 populations of rosewood using the nucleotide sequences of <i>matK</i> gene (top triangle) and 17 populations of ITS gene (bottom triangle).	62
Table 11 Seed germination test and pre-seeding practices.	64
Table 12 The number of shoots obtained on the MS medium supplemented with different concentrations of BAP and NAA.	66
Table 13 Analysis of variance of MS medium supplemented with different concentrations of BAP and NAA.	66
Table 14 Callus formation of various explant sources.	71

Table 15 Callus formation of cotyledon fragments at different concentrations of medium.....	71
---	----

Table 16 Callus formation on MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and Kinetin.....	72
---	----

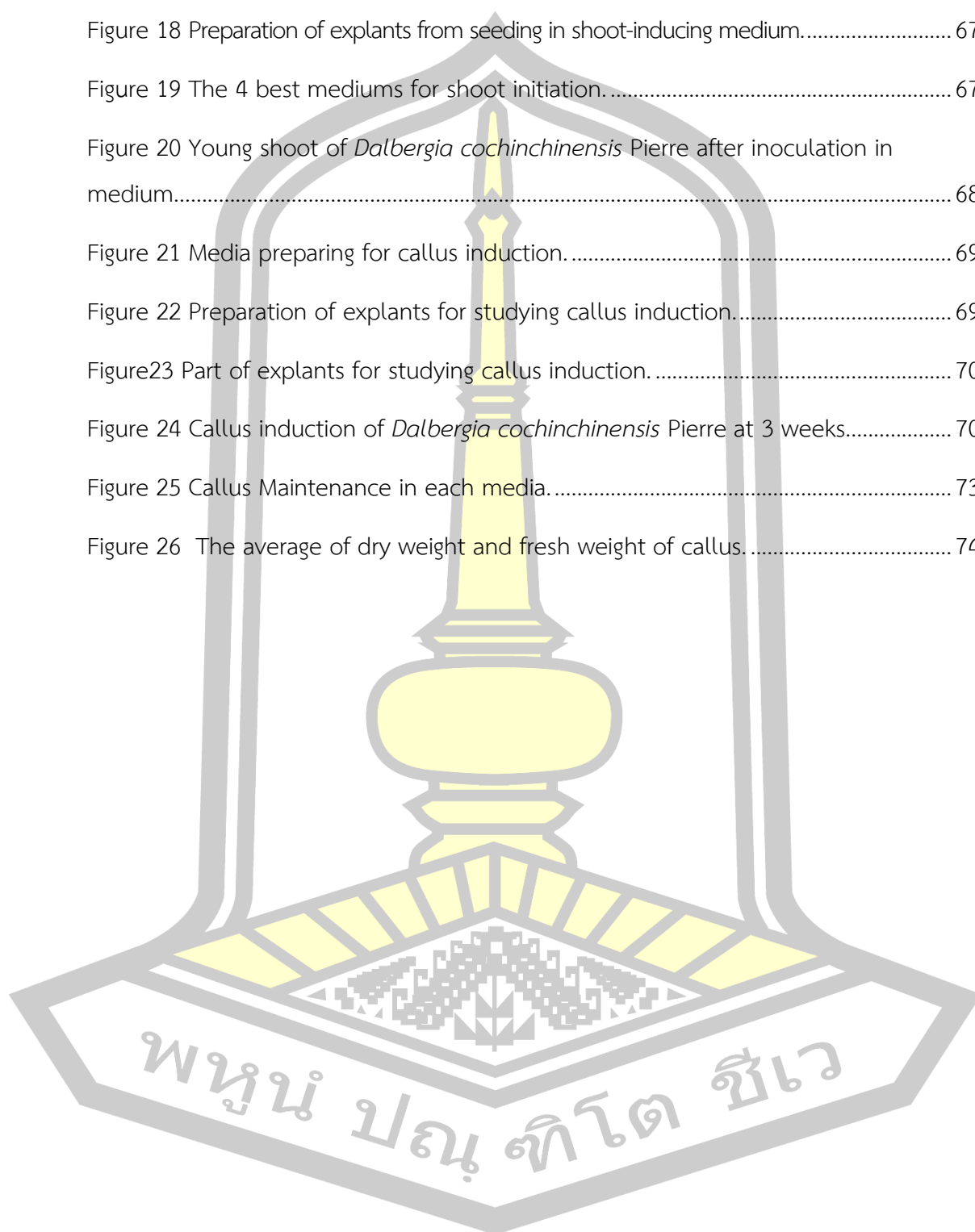
Table 17 Analysis of variance of MS medium supplemented with 2,4-D and Kinetin at different concentrations.	72
--	----



List of Figures

	หน้า
Figure 1 <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre Note : a=plantation b=tree c=flower c=young pods d=dry pods e=seeds)	6
Figure 2 Characteristics of a plant cell.....	9
Figure 3 <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre distribution map in Thailand.	15
Figure 4 Guidelines for genetic resource conservation.....	18
Figure 5 Process of temporary bioreactor system.....	27
Figure 6 Grid design for selection of areas for select plus tree.....	34
Figure 7 Thesis conceptual framework.....	36
Figure 8 Cutting techniques to produce explants for tissue culture.....	41
Figure 9 Distribution of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre for this research.....	45
Figure 10 Hedge orchard of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre at Northeastern Forest Tree Seed Center (Khon kaen).....	46
Figure 11 Plus tree Selecting Data form.....	46
Figure 12 Phylogenetic tree of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre where the nucleotide sequences were analyzed with the <i>matK</i> gene with neighbor-joining.....	50
Figure 13 Haplotype diversity (h) where the nucleotide sequences were analyzed with the <i>matK</i> gene with neighbor-joining.	51
Figure 14 Phylogenetic tree of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre where the nucleotide sequences were analyzed with the <i>ITS</i> gene with neighbor-joining.....	53
Figure 15 Haplotype diversity (h) where the nucleotide sequences were analyzed with the <i>ITS</i> gene with neighbor-joining.....	54
Figure 16 Physical characteristics of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre seeds taken with a Leica microscope	63

Figure 17 Seedlings of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre seeds at 2-3 weeks.....	65
Figure 18 Preparation of explants from seedling in shoot-inducing medium.....	67
Figure 19 The 4 best mediums for shoot initiation.....	67
Figure 20 Young shoot of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre after inoculation in medium.....	68
Figure 21 Media preparing for callus induction.....	69
Figure 22 Preparation of explants for studying callus induction.....	69
Figure23 Part of explants for studying callus induction.....	70
Figure 24 Callus induction of <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Pierre at 3 weeks.....	70
Figure 25 Callus Maintenance in each media.....	73
Figure 26 The average of dry weight and fresh weight of callus.....	74



บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) เป็นไม้ยืนต้นถูกจำแนกทางอนุกรมวิธานให้อยู่ในสกุล *Dalbergia* วงศ์ Fabaceae (Leguminosae) ซึ่งพรรณไม้สกุลนี้มีวิสัยทั้งเป็นไม้ยืนต้น ไม้เลื้อยเนื้อแข็ง การแพร่กระจายพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในเขตร้อนของโลก (pantropical region) มีสมาชิกประมาณ 250 ชนิด (Vatanparast *et al.*, 2013) ประเทศไทยมีอยู่ 26 ชนิด (Niyomdham, 2002) ไม้พะยูนมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย พม่า กัมพูชา ลาว และเวียดนาม จัดเป็นไม้ที่หายากอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย อีกทั้งยังเป็นไม้มีค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากเป็นไม้ที่มีเนื้อแข็ง แก่นไม้มีความสวยงาม ทำให้มีราคาแพงและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ จึงถือได้ว่าไม้พะยูนในประเทศไทยกำลังเผชิญกับสถานะที่ล่อแหลมต่อการสูญพันธุ์หรือสูญสิ้นการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ ไม้พะยูนเป็นไม้ป่าที่มีค่าทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่มีการเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ราบ และมีการกระจายไปทั่วภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลาง แต่ในปัจจุบันมีจำนวนลดน้อยลงจนหาได้ยากเนื่องจากไม้พะยูนมีคุณสมบัติเนื้อไม้เป็นไม้เนื้อแข็งที่มีลวดลายสวยงามเหมาะสำหรับทำเฟอร์นิเจอร์ ซึ่งเป็นที่ต้องการทั้งในและนอกประเทศ จึงมีการตัดไม้ชนิดนี้เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะการลักลอบตัดไม้พะยูนในป่าธรรมชาติอย่างผิดกฎหมาย จนไม่สามารถหาแม่ไม้ไว้ใช้ในการแพร่พันธุ์ตามธรรมชาติได้ ด้วยเหตุนี้ทำให้ในห้วงเวลา 5 ปีที่ผ่านมา ไม้พะยูนในประเทศไทยถูกคุกคามอย่างหนัก จนอยู่ในขั้นวิกฤต อันจะเห็นได้จากสถิติคดีเกี่ยวกับการป่าไม้ พ.ศ. 2561 ที่พบการลักลอบตัดไม้พะยูนในป่าธรรมชาติ ซึ่งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออกของประเทศไทย จำนวนมากถึง 576 คดี รวมมูลค่าความเสียหายได้ 103 ล้านบาท (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2561) จากสถานการณ์ข้างต้น พะยูนจึงจัดเป็นพืชป่าที่อยู่ในขั้นวิกฤตที่กำลังตกอยู่ในสภาพเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ หรือสูญสิ้นในความหลากหลายทางพันธุกรรม การอนุรักษ์พันธุกรรม และการส่งเสริมให้มีการปลูกไม้พะยูนในรูปแบบสวนป่า จึงเป็นเรื่องที่เร่งด่วนสำหรับไม้ชนิดนี้

หน่วยงานราชการโดยกรมป่าไม้ได้ตระหนักถึงความสำคัญจึงได้มีการอนุรักษ์สายพันธุ์ไม้พะยูนไว้โดยการปลูกสร้างสวนอนุรักษ์พันธุ์ไม้พะยูนและแปลงทดสอบสายพันธุ์ในพื้นที่สถานีวิจัยต่างๆ ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในแง่ของการใช้เป็นข้อมูลในการส่งเสริมและพัฒนาการปลูกไม้พะยูนเพื่อเศรษฐกิจ การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมนั้นมีความสำคัญเพราะจะเป็น

การเก็บรักษาพันธุ์พืชที่กำลังจะสูญพันธุ์ แต่อาจมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคตไว้ การเก็บรักษาประชากรพืชที่มีคุณลักษณะพิเศษ สำหรับการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์พืชไว้ เช่น มีความต้านทานต่อโรคและแมลง หรือทนความแห้งแล้งได้ดี การเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ใช้เป็นประชากรสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป การเก็บรักษาประชากรพืชที่มีความสำคัญในอนาคตไว้เพราะมีลักษณะที่ค่อนข้างเด่นอยู่ การเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้สำหรับเป็นแหล่งงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ในอนาคต การใช้เป็นแหล่งผลิตเมล็ดก่อนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ตลอดจนเป็นหลักประกันว่าการสูญเสียลักษณะทางพันธุ (genetic loss) จากการปรับปรุงพันธุ์แบบคัดเลือก (selective breeding) จะไม่เกิดขึ้นเพราะได้ทำการรักษาพันธุ์เดิมไว้แล้ว ทั้งนี้การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมพันธุ์ไม้พะยูน นิยมดำเนินการสองรูปแบบคือ การเก็บรักษาในสภาพป่าหรือ ในถิ่น (*In situ* conservation) และการเก็บรักษาในรูปแบบแปลงรวบรวมพันธุ์นอกถิ่น (*Ex situ* conservation)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่า การปลูกพะยูนทั้งในส่วนของภาครัฐและเกษตรกร เพื่อการจัดสร้างสวนป่าไม้เศรษฐกิจสำหรับป้อนตลาดไม้พะยูน ยังมีปัญหาเนื่องจากขาดแคลนกล้าพะยูนพันธุ์ดีที่มาจากต้นแม่ที่มีลักษณะดี ดังนั้นการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูนสายพันธุ์ดีโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมและไมโทคอนเดรียจีโนม จะช่วยให้สามารถคัดเลือกแม่ไม้พะยูนที่มีลักษณะที่ดีได้ และเมื่อได้ต้นแม่ไม้พะยูนที่มีลักษณะดีแล้ว การศึกษาด้านการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพก็จะช่วยเสริมความแข็งแกร่งในการผลิตต้นกล้าที่มีสายพันธุ์ที่ดี เพื่อแจกจ่ายกล้าไม้พันธุ์ดีให้แก่เกษตรกรผู้สนใจปลูกสร้างสวนป่าพะยูนของประเทศต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายของการวิจัย

1.2.1 เพื่อประเมินความหลากหลายทางชีวภาพและโครงสร้างทางพันธุกรรมของพะยูนโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมและไมโทคอนเดรียจีโนม

1.2.2 เพื่อจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมแม่ไม้พะยูนในแหล่งธรรมชาติเพื่อประโยชน์ในการเป็นแหล่งวัสดุพันธุกรรมไม้พะยูน เพื่อสนับสนุนการปลูกสร้างสวนป่าไม้พะยูน อันจะช่วยในการแก้ไขปัญหาความขาดแคลนไม้พะยูนเพื่อการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ในอนาคต

1.2.3 เพื่อการเสริมสร้างการพัฒนาการอนุรักษ์พันธุกรรมพะยูนสายพันธุ์ดีและแนวทางการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ตลอดจนพัฒนาเทคนิควิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้พะยูนสายพันธุ์ดีในระยะยาวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบลักษณะความหลากหลายทางชีวภาพและโครงสร้างทางพันธุกรรมของพะยูนโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมและไมโทคอนเดรียจีโนม

1.3.2 ได้ฐานข้อมูลพันธุกรรมแม่ไม้พะยูนในแหล่งธรรมชาติเพื่อประโยชน์ในการเป็นแหล่งวัสดุพันธุกรรมไม้พะยูน เพื่อสนับสนุนการปลูกสร้างสวนป่าไม้พะยูน อันจะช่วยในการแก้ไขปัญหาความขาดแคลนไม้พะยูนเพื่อการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ในอนาคต

1.3.3 ได้แนวทางการเสริมสร้างการพัฒนาการอนุรักษ์พันธุกรรมพะยูนสายพันธุ์ดีและแนวทางการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ตลอดจนพัฒนาเทคนิควิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้พะยูนสายพันธุ์ดีในระยะยาวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ

1.3.4 เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การอนุรักษ์พันธุกรรมและการผลิตต้นพันธุ์ไม้พะยูนเพื่อการส่งเสริมการปลูกไม้มีค่าให้เกษตรกรผู้สนใจปลูกสร้างสวนป่าต่อไป

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างพะยูนสายพันธุ์ดีในแปลงเพื่อศึกษาทางซีฟลักซ์ (phenology) การเติบโต (growth) หรือรูปทรง (tree forms) ของไม้พะยูนในแปลงปลูกรวบรวมสายพันธุ์ที่ได้จากการนำกิ่งของต้นแม่ไม้ในป่าธรรมชาติ มาปลูกและรวบรวมไว้ที่ศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) เพื่อนำไปมาสกัดดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและโครงสร้างทางพันธุกรรมของพะยูนโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนม (*matK* gene) และไมโทคอนเดรียจีโนม (*ITS* gene) จากนั้นทำการศึกษาด้านการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โตเมล็ดและยอดอ่อน ตาข้าง

หรือเมล็ดของไม้พะยูนมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพะยูน

1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

แปลงรวบรวมกิ่งพันธุ์พะยูนสายพันธุ์ดีของศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



บทที่ 2

ปรัทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 ไม้พะยุง

ไม้พะยุงมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย พม่า กัมพูชา ลาว และเวียดนาม จัดเป็นไม้ที่หายากอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย อีกทั้งยังเป็นไม้มีค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากเป็นไม้ที่มีเนื้อแข็ง แก่นไม้มีความสวยงาม ทำให้มีราคาแพงและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ จึงถือได้ว่าไม้พะยุงในประเทศไทยกำลังเผชิญกับสภาวะที่ล่อแหลมต่อการสูญพันธุ์หรือสูญสิ้นการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ เนื่องจากไม้พะยุงเป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในหลายประเทศ มีสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศและระบบนิเวศที่แตกต่างกันไป การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ลักษณะและองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่จะเอื้ออำนวยให้สายพันธุ์สามารถปรับตัวได้ในสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศสังคมพืชที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของระบบนิเวศนั้นๆ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศ ซึ่งปัจจัยนี้จะเป็นตัวกำหนดให้การวิวัฒนาการร่วมกันภายในแต่ละสังคมพืชแตกต่างกันไป และได้พรรณไม้ที่แตกต่างและเหมาะสมเฉพาะแต่ละท้องถิ่น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างถิ่นกำเนิด เนื่องจากการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติ

การจัดสถานภาพทางกฎหมายของไม้พะยุงตามที่ระบุไว้ในพระราชกฤษฎีกากำหนดไม้หวงห้าม พ.ศ. 2530 ตามพระราชบัญญัติป่าไม้ พ.ศ. 2484 ประกาศให้ไม้พะยุงเป็นไม้หวงห้ามธรรมดาในลำดับที่ 53 ต่อมาในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยได้เสนอให้ประเทศที่เป็นภาคีสัญญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่า และพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ หรือไซเตส (CITES) ได้ขึ้นบัญชีไม้พะยุงให้เป็นไม้หวงห้ามที่ต้องมีการควบคุมต่อการค้าระหว่างประเทศ ในบัญชีที่ 2 (CITES, 2018) ต่อมาคณะรักษาความสงบแห่งชาติได้มีประกาศฉบับที่ 106/2557 ลงวันที่ 21 กรกฎาคม พ.ศ. 2557 ให้ไม้พะยุงเป็นไม้หวงห้าม ก.พิเศษเช่นเดียวกับไม้ยาง และสัก (หัวหน้าคณะรักษาความสงบแห่งชาติ, 2557)

ไม้พะยุงเป็นไม้ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่สูงถึง 25 เมตร มีช่วงลำต้น 10-15 เมตร มีเปลือกสีเทา เรียบ ลอกเป็นแผ่นบางๆ เปลือกในสีน้ำตาลแกมเหลือง โดยมากจะมีพุ่มใบกว้าง การแตกกิ่งก้านจะแตกเป็นแขนงแยกย่อยจากกิ่งใหญ่ โดยปรกติส่วนของตาที่จะแตกเป็นกิ่งใหม่มักจะอยู่บนกิ่งแขนงย่อยบริเวณส่วนนอกของพุ่มใบ ใบเป็นใบประกอบเป็นช่อแบบขนนก ช่อใบยาว 10-15 เซนติเมตร มีใบย่อย 7-

9 ใบ เรียงตัวสลับกัน ใบมีลักษณะเหนียวคล้ายแผ่นหนังบางๆ มีลักษณะรูปไข่ขนาดกว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 4-7 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ดอกมีขนาดเล็กสีขาวเกิดบนช่อดอกเชิงประอบ ตามปลายกิ่งหรือตามง่ามใบใกล้ยอด ออกดอกระหว่างเดือน พฤษภาคม-กรกฎาคม ผลเป็นฝักเกลี้ยงรูปขนานแบนและบอบบางกว้าง 12 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร ตรงบริเวณที่หุ้มเมล็ดมองเห็นเส้นแขนงไม้ชัดเจน ฝักเมื่อแก่จะไม่แตกออกเหมือนฝักแดง หรือ ฝักมะค่าโมง ฝักจะร่วงหล่นโดยที่เมล็ดยังอยู่ในฝัก มีเมล็ดจำนวน 1-4 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะแบนเป็นรูปไต สีน้ำตาลเข้ม ผิวเมล็ดค่อนข้างมันมีขนาดกว้างประมาณ 4 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร ระบบรากเป็นระบบรากแก้วและรากแขนง โดยที่รากแก้วจะเป็นรากแกนหลักที่มีรากแขนงแตกย่อยออกไป เป็นไม้ที่มีระบบรากค่อนข้างลึก รากฝอยจะมีปมรากแบบรากถั่วช่วยในการตรึงก๊าซไนโตรเจน (Niyomdham, 2002) ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของไม้พุ่มดังแสดงใน Figure1



Figure 1 *Dalbergia cochinchinensis* Pierre

Note : a=plantation b=tree c=flower c=young pods d=dry pods e=seeds)

ดอกของไม้พะยูน

ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ที่มีขนาดเล็กสีขาว ช่วงเวลาการออกดอกเริ่มประมาณเดือน พฤษภาคมจนถึงเดือนกรกฎาคม จัดอยู่ในกลุ่มช่อที่เรียกว่า indeterminate inflorescence ไม้ พะยูนมีโครงสร้างดอกแบบดอกถั่ว กลีบดอกเรียงแบบก้นหอย วงเกสรเพศผู้ (androecium) ประกอบด้วย เกสรเพศผู้ที่มีการเชื่อมติดของเกสรแบบเชื่อมติดกลุ่มเดียว และมีการติดของอับเรณู แบบติดด้านหลัง มีก้านชูอับเรณู 10 อัน ส่วนวงเกสรเพศเมีย (gynoecium) นั้น ประกอบด้วย รังไข่ แบบเหนียวกลีบ ท่อรังไข่ หรือก้านชูยอดเกสรเพศเมีย และยอดเกสรเพศเมีย ซึ่งช่วงเวลาการพัฒนาดังแต่เป็นตุ่มตาจนกระทั่งดอกบานใช้เวลาประมาณ 1 เดือน โดยไม้พะยูนมีช่วงพร้อมรับการผสมเกสร ประมาณ 05.00–11.00 น. นอกจากนี้ยังพบว่า ไม้พะยูนมีกลุ่มของดอกย่อยเฉลี่ย 33.45 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีดอกเฉลี่ย 7.66 ดอก หรือมีจำนวนดอกต่อช่อเฉลี่ย 256.09 ดอก โดยไม้พะยูนมีค่าความสำเร็จของการสืบพันธุ์อยู่ในเกณฑ์ต่ำ (พวงพรรณ ยงรัตนา, 2557)

ผลของไม้พะยูน

ผล ผลเป็นฝักแห้งไม่แตก แบนและบาง รูปขอบขนานกึ่งแถบยาว ขนาด $1 \times 4.5-8$ เซนติเมตร เปลือกฝักสีน้ำตาลอ่อนเมื่อแห้ง เปราะ เมล็ดรูปไตสีน้ำตาลเข้มมี 1-4 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดรูปไตขนาด 6×4 มิลลิเมตร สีน้ำตาลอมแดง ช่วงเวลาที่ออกผลอยู่ระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน (วิชาญ เอียดทอง และ สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ, 2557)

เมล็ด

ลักษณะเมล็ดของไม้พะยูนมีรูปร่างเป็นรูปไต สีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้มผิวค่อนข้างมัน มีความกว้าง ประมาณ 4 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร โดยเมล็ดจะเรียงตัวตามยาวของฝัก ใน 1 ฝัก จะมีเมล็ด 1-4 เมล็ด ระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเก็บเมล็ดอยู่ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม โดยไม้พะยูนที่คัดเลือกโดยปรกติจะสามารถเก็บเมล็ดได้ 1-2 กิโลกรัม (37,000-42,000 เมล็ดต่อกิโลกรัม) แต่ต้นทั่วไปซึ่งมีเรณูดอกกว้างอาจเก็บเมล็ดได้มากถึง 10-20 กิโลกรัม โดยเฉพาะในปีที่ผลดก (seed year) ซึ่งอัตราการงอกของเมล็ดในปีแรกที่เก็บจะไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 (ปทุม บุญนะฤดี, 2542) นอกจากนี้ยังมีการประเมินการงอกของเมล็ด พบว่า เมล็ด 1 กิโลกรัมสามารถเพาะเป็นกล้าไม้ได้ประมาณ 25,000 กล้า (สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ, 2556)

2.2 พันธุศาสตร์ป่าไม้และความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูน

2.2.1 การศึกษาพันธุศาสตร์ป่าไม้

การศึกษาพันธุศาสตร์ป่าไม้ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรม (molecular genetic markers) มาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้ป่า โดยเฉพาะเครื่องหมายไอโซเอนไซม์ (isoenzyme gene markers) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ได้ถูกนำมาใช้ในงานด้านพันธุศาสตร์ป่าไม้ร่วม 30 ปีมาแล้วในต่างประเทศ และในประเทศไทยเมื่อประมาณ 16 ปีที่ผ่านมา ทั้งนี้เพราะว่ามีข้อดีคือเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยลักษณะพันธุกรรมโดยตรง โดยไม่มีสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องและเพราะว่าไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) มีผลเกี่ยวข้องกับ Gene โดยตรง เนื่องจาก Enzyme คือ Protein product ที่ถูกแปรรหัสและควบคุมโดยลำดับของ DNA nucleotides ในหน่วยของพันธุกรรม (สุจิตรา จางตระกูล, 2552) ดังนั้น ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่วัดได้จากเครื่องหมายไอโซเอนไซม์ยีน (isoenzyme gene markers) จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยตรง ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมของต้นไม้แต่ละต้นได้ว่าเป็น Homozygous หรือ Heterozygous ส่วนการศึกษาพันธุกรรมไม้ป่าโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) สามารถศึกษาได้กว้างขวางขึ้นทั้งใน Nucleus genome และ Cytoplasmic genome (chloroplast and mitochondrial genome) ซึ่งมีระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกันกล่าวคือ ใน Nucleus genome จะมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากทั้งพ่อและแม่ ส่วนใน Chloroplast และ Mitochondrial genome จะมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไม่จากพ่อก็จากแม่ ขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ไม้ (Szmidt, 1987) ซึ่งจะเห็นว่าการศึกษาที่ได้จาก Molecular markers ดังกล่าว สามารถทำการศึกษาพันธุกรรมของพันธุ์ไม้ ตั้งแต่ระดับต้น (clone) จนถึงระดับประชากรทั้งภายในและระหว่างหมู่ไม้และชนิดพันธุ์ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ ทั้งด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าได้ นอกจากนี้ยังใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าและสามารถประหยัดงบประมาณและแรงงานและมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าการศึกษาวิจัยแบบดั้งเดิม

ยีน (gene) คือ รหัสที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมต่าง ๆ ที่เราได้รับการถ่ายทอดจากพ่อแม่ ปู่ ย่า ตา ยาย ที่เห็นได้ว่ามี รูปร่างหน้าตา สีผิว สีมมเหมือนกัน และที่สำคัญไปกว่าการแสดงออกของรูปลักษณ์ภายนอก คือ ยีนยังเป็นสิ่งที่ควบคุม การทำงานของร่างกายผ่านการสร้างโปรตีน

ยีนสามารถเป็นได้ทั้ง ดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้นจะเป็นดีเอ็นเอ (DNA) หมดเพราะเสถียรมาก เหมาะแก่การเก็บข้อมูล ขณะที่อาร์เอ็นเอจะพบในพวกไวรัส (virus) ยีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์จะรวมอยู่ในส่วนที่เรียกว่า จีโนม (Genome)

DNA Markers หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA or chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) ที่นิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism:RFLP)
- อาร์เอฟพีดี (Random Amplification Polymorphic DNA:RAPD)
- เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism:AFLP)
- เอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat:SSR)
- ไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat:ISSR)

ลักษณะของเซลล์พืช แสดงดัง Figure 2

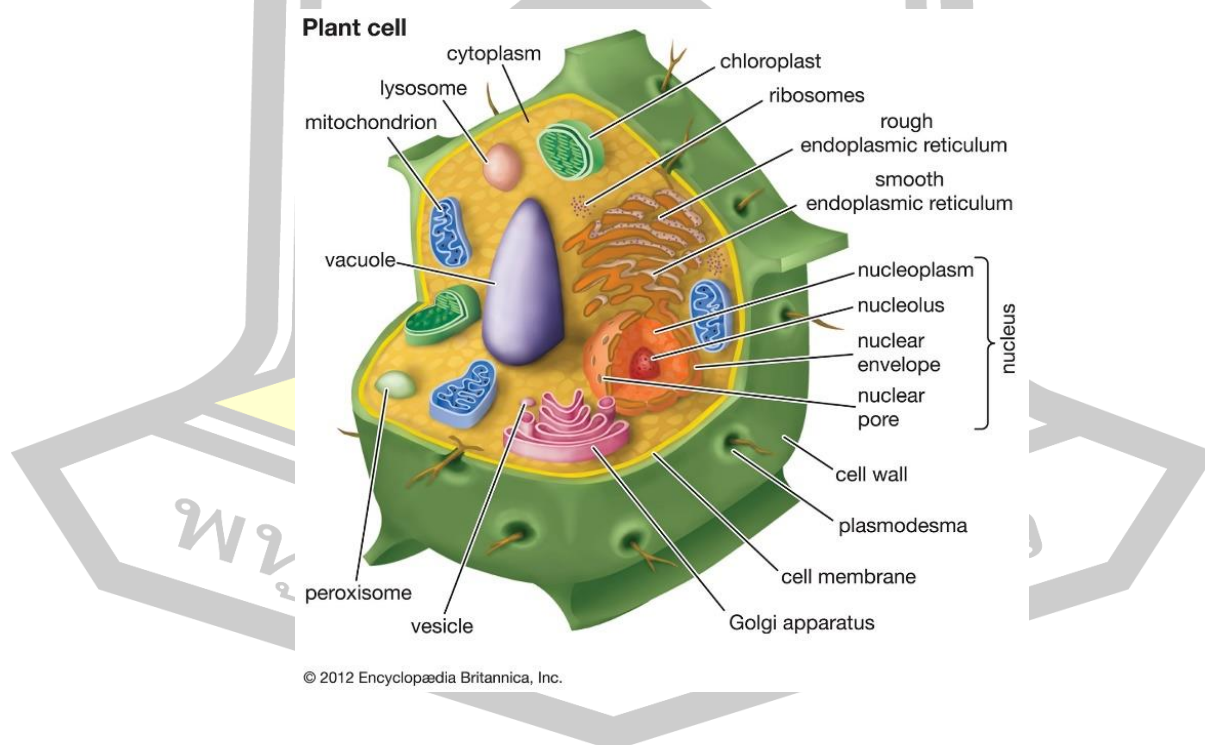


Figure 2 Characteristics of a plant cell.

ที่มา : <https://www.britannica.com/science/plant-cell>

2.2.2 พื้นฐานของพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพืช

การผสมและคัดเลือกพันธุ์ไม้ป่าเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะดี ถือว่าเป็นหลักการสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อให้ได้พันธุ์ดีตามที่ปรับปรุงพันธุ์พืชไม้ป่าต้องการหรือดีกว่าพันธุ์ที่มีอยู่เดิมและสามารถนำพันธุ์ไปขยายพันธุ์ต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง เช่น ได้ลำต้นเปลาตรงสวยงาม ต้านทานโรคและแมลง เป็นต้น ดังนั้นการคัดเลือกจึงทำได้จากการคัดเลือกพันธุ์พืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หรือทำให้พืชมีความแปรปรวนหรือกลายพันธุ์มาก ๆ ด้วยการผสมพันธุ์หรือวิธีการอื่น ๆ การคัดเลือกพันธุ์บางลักษณะก็ทำได้ง่าย เช่น จากสีหรือลักษณะของเมล็ดเป็นต้น แต่บางลักษณะก็ทำได้ยาก เช่น ปริมาณแก่นไม้ การที่พืชในรุ่นลูกรุ่นหลานมีลักษณะถ่ายทอดเหมือนพ่อแม่ค่อนข้างมาก เรียกว่า "กรรมพันธุ์" (heredity) ของพืชนั้น แต่ถ้ามีความแตกต่างจากพ่อแม่มากเราเรียกความแตกต่างนั้นว่า "ความแปรปรวน" หรือ "การกลายพันธุ์" (variation) ความแปรปรวนอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

- 1) พันธุกรรม (genetic) เป็นปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต และมีหน่วยกรรมพันธุ์เป็นหน่วยควบคุมลักษณะเล็กสุดเรียกว่ายีนที่ตั้งอยู่ในโครโมโซม (chromosome) ซึ่งอยู่ในเซลล์ของพืช พืชจะมีลักษณะใด ๆ ล้วนขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืชนั้น ทั้งนี้ลักษณะพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้
- 2) สิ่งแวดล้อม เป็นปัจจัยที่ทำให้ลักษณะภายนอกพืชต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะที่ควบคุมโดยพันธุกรรม เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความชุ่มชื้นในดิน ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ โรคและแมลงศัตรูพืช ล้วนมีผลต่อการเติบโตของพืช แต่ลักษณะที่เกิดจากปัจจัยแวดล้อมนี้จะไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้

ลักษณะที่พืชแสดงออกมา (phenotype : P) นั้น เป็นผลมาจากการแสดงออกทางพันธุกรรม (genetic : G) สภาพแวดล้อม (environment : E) และปฏิกริยาร่วมของพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อม (genetic x environment : G x E) สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$P = G + E + (G \times E)$$

ถ้าความแปรปรวนในลักษณะใดเป็นผลมาจากอิทธิพลทางพันธุกรรมมาก ลักษณะนั้นจะคัดเลือกได้ง่าย หรือใช้เป็นตัวตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์ได้ดีเมื่อเทียบกับลักษณะหนึ่ง ซึ่งความแปรปรวนเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อม (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, 2536)

การจำแนกความแตกต่างของชนิดพันธุ์พืช มีความจำเป็นต้องใช้ลักษณะภายนอก (phenotype) เช่น รูปร่างใบ สีของใบ การเรียงตัวของใบ ลักษณะผิวใบ ลักษณะของต้น เปลือก การเติบโต เป็นต้น ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวเคมีเข้ามาช่วยในการจำแนกพันธุ์พืช ซึ่งได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง อันได้แก่ การใช้เอนไซม์ (enzyme) โปรตีน (protein) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดีข้อด้อยต่างกันไป สำหรับการใชเอนไซม์หรือโปรตีน มีข้อด้อยคือมีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมเป็นข้อจำกัด ทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้

การวัดความหลากหลายทางพันธุกรรม (measuring genetic diversity) สามารถวัดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมและสามารถใช้ในการตรวจวัดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ ซึ่งเป็นการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มประชากรเดียวกัน หรือสิ่งมีชีวิตต่างกลุ่มกัน หรือใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต แต่ละชนิด แต่ละตัวได้อีกด้วย ซึ่งเครื่องหมาย (marker) ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมี 2 ประเภทคือ

1) เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะสีตาหรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกของกุหลาบ เป็นต้น

2) เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เครื่องหมายโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอ

- เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิค Electrophoresis

- เครื่องหมาย DNA (DNA marker) หมายถึง DNA ที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง ชนิดพันธุ์หนึ่ง หรือในระดับต่างชนิดพันธุ์เป็น DNA ที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม หรือ DNA ในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ DNA เป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ DNA (Mutation) หรือเกิดความแตกต่าง (Polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุล DNA นั้นเอง การตรวจสอบในระดับ DNA มีข้อจำกัดกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน คือ โมเลกุลของ DNA มีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นานสามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และ DNA เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบ DNA จากเนื้อเยื่อใดๆ ก็ได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต หรือในสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบ DNA จากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่

ใช้ยีนก็ได้ทำให้การใช้ DNA เป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง และประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย

เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ที่มีการใช้สำหรับจำแนกพันธุ์พืชในระดับดีเอ็นเอ มีหลากหลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP) ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีแต่มีข้อจำกัดมาก และต้องใช้งบประมาณสูง นักวิทยาศาสตร์ด้านชีวโมเลกุล จึงได้มีการพัฒนาวิธีการที่เรียกว่า เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat-ISSR) เพื่อใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอ นับเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากเกินไป ทั้งนี้เทคนิค ISSR เป็นการใช้ประโยชน์ของไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) หรือ simple sequence repeat (SSR) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของยูคาริโอต (eukaryote) โดยชุดเบสซ้ำหนึ่งหน่วยประกอบไปด้วยลำดับเบส 1-6 คู่เบส ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลต์ เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนซ้ำ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี เนื่องจากความผันแปรของจำนวนซ้ำสูง หรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีลและมีอยู่มากมายหลายตำแหน่งในจีโนม (Weising K., 1998)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูนที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ ได้แก่ การพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite ในไม้พะยูนโดย (สุจิตรา จางตระกูล, 2552) และการศึกษาของ (Soonhuae, 1994) ซึ่งการประเมินสภาพแหล่งพันธุกรรมของไม้พะยูนจึงมีความสำคัญต่อการวางแผนการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมของไม้พะยูน อย่างไรก็ตามเนื่องจากยังไม่มีผู้ใดศึกษาการพัฒนาไมโครแซทเทลโลมาร์กเกอร์ในไม้พะยูนมาก่อน ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้คณะผู้วิจัยจึงได้มีการพัฒนาไมโครแซทเทลโลมาร์กเกอร์ในไม้พะยูนขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูน ซึ่งผลจากการพัฒนามาร์กเกอร์ดังกล่าว โดยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาเป็นชุดซ้ำแบบไดนิวคลีโอไทด์ชนิด (CT)₁₀ โดยใช้ MagneSphere® Magnetic Separation ในการแยกชิ้นดีเอ็นเอ ที่มีส่วนของไมโครแซทเทลโลมาร์กเกอร์ ในการหาลำดับเบสทั้งหมด 80 clones จาก genomic libraries ได้พบส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลโลมาร์กเกอร์ทั้งหมด 55 clones ซึ่งสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 42 คู่ไพรเมอร์ และทำการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 42 คู่ ในเบื้องต้นได้คัดเลือก 6 คู่ไพรเมอร์ที่มี polymorphism โดยมีตำแหน่งที่ให้อัลลีลต่ำสุดคือ 2 อัลลีล และตำแหน่งที่ให้อัลลีลสูงสุดคือ 4 อัลลีลโดยมีค่าเฉลี่ยของอัลลีลเท่ากับ 3.0 อัลลีลต่อตำแหน่ง

นอกจากนี้ได้นักวิจัยประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้พะยูนในประเทศเวียดนามโดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR (Vu Thi Thu Hien and Dinh Thi Phong, 2012)

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมไม้พะยุง จำนวน 35 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD และใช้เทคนิค ISSR ใช้เครื่องหมายจำนวน 52 Markers (RAPD 27 markers และ ISSR 25 markers) พบว่าผลการประเมินด้วยเทคนิค RAPD มีจำนวน 74 fragments โดยที่ 31 fragments เป็น Polymorphic โดยมีค่าเฉลี่ยความเป็น Polymorphic เป็น 1.148 polymorphic bands ต่อไพรเมอร์ จำนวน fragment ที่ทำการ amplify มีความแปรผันจาก 1 (OPR15, OPB05, RA142, OPR08, UBC348, OPE14 and OPO04) จนถึง 8 (OPP19) มีขนาดความยาวจาก 250 ถึง 1600 Base pair (bp) และผลการประเมินด้วยเทคนิค ISSR มีจำนวน 94 fragments โดยที่ 64 fragments เป็น Polymorphic โดยมีค่าเฉลี่ยความเป็น Polymorphic เป็น 2.560 polymorphic bands ต่อไพรเมอร์ จำนวน fragment ที่ทำการ amplify มีความแปรผันจาก 1 (ISSR8, ISSR13 and ISSR18) จนถึง 6 (ISSR3, ISSR15 and ISSR61) มีขนาดความยาวจาก 300 ถึง 2,000 Basepairs (bp) ผลการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ 35 จีโนไทป์ ให้จำนวนอัลลีลที่แตกต่างกันประสิทธิภาพของจำนวนอัลลีล โดยเมื่อดูที่ค่า Shannon's information index ค่า ntralocus gene diversity และ Nei's gene diversity พบว่าเทคนิค RAPD เท่ากับ 1.149, 1.125, 0.109, 0.366 1.284, 1.246, 0.206, 0.732 และ 0.156 ตามลำดับ ในเทคนิค ISSR มีค่าเท่ากับ 1.225, 1.193, 0.164, 0.542 และ 0.124 ตามลำดับใน RAPD + ISSR ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิค RAPD หรือ ISSR หรือรวมเทคนิค RAPD และ ISSR สามารถนำมาใช้ในการกำหนดความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้พะยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนงานวิจัยด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ในสกุลพะยุงที่มีรายงานอื่นๆ ได้แก่ Andrianoelina *et al.* (2006) ได้ใช้เครื่องหมาย RAPD และเครื่องหมาย SSR จากส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้น *D. monticola* ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นที่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในมาดากัสกา รวมถึง Rout *et al.* (2003) ได้ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพันธุ์ไม้ต่างๆ ในสกุลพะยุงจากประเทศอินเดีย

2.2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยุง

2.2.3.1 การกระจายพันธุ์ของพะยุงตามธรรมชาติในประเทศไทย

วิชาญ เอียดทอง และ สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ (2557) ได้ทำการศึกษาลักษณะนิเวศแหล่งกระจายพันธุ์และสถานภาพทางประชากรของต้นพะยุงในประเทศไทย พบว่าสำหรับประเทศไทยจะพบไม้พะยุงได้ตามธรรมชาติ มีเขตกระจายพันธุ์ครอบคลุมทางภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบขึ้นอยู่ในสังคมพืชป่าดิบแล้ง สังคมพืชรอยต่อป่าดิบแล้งกับป่าเต็งรัง สังคมพืช

รอยต่อป่าดิบแล้งกับป่าเบญจพรรณ และหาพบได้ยากในป่าเต็งรัง เป็นพื้นที่ที่มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลางตั้งแต่ 100 - 775 เมตรใน เขตภูมิอากาศแบบทุ่งและมรสุมเขตร้อน มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายปีอยู่ในช่วงตั้งแต่ 980 - 6,463 มิลลิเมตร องค์ประกอบพืชพรรณพบว่าเป็นพื้นที่ไม้เรือนยอดชั้นบนเด่นที่ขึ้นร่วมอยู่ด้วยได้แก่ กระบก มะพอก และประดู่ป่า ทุกพื้นที่ที่มีปัญหาคุกคามของการลดลงของประชากรต้นพะยุงเกิดจากการลักลอบตัดฟันอย่างผิดกฎหมาย รายละเอียดการกระจายแสดงใน Figure 3

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพะยุงในประเทศไทยยังมีข้อมูลอยู่ไม่มากนักนี้จากการศึกษาการประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนมของ ราตรี อยู่ยีน (2556) เพื่อประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุงโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม และทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากส่วนของเปลือกไม้ เนื้อไม้ และใบของต้นพะยุง ผลการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมคือ วิธีประยุกต์ของ Sharma et al. (2002) จากการตรวจสอบส่วนต่างๆของคลอโรพลาสต์จีโนมที่เป็น non-coding region จำนวน 8 ส่วน พบว่ามี 3 ส่วน ได้แก่ trnS-trnG trnV-trnM และ trnC-ycf6 ที่มีความผันแปร สามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรม ส่วนของดีเอ็นเอที่ศึกษาทั้ง 3 ส่วน มีความยาวรวม 1,841 นิวคลีโอไทด์ ในจำนวนดังกล่าวมีตำแหน่งที่มีความผันแปร รวม 10 ตำแหน่ง โดยเป็น SNP 8 ตำแหน่ง และ INDEL 2 ตำแหน่ง ผลการศึกษา พบว่าในระหว่าง 9 แหล่ง ที่มาจากแหล่งธรรมชาติ คือ จังหวัดสระบุรี อุบลราชธานี มุกดาหาร มหาสารคาม (2 แหล่ง) สกลนคร ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และเวียงจันทน์ และอีก 1 แหล่ง จากแปลงปลูกสถานีวิจัยก้างเพชร์ จำแนกได้ 11 รูปแบบ (Haplotypes) โดยแหล่งนาคุณ จ.มหาสารคาม มีรูปแบบมากที่สุด 4 รูปแบบ และน้อยที่สุด 1 รูปแบบ คือ แหล่งภูผาเหล็ก จ.สกลนคร และเวียงจันทน์ เป็นรูปแบบที่พบในทุกแหล่งยกเว้น จ.สระบุรี ซึ่งเป็นเพียงแหล่งเดียวเท่านั้นที่สามารถนำไปใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ระบุแหล่งที่มาได้ คือ แหล่งมวกเหล็กใน จ.สระบุรี ทั้งนี้เพราะรูปแบบที่พบมีเฉพาะแหล่งสระบุรีเท่านั้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและแหล่งที่ใช้ศึกษาจะเพิ่มความแม่นยำของผลการศึกษาให้นำไปประยุกต์ใช้เพื่อวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้พะยุงและสนับสนุนการบังคับใช้กฎหมายได้มากขึ้น นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรไม้พะยุงที่ศึกษาในครั้งนี้ พบว่าไม่ปรากฏโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนหรือไม่แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากประชากรส่วนใหญ่มีการปรากฏของ haplotype H1 ยกเว้นแต่ประชากร อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.สระบุรี ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ Analysis of molecular variance (AMOVA) ที่แสดงความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่าความผันแปรระหว่างประชากร ส่วนการทดสอบสมดุทาง

วิวัฒนาการของประชากร “Neutral theory” ด้วยค่าสถิติ Tajima’s D และ Fu and Li’s D* and F* พบว่าประชากรไม้พะยุงยังอยู่ภายใต้สมดุล แสดงว่าความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรไม้พะยุงที่ศึกษาได้รับอิทธิพลจากสมดุลระหว่าง Mutation และ Genetic drift

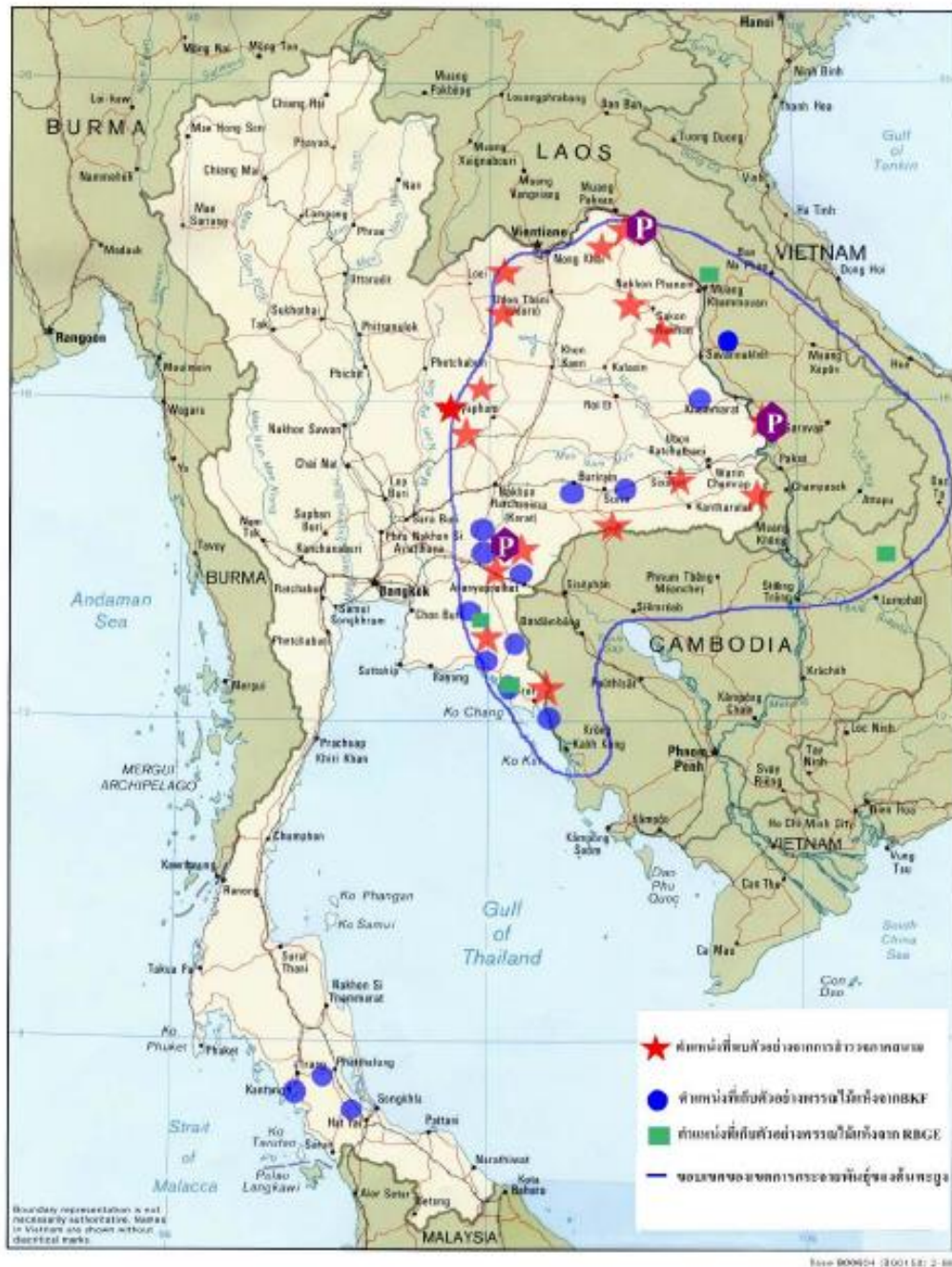


Figure 3 *Dalbergia cochinchinensis* Pierre distribution map in Thailand.

Source : (Wichan Eiadthong and Suwan Tangmitcharoen, 2013)

2.2 การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ

ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมพะยูนจะเป็นประโยชน์และองค์ความรู้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสายพันธุ์ดี โดยมีเทคนิคในการเก็บรักษาดูแลอย่างดีให้มีชีวิตอยู่ยาวนาน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทันที เพื่อป้องกันการเสื่อมพันธุกรรมหรือการสูญหายทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งถือเป็นมรดกอันล้ำค่าให้แก่ลูกหลานได้ใช้ประโยชน์ในการพัฒนาประเทศต่อไป จึงจำเป็นต้องการวิจัยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมพะยูนสายพันธุ์ดีของกรมป่าไม้ไว้ เพื่ออนุรักษ์ได้ยาวนานเหมาะสมสำหรับนำออกมาใช้ประโยชน์ในการวิจัยพัฒนาทั้งในปัจจุบันและอนาคต

ปัจจุบันพืชที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์หรือคาดว่าจะมีประโยชน์ในอนาคต โดยพันธุ์พืชป่าไม่มีค่าหลายชนิดกำลังอยู่ในสถานะเสื่อมใกล้สูญพันธุ์ เช่น พะยูน ชิงชัน ฯลฯ ไม่เศรษฐกิจบางชนิดที่กรมป่าไม้ได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์มาหลายยุคสมัยจนได้สายพันธุ์ใหม่ ได้แก่ ไม้สัก จำนวน 10 สายพันธุ์ พะยูน 22 สายพันธุ์ ไม้กระถินณรงค์ลูกผสม 6 สายพันธุ์ และชนิดไม้ที่ได้รับการประกาศรับรองให้เป็นพืชสายพันธุ์ใหม่เรียบร้อยแล้ว คือ ไม้ยูคาลิปตัส 5 สายพันธุ์ มีความพร้อมในแง่ของการเป็นพืชตั้งต้นในการผลิตกล้าไม้สายพันธุ์ดีได้ ดังนั้นเชื้อพันธุกรรมพืชเหล่านี้ต้องได้รับการเก็บรักษาดูแลอย่างดีให้มีชีวิตอยู่ยาวนาน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทันที เพื่อป้องกันการเสื่อมพันธุกรรมหรือการสูญหายทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งถือเป็นมรดกอันล้ำค่าให้แก่ลูกหลานได้ใช้ประโยชน์ในการพัฒนาประเทศต่อไป จึงจำเป็นต้องการวิจัยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมพะยูนสายพันธุ์ดีของกรมป่าไม้ไว้ ทั้งด้านการจัดการเมล็ดไม้เพื่อให้ได้เมล็ดพะยูนที่มีคุณภาพ ทดสอบคุณภาพเมล็ด การมีชีวิต เพอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพะยูนสายพันธุ์ดีของกรมป่าไม้ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวโมเลกุลในการฐานข้อมูลพันธุกรรมแม่ไม้พะยูน การเก็บรักษาพันธุกรรมพะยูนสายพันธุ์ดีด้วยเทคนิคการทำเมล็ดเทียม (artificial Seeds) การตรวจสอบความเสถียรภาพของพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล ตลอดจนมีธนาคารพันธุกรรมพืชที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น เพื่ออนุรักษ์ได้ยาวนานเหมาะสมสำหรับนำออกมาใช้ประโยชน์ในการวิจัยพัฒนาทั้งในปัจจุบันและอนาคต

การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชถือเป็นปัจจัยสำคัญในด้านความมั่นคงทางทรัพยากรป่าไม้ของประเทศ ปัจจุบันประเทศไทย โดยกรมวิชาการเกษตร และสำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (biotech) ได้มีการพัฒนาศักยภาพการเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และมีธนาคารเชื้อพันธุ์พืชที่สามารถเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชได้ถึง 32,717 accessions ซึ่งประกอบด้วยห้องอนุรักษ์ระยะปานกลาง (5 องศาเซลเซียส) มี capacity 150,000 accessions ใช้

ระบบ automatic bullet crane system และห้องอนุรักษ์ระยะยาว (-10 องศาเซลเซียส) บรรจุด้วย vacuum-sealed aluminum foil capacity 40,000 accessions โดยมีการพัฒนากระบวนการงานด้านฐานข้อมูลและพัฒนาบุคลากรในธนาคารอยู่เสมอ เพื่อรองรับความต้องการของโลกในอนาคต สำหรับในการเก็บรักษาและอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชป่านั้น มีหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กรมป่าไม้ ได้เก็บรักษาพันธุกรรมในรูปแบบของแปลงปลูกทดสอบเปรียบเทียบสายพันธุ์ แปลงวิจัยการทดสอบลูกหลาน แปลงอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม ที่สถานีวิจัยที่ตั้งอยู่ตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีการเก็บรักษาพันธุกรรมในรูปแบบของเมล็ดพันธุ์ไม้ โดยเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเท่านั้น ซึ่งมีข้อจำกัด ไม่สามารถเก็บรักษาได้ในระยะยาว

การอนุรักษ์พันธุกรรมพันธุ์ไม้ป่าหายาก เป็นกิจกรรมที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการรักษาไว้ซึ่งแหล่งพันธุกรรม (gene pools) เพื่อป้องกันมิให้เกิดการสูญเสียไปซึ่ง Genes, Gene complexes, Genotypes และการสูญเสียพันธุ์ของพืชป่า มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษยชาติต่ออดีต ปัจจุบันและในอนาคตเป็นอย่างยิ่ง พันธุกรรมพืชถือเป็นทรัพยากรที่มีค่าและมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทรัพยากรพันธุ์ไม้ป่าหายากเหล่านี้ อาจจะสูญหายไป เนื่องจากขาดความรู้ของการใช้ทรัพยากรเหล่านี้ การจะเพิ่มองค์ความรู้และความตระหนักถึงความสำคัญของความหลากหลายทางพันธุกรรมพันธุ์ไม้ป่าหายาก นั้นมีการนำวิทยาการในการจำแนกและการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชมาเป็นส่วนสำคัญในการถ่ายทอดองค์ความรู้ต่อมนุษยชาติ เพื่อที่จะได้ช่วยกันดำรงทรัพยากรพันธุกรรมพันธุ์ไม้ป่าหายากเพื่อคงความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้นี้ให้ยั่งยืนและถูกต้องตามหลักวิชาการ

การดำเนินการจำแนกพืชโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน แต่บางครั้งเราก็ไม่สามารถจำแนกพืชได้ถูกต้อง ด้วยลักษณะดังกล่าวจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคต่าง ๆ มาประกอบในการช่วยการจำแนกพันธุ์พืช การศึกษาทางเคมีและชีวเคมีภายในต้นพืชเพื่อใช้กับงานด้านการจำแนกพันธุ์พืชมีมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้โมเลกุลของ โปรตีน เอนไซม์หรือกรดนิวคลีอิก นับเป็นวิธีหนึ่งที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างต้นพืชได้ว่าเหมือนกันหรือต่างกัน เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลโปรตีนหรือเอนไซม์โดยตรงก่อนที่จะสร้างโมเลกุลอื่น ดังนั้น ลักษณะทางพันธุกรรมของพืชย่อมอาศัยดีเอ็นเอ เอนไซม์หรือโปรตีนเป็นตัวบ่งชี้ได้ จำแนกพันธุ์พืชจากลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว นั้นนับว่าเป็นวิธีที่สะดวกแต่อาจจะยุ่งยากได้ถ้าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้ไม่เห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้เด่นชัด

บางครั้งไม่สามารถเก็บตัวอย่างหรือชิ้นส่วนของพืชได้ครบสมบูรณ์ทุกส่วนจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการพิจารณาความแตกต่างระหว่างพันธุ์อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม เพื่อเก็บรักษาพันธุ์พืชที่กำลังจะสูญพันธุ์ แต่อาจมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคตไว้ เก็บรักษาประชากรพืชที่มีคุณลักษณะพิเศษสำหรับการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์พืชไว้ เช่น มีความต้านทานต่อโรคและแมลง หรือทนความแห้งแล้งได้ดี เก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ใช้เป็นประชากรสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป เก็บรักษาประชากรพืชที่เป็น Marginal population ที่อาจมีความสำคัญในอนาคตไว้ เพราะมีลักษณะที่ค่อนข้างเด่น (Nearly distinct) อยู่ เก็บรักษาพันธุ์พืชไว้สำหรับเป็นแหล่งงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ในอนาคต ใช้เป็นแหล่งผลิตเมล็ดก่อนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนเป็นหลักประกันว่าการสูญเสียลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic loss) จากการทำ Selective Breeding จะไม่เกิดขึ้นเพราะได้ทำการรักษาพันธุ์เดิมไว้แล้ว

Figure 4

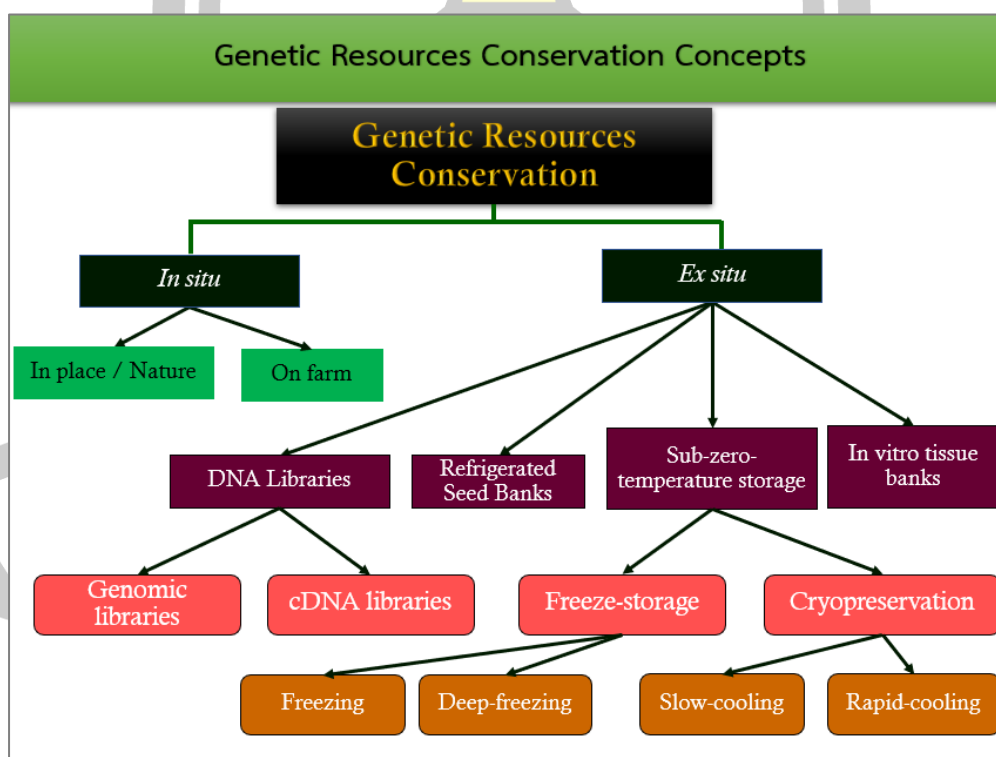


Figure 4 Guidelines for genetic resource conservation.

source : (Kulus, 2018)

เมล็ดไม้เป็นปัจจัยสำคัญสูงสุดประการหนึ่งของการส่งเสริมการปลูกสร้างสวนป่า การใช้เมล็ดที่มีคุณภาพที่เก็บจากแหล่งเมล็ดพันธุ์ดีที่มีคัดเลือกแม่ไม้ที่ได้มาตรฐานจะทำให้การปลูกป่ามีประสิทธิภาพมากขึ้น เมล็ดที่มีคุณภาพจะหมายถึงเมล็ดที่มีความแข็งแรง (vigor) สามารถงอกได้เร็ว มีความสม่ำเสมอในการงอกและการพัฒนาของต้นกล้าภายใต้สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ต้นกล้าสามารถเจริญได้รวดเร็ว มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการพัฒนาที่ปกติ ให้ผลผลิตที่ดี สามารถเก็บเมล็ดไว้ได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เนื่องจากเมล็ดที่มีความแข็งแรงสามารถงอกได้รวดเร็วและต้นกล้าก็สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ดังนั้นเมล็ดที่มีความแข็งแรงจึงยอมให้กล้าไม้ที่แข็งแรงด้วยเช่นเดียวกัน เมล็ดที่มีคุณภาพจะต้องเป็นเมล็ดที่มีคุณภาพทั้งทางด้านพันธุกรรม (genetic quality) สรีระ (physiological quality) กายภาพ (physical quality) และสุขภาพเมล็ด (seed health) (บัณฑิต, 2545) การพิจารณาว่าเมล็ดพันธุ์ มีคุณภาพดีหรือไม่นั้น ต้องพิจารณาจากความบริสุทธิ์ (purity) ความงอก (germination) ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ (seed moisture content) ความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ (varietal purity) ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (seed vigor) ขนาดและน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์โรคและแมลงที่ติดมากับเมล็ด ความสม่ำเสมอของเมล็ดพันธุ์ (homogeneity) เมล็ดที่ได้รับอันตรายอันเกิดจากการใช้เครื่องจักรกลต่าง ๆ (mechanical damage) และแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ (จวงจันท์ ดวงพัตรา, 2529)

การผลิตเมล็ดเทียม (Artificial seeds, Syn-seeds หรือ Synthetic seeds) คือเมล็ดที่ไม่ใช่เมล็ดพืชจริง ๆ เป็นเมล็ดพืชที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแต่เกิดขึ้นมาจากการเพาะทางวิทยาศาสตร์โดยการนำเอาชิ้นส่วนพืช (explant) ได้แก่ โขมาติกเอ็มบริโอ ปลายยอด ตา ขั้วและโปรโตคอร์มาเคลือบด้วยสารที่มีลักษณะคล้ายเจล เช่น Alginate เพื่อสร้างแคปซูลขึ้นมาห่อหุ้มล้อมรอบชิ้นส่วนพืชได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องและเติมสารที่เป็นแหล่งของอาหารเคลือบก่อนที่จะนำไปเคลือบเพิ่มอีกหนึ่งชั้นด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (artificial seed coat) แล้วทำให้เมล็ดเทียมงอกเป็นต้น (สมยศ มีสุข, 2541) ทั้งนี้ (Murashige, 1977) เป็นนักวิจัยคนแรกๆที่เริ่มคิดเกี่ยวกับการทำเมล็ดเทียม สำหรับหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกพืชเพื่อผลิตเมล็ดเทียมความดำเนินการในพืชกลุ่มที่มีความสามารถในการเกิดอวัยวะ (organogenesis) หรือโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ได้ดี จำนวนมากและปริมาณสูงเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นพืชที่มีความต้องการทางการค้าสูง เช่น เมล็ดจริงมีราคาสูงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาจากการผสมพันธุ์ ความไม่เสถียรของยีน หรือต้นทุนในการผลิตสูง ตลอดจนเป็นพืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ สมุนไพรหรือพืชเศรษฐกิจ

การทดสอบความเสถียรภาพทางพันธุกรรมของพืช ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการ Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคชีวโมเลกุลที่อาศัยหลักการของวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น หลังจากนั้นนำผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ซึ่งใช้เป็น marker ในการจำแนกพันธุกรรมพืชเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์หรือเปรียบเทียบพันธุกรรมของลูกหลานว่ามีความแตกต่างจากต้นแม่หรือไม่หรือไม่อย่างไร

2.2.1 การอนุรักษ์พันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช อาทิเช่น ส่วนอวัยวะหรือส่วนเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมความเติบโต ภายใต้สภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และอยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ แสง ความชื้น โดยส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงนี้จะสามารถเติบโตพัฒนาได้หลายรูปแบบ เช่น การพัฒนาเป็นส่วนของอวัยวะ เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส หรือ คัพพะ (ต้นอ่อนขนาดเล็ก) ที่เรียกว่า เอ็มบริโอ ซึ่งในที่สุดก็จะสามารถบังคับให้ส่วนต่างๆ เหล่านี้เกิดเป็นต้นใหม่ที่มีรากที่สมบูรณ์สำหรับการนำไปปลูกลงดินต่อไปได้

ชนิดพืชที่ควรได้รับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรมีคุณสมบัติคือ เป็นไม้ที่ตลาดต้องการมาก อยู่ในรายชื่อพันธุ์ไม้ในบัญชีปลูกสร้างสวนป่า เป็นชนิดไม้ที่กำลังอยู่ระหว่างการปรับปรุงพันธุ์ เป็นชนิดไม้ที่เมื่อใช้เมล็ดปลูกจะมีความผันแปรทางพันธุกรรมมาก ตลอดจนเป็นพันธุ์ไม้ที่หายาก ซึ่งประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

- 1) สามารถขยายพันธุ์ไม้ได้ครั้งละมากๆ
- 2) แก้ปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนเมล็ดไม้สำหรับขยายพันธุ์
- 4) พันธุ์ไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะเติบโตเท่า ๆ กัน
- 5) ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่า
- 6) ใช้สนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า
- 7) เพื่อความสะดวกในการแลกเปลี่ยนวัสดุพันธุกรรมระหว่างประเทศ

2.2.1.1) การเลือกชิ้นส่วนจากต้นพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเลือกชิ้นส่วนพืชจากต้นพืชเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จในการขยายพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชอาจเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เนื้อเยื่อ (tissue) หรืออวัยวะ (organ) ซึ่งต้องได้จากต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอายุของต้น พืชการปลูกดูแลรักษาสภาพแวดล้อมที่ต้นพืชนั้นได้รับและรวมถึงฤดูกาลด้วยชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญตายอด ตาข้าง ช่อดอก ใบ และราก เป็นต้น

2.2.1.2) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (สูตรอาหารสังเคราะห์) สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง สิ่งที่สำคัญอันดับต้นๆ คือ องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม ซึ่งต้องประกอบด้วยอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของพืช และพืชสามารถนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ได้แก่ สารอนินทรีย์ สารประกอบอินทรีย์ สารที่ได้จากธรรมชาติ สารไม่ออกฤทธิ์ เป็นต้น

2.2.1.3) ลักษณะของสารอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

โดยทั่วไปอาหารสังเคราะห์ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ 2 สภาพคือสภาพอาหารแข็งและสภาพอาหารเหลว อาหารแข็งเป็นอาหารที่มีการเติมสารเพื่อให้อาหารเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพแข็ง เช่น วุ้นและเจลไลต์ (gelrite) เพื่อให้เนื้อเยื่อไม่พะยุงสามารถสัมผัสกับอาหารและอากาศ ส่วนอาหารเหลวเป็นอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีการเติมสารที่ทำให้อาหารเปลี่ยนสภาพ นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อชักนำเนื้อเยื่อให้เป็นแคลลัส ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชเมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวจะจมอยู่ในอาหารทำให้ขาดออกซิเจนจึงจำเป็นต้องวางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อเป็นการเติมออกซิเจนลงในอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึงจึงทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาได้ดี การเพาะเมล็ดสามารถเพาะได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ถ้าเมล็ดติดกันเป็นก้อนควรเพาะในอาหารเหลวมากกว่าเพื่อเมล็ดสามารถหลุดออกจากกันและสามารถจัดการได้ง่าย (คำคุณ กัญจนภูมิ, 2544)

2.2.1.4) องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1) ธาตุอาหารสารอนินทรีย์ (inorganic substances) ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) เช่น NO_3^- ฟอสฟอรัส (P) เช่น PO_4 โพแทสเซียม (K) เช่น รูปของเกลือ K แคลเซียม (Ca) เช่น $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ แมกนีเซียม (Mg) เช่น MgCl_2 และ MgSO_4 และซัลเฟต

(S) เช่น รูปเกลือซัลเฟตทั่วไป (จิตราพรรณ พิสิฏ, 2536) และธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก (Fe) เช่น Ferrous sulfate Ferrous phosphate และ Fe-EDTA แมงกานีส (Mn) เช่น MnSO_4 ทองแดง (Cu) เช่น CuSO_4 สังกะสี (Zn) เช่น ZnCl_2 คลอรีน (Cl) เช่น แคลเซียมคลอไรด์ และ NaCl_2 โมลิบดีนัม (Mo) เช่น Na_2MoO_4 (จิตราพรรณ พิสิฏ, 2536)

2) ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญ (plant hormone, plant growth regulators) เป็นชื่อรวมที่ใช้เรียกรวมทั้งสารที่เกิดจากธรรมชาติและสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการเติบโตของพืช ถ้าเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ ซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเองจะเรียกว่าฮอร์โมนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน (auxins) การขยายขนาดของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเปียม การขยายขนาดของใบ ผล การเกิดราก ป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล เช่น กรดอินโดล-3-แอซีติก (indole-3-acetic acid: IAA) กรดอินโดล-3-บิวทีริก (indole-3-butyric acid : IBA) กรด 1-แนฟทาไลน์แอซีติก (1-Naphthaleneacetic acid: NAA) กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีแอซีติก (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid : 2,4-D) และไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น เบนซิลอะดีนีน (benzyladenine : BA) ไคเนติน (kinetin: Kn) ซีเอติน (zeatin :) ไซโตไคนินมีผลทำให้เกิดเป็นต้นได้ใหม่จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดยอด สารทั้งสองกลุ่มนี้จะมีปฏิกริยาร่วมกันและยังได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอีกด้วย เช่น แสง อุณหภูมิ สิ่งที่สำคัญที่สุดคืออาหารจะต้องมีอัตราส่วนและชนิดของฮอร์โมนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยง

นอกจากนี้ยังมีฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญ (plant hormone, plant growth regulators) ได้แก่ สารในกลุ่มจิบเบอเรลลิน (gibberellins) ทำหน้าที่กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์, ทำลายการพักตัวของพืช เอทิลีน (ethylene) ทำหน้าที่ผลควบคุมการแก่ชรา การสุก รวมทั้งการออกดอกของพืชบางชนิด และสารชะลอการเติบโตของพืช (plant growth retardants) จะยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในพืชทำให้พืชมีข้อสั้น

3) น้ำตาล (sugar) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญมากในอาหารทุกสูตร และจำเป็นในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช เพราะว่าการสังเคราะห์ด้วยแสงของชิ้นส่วนพืชยังไม่เพียงพอ ดังนั้นพืชจึงยังต้องการแหล่งพลังงานจากอาหาร โดยปกติจะเติมน้ำตาลลงในอาหารประมาณ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช โดยทั่วไปพืชอายุน้อยหรือเอ็มบริโอต้องการน้ำตาลค่อนข้างสูง เมื่อให้น้ำตาลมากขึ้นการเจริญและการเติบโตของเอ็มบริโอจะดีขึ้น แต่จะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งเท่านั้น ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารสูงเกินไป การเจริญของเอ็มบริโอ

จะลดลง น้ำตาลที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง นิยมใช้น้ำตาลซูโครส ซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ประกอบด้วยซูโครส 99.94 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 0.02 เปอร์เซ็นต์และสารอื่น ๆ อีก 0.04 เปอร์เซ็นต์ สำหรับน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่พบมากในพืช ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสกับกลูโคสมา รวมกันเป็นผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเป็นกระบวนการที่แสงและคลอโรฟิลล์ช่วย เปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นคาร์โบไฮเดรตและปล่อยออกซิเจนออกมา แต่ในพืชที่นำมา เพาะเลี้ยงในอาหารไม่สามารถจะสร้างน้ำตาลขึ้นมาใช้ได้ทั้งหมดตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องเติม น้ำตาลในความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 30 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารส่วนใหญ่ น้ำตาลทรายจากอ้อยและจาก หัวผักกาดหวานจะมีซูโครสอยู่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถหาซื้อได้ง่ายจากร้านขายของชำจึง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง (จิตรพรพรณ พิลิก, 2536)

4) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารหรือที่เรียกว่าพี เอช เป็นตัวที่บอกว่าไอออนของไฮโดรเจนอยู่ในสารละลายมากน้อยเพียงใด พีชชนิดต่างๆ จะ ต้องการพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน สารละลายที่เป็นกลางจะมีพีเอช 7.0 ถ้าเป็น ด่างพีเอชจะสูงกว่า 7.0 และถ้าเป็นกรดค่าพีเอชจะต่ำกว่า 7.0 สารละลายที่มีพีเอช 6 จะมีไฮโดรเจน ไอออน (H^+) สูงกว่าที่พีเอช 7 สิบเท่า ในทำนองเดียวกันในสารละลายที่มีพีเอช 5 ก็จะมีไฮโดรเจน ไอออนเป็น 10 เท่าของพีเอช 6 แต่ในทางตรงกันข้ามพีเอช 8 จะมีไฮดรอกซิลไอออน (OH^-) ใน สารละลายเป็น 10 เท่าของพีเอช 7 ค่าพีเอช ที่นิยมใช้ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงมักจะอยู่ในช่วงพี เอช 4.5 และพีเอช 5.7 ส่วนใหญ่จะใช้พีเอช 5.0 - 6.0 ถ้าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปการเจริญของพืชจะ ชะงัก โดยทั่วไปการตอบสนองของพืชมักจะไม่วิต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในช่วงนั้น ๆ แต่ บางครั้งพีเอชมีผลต่อการเจริญของพืช พีเอชของสารอาหารจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อนำอาหารไปหนึ่งซึ่ง ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ถ้าก่อนนึ่งอาหารมีพีเอช 5.0 - 7.0 ภายหลังจากนึ่งแล้วพีเอชของ อาหารจะลดลงประมาณ 0.3 - 0.5 หน่วย ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจจะมีการใช้สารบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมพีเอช ของอาหารบัฟเฟอร์ที่ใช้ ได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์อาจจะทำให้สาร บางอย่างในอาหารเปลี่ยนไปบ้าง ถ้าพีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงไปมากอย่างเห็นได้ชัด คือ อาหาร แข็งจะกลายเป็นอาหารเหลว ถ้าในการเตรียมอาหารเมื่อเติมสารละลายเกลือแร่ทั้งหลายครบถ้วนแล้ว แต่พีเอชของสารละลายยังไม่อยู่ในช่วงที่ต้องการพีเอชของอาหารสูงหรือต่ำเกินไปจะปรับพีเอชได้โดย ใช้ NaOH หรือ HCl ในความเข้มข้น 0.1 - 1.0 M (คำณูณ กาญจนภูมิ, 2544)

5) วุ้น (agar) วุ้นเป็นสารประกอบของน้ำตาลหลายโมเลกุล (polysaccharide) 2 กลุ่มคือ เอกาโรส (agarose) และเอกาโรเพกติน (agarpectin) ซึ่งสกัดได้จากสาหร่ายทะเลให้วุ้น (agarophytes) เป็นสาหร่ายสีแดงในดิวิชันโรโดไฟตา (division Rhodophyta) สาหร่ายให้วุ้นที่มา

จากแหล่งต่างกันจะให้วุ้นในปริมาณและคุณภาพที่ต่างกันไป สำหรับมาตรฐานของสาหร่ายให้วุ้น จะกำหนดจากองค์ประกอบต่าง ๆ ของสาหร่าย ได้แก่ สี ความแห้ง ความแข็งของวุ้น และปริมาณวุ้นที่ได้รวมทั้งความบริสุทธิ์ของสาหร่าย และปริมาณสิ่งเจือปนอื่น ๆ คุณภาพของวุ้นจะขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งที่มาของสาหร่าย สภาพแวดล้อมของทะเล รวมทั้งกรรมวิธีการสกัด ได้แก่ การกำจัดสิ่งเจือปนก่อนสกัด อุณหภูมิ ความดัน พีเอช และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดมีคุณสมบัติในการอ้วนน้ำให้สารคงรูปที่มีลักษณะแข็ง ยืดหยุ่น ที่เรียกว่าเจล เมื่อเจลได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 85 องศาเซลเซียสก็จะหลอมละลายอยู่ในรูปของเหลว แต่สามารถย้อนกลับมามีอยู่ในรูปของเจลอีกครั้ง เมื่ออุณหภูมิลงมาถึง 35 - 40 องศาเซลเซียส วุ้นทำให้อาหารแข็งพอที่จะช่วยพยุงชิ้นพืชและกึ่งเหลวพอที่จะทำให้สารอาหารต่าง ๆ แพร่ผ่านเข้าสู่พืชได้วุ้นมีแร่ธาตุบางตัวอยู่ด้วย วุ้นเป็นส่วนผสมของอาหารแข็งที่มีราคาแพงที่สุด วุ้นมักจะมีสารต่าง ๆ เจือปนอยู่ด้วยความไม่บริสุทธิ์ของวุ้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแหล่งผลิตที่สาหร่ายเจริญอยู่และวิธีการผลิต (ภุมรินทร์ คงมณี, 2544)

2.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้นสกุล *Dalbergia*

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้พะยูนในประเทศไทยหลายปีที่ผ่านมา มีทีมงานวิจัยต่าง ๆ ให้ความสนใจกันอย่างกว้างขวาง จะเห็นได้จากโครงการวิจัยที่เสนอของบประมาณจากสภาวิจัยแห่งชาติเพื่อทำการวิจัยในเรื่องนี้ หรือแม้แต่ประเทศเพื่อนบ้านอย่างกัมพูชา ก็ได้ขอทุนจากประเทศเกาหลีผ่าน AFOCO เพื่อสร้างห้องปฏิบัติการเพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม้พะยูนเป็นเป้าหมายหลักที่จะทำการศึกษา (AFOCO, 2015) รายงานความก้าวหน้าในเรื่องนี้ยังมีน้อยมาก แต่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ตระกูล *Dalbergia* อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกัน เช่น ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain) ประดู่ แข ก (*Dalbergia sissoo* Ssensu Miq.) East Indian Rosewood (*Dalbergia latifolia*) และ Malabar blackwood (*Dalbergia sissooides* Wight & Arn) อย่างไรก็ตามในแต่ละชนิดอาจใช้สูตร MS เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ปริมาณฮอร์โมนในสูตรอาหาร แต่ทั้งนี้การใช้ชนิดของฮอร์โมนที่ถูกต้องในอัตราส่วนที่เหมาะสมเติมลงไปสูตรอาหารเป็นสิ่งสำคัญที่สุด ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด ดังนั้นในการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้พะยูนจึงควรเริ่มต้นที่การค้นหานิตของฮอร์โมนและอัตราส่วนที่เหมาะสมในสูตรอาหาร

การศึกษาลงของอัตราส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินและออกซินในอาหารต่อการพัฒนาชิ้นพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพะยูน (จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์, 2558) โดยศึกษาถึงเทคนิคในการการฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ด เทคนิคการชักนำยอดจากชิ้นพืชส่วนปลายเหนือใบเลี้ยงและส่วนโคนที่มีใบเลี้ยง โดยใช้อาหาร MS ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นของ BA Kn และ IBA ต่าง ๆ 20 สูตรเพาะเลี้ยง

ในสภาพปลอดเชื้อ 45 วัน ผลการศึกษาพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดพะยูนสามารถทำได้ผลดี โดยใช้ไฮเตอร์ (6%) ความเข้มข้น 20-30 % ใส่ Tween 20 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาทีและฟอกซ้ำอีกครั้ง ด้วยไฮเตอร์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที เมล็ดงอกหมดภายใน 2 สัปดาห์ด้วยการแช่น้ำร้อน ทิ้งไว้ให้เย็นข้ามคืนก่อนเพาะ ขึ้นพืชส่วนโคนชักนำได้ยอดที่ดีกว่าจากชิ้นพืชส่วนปลายในทุกมิติแต่ไม่เกิดแคลลัส อัตราส่วนและระดับความเข้มข้นของไซโตไคนินและออกซินในอาหาร MS มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อการพัฒนาของยอด ทั้งปริมาณและคุณภาพของยอด สูตรอาหารที่มี IBA ผสมกับ BA ในอัตราส่วน 1:2 หรือ BA ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงชนิดเดียว มีแนวโน้มที่ชักนำให้ได้ยอดคุณภาพดีกว่าสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของ Kn

การศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารและแหล่งของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง (explant) ของไม้ประดู่แขก (*Dalbergia sissoo*) (Ali, Rizwan, Majid, Saleem, & Naveed, 2012) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการประเมินสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ประดู่แขก โดยใช้ชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยง คือ Nodal meristem ผลการศึกษาพบว่า อัตราการเกิดยอดที่ดีที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 1.0 mg/l BAP ร่วมกับเติม 0.25 mg/l NAA หลังจาก 10.8 วันของการเพาะเลี้ยง ความยาวเฉลี่ยของยอดเท่ากับ 2.4 เซนติเมตรหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 25 วัน สำหรับการเพาะเลี้ยงในหลอดแก้วเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนยอด (shoot multiplication) ด้วยสารอาหาร MS ที่เติมสาร BAP ความเข้มข้น 1.5 mg/l ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.25 mg/l สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้สูงสุด เท่ากับ 4.0 ยอดต่อขวดทดลอง ยอดมีความยาว 1.78 cm และเกิดรากหลังเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนการศึกษาการเกิดรากได้ดีที่อาหาร MS ที่เติมสาร IBA ความเข้มข้น 1.0 mg/l เกิดรากเฉลี่ย 3.4 รากต่อต้นอ่อน มีความยาวรากเฉลี่ย 1.8 เซนติเมตร หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 24 วัน ปัจจัยแวดล้อมในห้องเพาะเลี้ยง โดยที่มีช่วงอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงระหว่าง 23 – 30 องศาเซลเซียส และควบคุมแสง ที่ $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ที่ 16/8 ชั่วโมง (light/dark)

2.2.3 หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบดั้งเดิม ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงต้นพืชในอาหารแข็ง ซึ่งในระยะเพิ่มปริมาณต้นต้องมีการตัดถ่ายต้นที่เกิดออกมาใหม่ลงสู่อาหารใหม่ทุก 6-8 สัปดาห์ เนื่องจากอาหารหมดไม่เพียงพอต่อการเติบโตต่อไปได้ เมื่อเข้าสู่ระยะการออกรากที่จำเป็นต้องตัดต้นออกเป็นต้นเดี่ยว ๆ เพื่อถ่ายลงอาหารที่ชักนำให้เกิดราก ซึ่งเป็นการทำงานที่มี

ขั้นตอนหลายขั้นตอนและมีค่าใช้จ่ายสูง เป็นปัจจัยที่ทำให้ต้นทุนสูงถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมดและใช้เวลาในการผลิตมาก (Chu, 1995) ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิจัยได้ประดิษฐ์คิดค้นเครื่องมือที่จะช่วยแก้ปัญหาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม จึงมีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวมาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์พืช ซึ่งหลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวจะเป็นการให้สารละลายอาหารเหลวกับต้นพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยอาศัยระบบลม (pneumatic system) ที่มีระบบการกรองเชื้อจุลินทรีย์ การให้สารละลายอาหารเหลวกับชิ้นส่วนพืชจะให้ตามระยะเวลาและความถี่ของการให้อาหารต่อวันโดยสามารถกำหนดได้ด้วยเครื่องตั้งเวลา (timer) ซึ่งมีระบบการทำงานแบบกึ่งอัตโนมัติ ในปัจจุบันมีนักวิจัยนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ โดยมีการอ้างอิงแนวทางการปฏิบัติที่นักวิจัยได้รวบรวมข้อจำกัดและข้อดีของการใช้หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Etienne *et al.*, 1999) ตาม Figure 5 และมีรายละเอียด ดังนี้

- 1) เพื่อแก้ปัญหการให้พืชจมอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการจมอย่างต่อเนื่องมีผลทำให้พืชเติบโตและรูปร่างมีลักษณะผิดปกติ
- 2) เป็นการควบคุมปริมาณและการเปลี่ยนถ่ายออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เพียงพอ ช่วยให้การขาดออกซิเจนของชิ้นส่วนพืช เพราะมีการเติมอากาศเข้าไปในชุดขวดเพาะเลี้ยงผ่านชุดกรองเชื้อจุลินทรีย์ให้แก่ชิ้นส่วนพืชในขวดเพาะเลี้ยง
- 3) สามารถกำหนดปริมาณ ระยะเวลาและระบบการให้อาหาร ซึ่งหมายถึงระยะเวลาที่ชิ้นส่วนพืช (explants) มีโอกาสสัมผัสกับอาหารตามที่คุณวิจัยควบคุม และสามารถกำหนดความถี่ของการให้อาหารต่อวันได้ ซึ่งหมายถึงสามารถกำหนดช่วงเวลาที่ชิ้นส่วนพืชจะไม่สัมผัสอาหาร จึงทำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและได้รับอาหารที่เพียงพอ
- 4) สามารถจำกัดการใช้แรงดัน ควรกำหนดแรงดันไม่เกิน 1 บาร์
- 5) ระบบการให้อาหารเป็นแบบอัตโนมัติ กำหนดเวลาการให้อาหารได้ โดยอาศัยระบบลมดันอากาศดันให้สารละลายอาหารเหลวเข้าและออกจากชุดขวดเพาะเลี้ยง
- 6) ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากมีระบบการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากการกรองอากาศด้วยชุดกรองอากาศ
- 7) สามารถลดต้นทุนการผลิตในส่วนของการจ้างแรงงานในการตัดถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่ และต้นทุนในการใช้ขวดเพาะเลี้ยงเนื่องจากเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวไม่ต้องใช้ขวดเพาะเลี้ยงในการเปลี่ยนอาหารจำนวนมาก

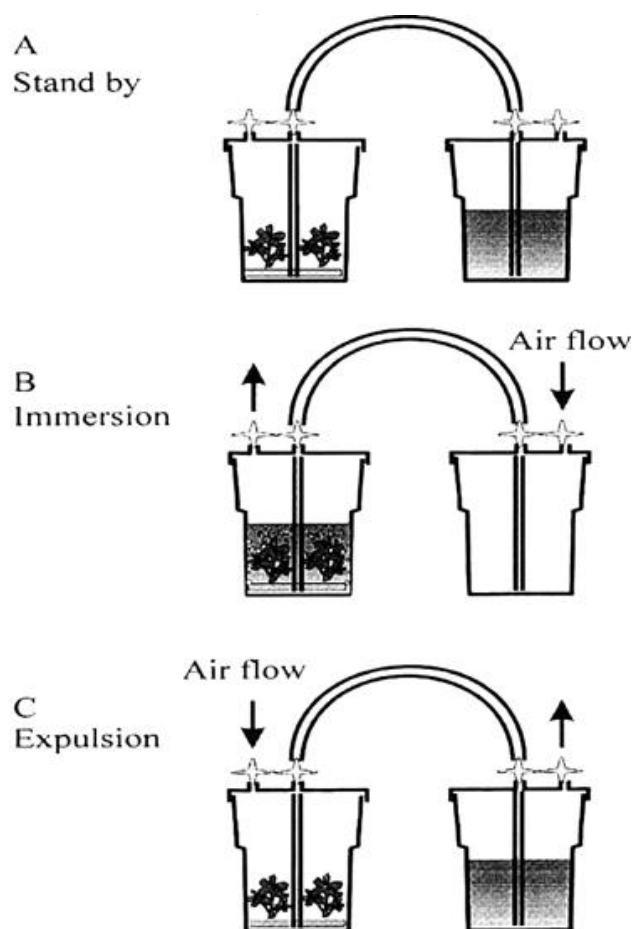


Figure 5 Process of temporary bioreactor system.

Source : (Etienne *et al.*, 1999)

สำหรับการวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงไม้พุ่มของประเทศไทยในปัจจุบันยังมีน้อย และเป็นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีดั้งเดิม จึงทำให้การขยายพันธุ์ไม้พุ่มในเชิงเศรษฐกิจยังมีอุปสรรค ซึ่งขัดแย้งกับที่ปัจจุบันประเทศไทยมีการตื่นตัวในการปลูกไม้พุ่มทั้งไม้ครัวเรือนและระบบสวนป่าเชิงพาณิชย์ ด้วยเหตุนี้จึงพบว่าในปัจจุบัน ยังไม่มีการนำระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวมาเป็นเครื่องมือในขยายพันธุ์ไม้พุ่มด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือแม้แต่พันธุ์ไม้ยืนต้นประเภทอื่นๆ ก็ยังมีน้อย การใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor systems) ในการเพาะเลี้ยงพืชกลุ่ม Woody Species นั้นประสบผลสำเร็จเมื่อใช้ระบบแบบจมชั่วคราว การประยุกต์ใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชอายุสั้น อาทิเช่น *Alocasia amazonica* (Jo *et al.*, 2008) , *Theobroma* (Niemenak *et al.*, 2008), *Kalopanax septemlobus* (Kim *et al.*, 2011), *Liriodendron tulipifera* (An *et al.*, 2016)

สำหรับพืชป่าที่จัดว่าเป็นไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นยูคาลิปตัสลูกผสม *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* hybrid (Máximo et al., 2018) พบว่าเมื่อใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวมาใช้ในการเพาะเลี้ยงพบว่าให้ประสิทธิภาพและประสิทธิผลที่ดีสามารถผลิตกล้าไม้ได้จำนวนมาก นอกจากนี้ในต่างประเทศที่ได้มีการนำระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไม้สัก *Tectona grandis* L. ที่ประเทศคิวบา โดย Quiala et al., (2012) ทำการศึกษาการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยอดของไม้สักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวและการเติมสาร BA ที่ความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งการศึกษานี้จัดว่าเป็นครั้งแรกของประเทศคิวบาที่ได้มีการนำระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้สัก ผลการศึกษาพบว่าทำการศึกษาโดยใช้ส่วนปลายยอด (shoot tips) ที่ได้จากไม้สักต้นแม่พันธุ์ที่ปลูกใน greenhouse ทำการเพาะเลี้ยงบนสารอาหาร MS กึ่งเหลว (semi-solid MS) ที่เติมน้ำตาล sucrose 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับการเติม 4.44 μM จากนั้นย้ายเข้าระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว โดยใช้สารอาหารเหลว (liquid MS medium) และเติม BA ที่ความเข้มข้นต่างกัน (control=CK-free medium) 2.22, 4.44, 6.66 μM พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นของ BA 6.66 μM ให้จำนวนยอดปกติสูงสุดเท่ากับ 10.3 Ns/explant แต่อย่างไรเมื่อทำการวิเคราะห์ Histochemical analysis พบว่าค่าความเข้มข้นของ BA มีส่วนสร้าง Phenolic compounds ในสัดส่วนที่ต่ำ และการสะสมลิแกนินในเซลล์ลำเลียง (vascular cells) ของไม้สัก ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้สรุปไว้ว่าการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว (temporary immersion bioreactor system) สำหรับเพาะเลี้ยงไม้สักพบว่าให้ค่าการเติบโต การพัฒนาของกล้า และปริมาณที่สูงกว่า และการขยายพันธุ์มีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในแง่ของการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้เพื่อการขยายพันธุ์เชิงพาณิชย์ต่อไป

2.2.4 การเก็บรักษาไม้พะยุงสายพันธุ์ดีด้วยเทคนิค Artificial Seeds Encapsulation

การเก็บรักษาพันธุ์หรือสายพันธุ์พืช มีความสำคัญต่องานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชและการวิจัยอื่นๆ เป็นอย่างมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะทำการเก็บรักษาด้วยเมล็ด โดยทั่วไปเมล็ดพันธุ์พืชจะเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นต่ำ เพื่อที่จะชะลอการเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์พืช โดยเมล็ดพันธุ์พืชต่างชนิดกันมีอัตราการเสื่อมสภาพที่แตกต่างกัน เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้อายุการเก็บรักษาแตกต่างกันด้วย โดยเมล็ดพันธุ์พืชบางชนิดมีการเสื่อมสภาพช้า จึงมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน ส่วนเมล็ดพันธุ์พืช

บางชนิดมีการเสื่อมสภาพของเมล็ดเร็วกว่า ส่งผลให้ระยะเวลาการเก็บรักษาสั้นลงด้วย เมล็ดพันธุ์พืชจะมีอัตราการเสื่อมสภาพต่างกัน เนื่องจากพฤติกรรมการตอบสนองของเมล็ดพันธุ์ต่อการลดความชื้นและอุณหภูมิ

การขยายพันธุ์พืชตามธรรมชาติโดยการใช้เมล็ดอาจมีการกลายพันธุ์ (mutation) ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ สภาพแวดล้อม และความแปรปรวนทางพันธุกรรม ส่วนการขยายพันธุ์ที่ไม่ใช้เมล็ด เช่น การติดตา ตอนกิ่ง ปักชำ ทาบกิ่ง เป็นการขยายพันธุ์ที่คงไว้ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนต้นเดิมทุกประการ เช่นเดียวกับการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตต้นพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนเดิม หรือแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง หากเป็นการเพาะเลี้ยงด้วยคัพเพาะ (embryo rescue) ก็อาจได้ต้นที่มีลักษณะต่างไปจากเดิม หากชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็น ตา กิ่งอ่อน ใบอ่อน ลักษณะพันธุกรรมที่ได้ก็จะเหมือนเดิมทุกประการ แต่เอ็มบริโอหรือต้นอ่อน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะไม่มีเปลือกหุ้มไว้คอยป้องกันอันตรายเหมือนเอ็มบริโอในเมล็ด จึงไม่สามารถที่จะนำเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปหว่าน หรือเพาะได้โดยตรงดังนั้นจึงมีการคิดค้นเทคนิคในการทำให้เอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับการพัฒนาและสามารถนำไปปลูกได้เหมือนเมล็ดตามธรรมชาติ อันเป็นที่มาของเมล็ดเทียม

เทคนิคการผลิตเมล็ดเทียม เป็นการผลิตเมล็ดที่ลอกเลียนแบบเมล็ดจากธรรมชาติ ความหมายของเมล็ดเทียม หมายถึง เมล็ดที่ไม่ได้เกิดขึ้นจริงตามธรรมชาติ หากแต่เกิดขึ้นโดยใช้กระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เป็นการเลียนแบบเมล็ดพืชที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยทั่วไปรูปร่างของเมล็ดเทียมจะเป็นทรงกลม โดยเมล็ดเทียมจะมีองค์ประกอบสำคัญ เลียนแบบเมล็ดที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ เอ็มบริโอ (โซมาติกเอ็มบริโอ คือ เอ็มบริโอที่ได้จากเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกาย) อาหารสะสมเทียม และส่วนห่อหุ้มเอ็มบริโอ หรือเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม ซึ่งแต่ละส่วนล้วนได้มาจากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ (Redenbaugh *et.al.*, 1984)

สำหรับหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกพืชเพื่อผลิตเมล็ดเทียมมีดังนี้

- 1) เป็นพืชที่มีความสามารถในการเกิดอวัยวะ (organogenesis) หรือโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryogenesis) ได้ดี จำนวนมากและปริมาณสูงเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
- 2) เป็นพืชที่มีความต้องการทางการค้าสูง เช่น เมล็ดจริงมีราคาสูงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาจากการผสมพันธุ์ความไม่เสถียรของยีน หรือต้นทุนในการผลิตสูง
- 3) เป็นพืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ สมุนไพร หรือพืชเศรษฐกิจ

เมล็ดเทียมมี 2 ชนิด ดังนี้ (Keith Redenbaugh, 1993)

1) Hydrated synthetic seeds คือเมล็ดเทียมที่ประกอบด้วยไฮโดรเจล (hydrogel) หุ้มเมล็ดเทียม สารที่เป็นไฮโดรเจล เช่น โซเดียมอัลจิเนต, โปแทสเซียมอัลจิเนต คาราจีแนน เจลลาติน หรือ โซเดียมเพคติน โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารที่นิยมนำมาหุ้มเมล็ดเทียมมากที่สุด เนื่องจากพบว่า สารอัลจิเนตมีคุณสมบัติที่ดีคือ ช่วยป้องกันอันตรายให้กับชิ้นส่วนพืช และที่สำคัญไม่ต้องใช้ความร้อน ในการสร้างเจลให้เกิดเป็นแคปซูล แต่เกิดจากการแลกเปลี่ยนของไอออนระหว่าง Na^+ กับ Ca^{2+} ทำให้เกิดการสร้างเจลหรือทำให้เกิดแคปซูลได้สารละลายแคลเซียมถูกใช้เป็น complexing matrix เนื่องจากสามารถทำให้หยดของสารละลายอัลจิเนตที่เคลือบชิ้นส่วนอยู่เปลี่ยนเป็นแคปซูลที่มี คุณสมบัติที่ดีกว่าการใช้ ion solution ชนิดอื่นๆ โดยแคปซูลที่ได้จะมีความยืดหยุ่น มีลักษณะ กลม และมีความทนทาน นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดและอายุของชิ้นส่วนพืชถือว่า มีความสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมหลังจากนำไปเพาะเลี้ยงเนื่องจากถ้าชิ้นส่วนพืชมีขนาดใหญ่เกินไปอาหาร ที่สะสมอยู่ภายในเมล็ดเทียมอาจจะไม่เพียงพอสำหรับการเจริญ แต่ถ้าชิ้นส่วนพืชมีขนาดเล็กเกินไปก็ อาจทำให้เกิดการสูญเสียอย่างรวดเร็วชิ้นส่วนพืชอาจแห้งตายได้

2) Desiccated synthetic seeds คือเมล็ดเทียมแห้งโดยการทำให้น้ำระเหยออกไป พืชที่นำมาทำเมล็ดเทียมโดยวิธีนี้เมล็ดมีการพักตัวและเมล็ดต้องมีความทนทาน

โครงสร้างเมล็ดเทียม

ประกอบด้วยส่วนประกอบ สำคัญ 4 ส่วนได้แก่

1) ชิ้นส่วนพืชเดี่ยว ๆ (single explants) เป็นชิ้นส่วนพืชที่ถูกนำมาเคลือบด้วยแคปซูล และเป็นส่วนเดียวในเมล็ดเทียมที่ยังมีชีวิตอยู่ ชิ้นส่วนพืชที่นิยมนำมาทำเมล็ดเทียม ได้แก่ โขมาติก เอ็มบริโอ (zygotie embryo) โดยจะใช้เพียง 1 ชิ้นส่วนในการสร้างเมล็ดเทียม 1 เมล็ด ทำหน้าที่ เหมือนไซโกติกเอ็มบริโอที่อยู่ในเมล็ดจริง เมื่อนำเมล็ดเทียมไปปลูกชิ้นส่วนพืชจะงอกเป็นยอดและราก โผล่ออกมาจากแคปซูลเจริญเป็นต้นพืชต่อไป (สมยศ มีสุข, 2541) โขมาติกเอ็มบริโอ คือ เอ็มบริโอที่เกิดมาจากเซลล์โซมาติก (somatic cell) ของต้นพืช เช่น จากใบเลี้ยง ข้อ ปล้อง ลำต้น และรากเมื่อนำอวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแล้วเกิดเป็นเอ็มบริโอที่อยู่ในหลอดทดลองจึงเรียกว่า โขมาติกเอ็มบริโอ เพื่อให้แตกต่างจากเอ็มบริโอที่เกิดในสภาพธรรมชาติซึ่งเกิดจากการปฏิสนธิระหว่างเซลล์ไข่และเซลล์สเปิร์ม การเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอมีระยะพัฒนาการเริ่มจาก

ระยะรูปร่างกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะทอริปโด และระยะที่เอ็มบริโอเจริญเต็มที่ แต่ระยะที่เหมาะสมในการนำมาทำเมล็ดเทียมคือระยะทอริปโด

2) แคปซูล (capsule) คือส่วนที่จะนำมาห่อหุ้มชิ้นส่วนพืชเอาไว้ เป็นส่วนที่ทำให้เกิดโครงสร้างของเมล็ดเทียม โดยทำให้เกิดเป็นรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม โดยใช้สารที่มีความเหมาะสม เช่น อัลจิเนตมาเคลือบ หน้าที่ของแคปซูลคือป้องกันอันตรายให้กับชิ้นส่วนพืช

3) เอนโดสเปิร์มเทียม (artificial endosperm) ทำหน้าที่ให้อาหารแก่ชิ้นส่วนพืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จึงเปรียบได้กับเอนโดสเปิร์มของเมล็ดจริง ส่วนใหญ่เอนโดสเปิร์มเทียมเป็นธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง น้ำตาล วิตามิน กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไป ในสารที่มีลักษณะคล้ายเจลก่อนจะนำไปเคลือบชิ้นส่วนพืชเดี่ยว ๆ

4) เปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (artificial seed coat) ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้ชิ้นส่วนพืช ทำหน้าที่คล้ายกับเปลือกหุ้มเมล็ดจริง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นทางผ่านของน้ำ อาหาร และอากาศ (สุพัตรา สรรธรรม, 2549)

คุณสมบัติของแคปซูล

จะต้องป้องกันอันตรายให้กับชิ้นส่วนพืชที่อยู่ภายในแคปซูล สามารถให้ออกซิเจนผ่านเข้าไปภายในแคปซูลเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชได้รับออกซิเจนมากพอสำหรับการหายใจ มีความแข็งแรงทนทานแต่ขณะเดียวกันต้องมีความอ่อนนุ่มพอที่จะให้ยอดและรากงอกออกมาจากเมล็ดเทียมได้ ต้องไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช ป้องกันไม่ให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการสูญเสียน้ำมากเกินไปหรือทำให้สูญเสียความมีชีวิตสามารถบรรจุธาตุอาหารต่าง ๆ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เก็บไว้ภายในแคปซูล โดยไม่ทำให้สารต่างๆ ออกมาภายนอกแคปซูล ตลอดจนถึงต้องสามารถส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการงอกและการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้จำนวนมาก

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเมล็ดเทียม

1) ใช้ในการขยายพันธุ์พืชหายาก พืชที่ใกล้สูญพันธุ์ พืชลูกผสมหายาก พืชที่มีจีโนมที่ผิดปกติ พืชดัดแปลงพันธุกรรม พืชที่ใช้ในการเพาะปลูก ธัญพืช ไม้ผล พืชสมุนไพรและพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่เมล็ดมีราคาแพงและไม่เพียงพอ

2) การผลิตเมล็ดพันธุ์พืชลูกผสม เช่น ผัก ธัญพืช พืชอาหารสัตว์ หรือพืชที่มีความสำคัญทางการค้าหรือพืชที่มีต้นทุนในการผลิตแบบดั้งเดิมสูง การนำเมล็ดพันธุ์มาผลิตเมล็ดเทียมอาจจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อลดต้นทุนในการผลิต

3) ง่ายในการดูแลรักษาเนื่องจากเมล็ดเทียมมีขนาดเล็กและอยู่ในแคปซูล ทำให้พืชที่ได้มีพันธุกรรมที่เหมือนเดิมและย้ายปลูกในแปลงหรือเรือนเพาะชำได้โดยตรง

4) เมล็ดเทียมมีชีวิตอยู่ได้ตลอดทั้งปี ในขณะที่ไม้ยืนต้นส่วนใหญ่เมล็ดมีอายุได้ 1 เดือน

5) ใช้ในการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช

6) ใช้อนุรักษ์พันธุกรรมพืชที่ปลอดภัยจากเชื้อโรคทั้งในระยะสั้นและระยะยาว การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในระยะสั้นมีจุดมุ่งหมายเพื่อทำให้เมล็ดมีการเจริญเติบโตช้าลงโดยการดัดแปลงสภาพแวดล้อมหรือสภาวะอาหาร

งานวิจัยการทำเมล็ดเทียมเพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมไม้ยืนต้นโตช้าในระยะยาว

เป้าหมายของการเป็นการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชในหลอดแก้วในสภาพอุณหภูมิต่ำพิเศษ (cryopreservation) ส่วนมากนิยมเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว แต่ต้องใช้สารเคมีที่ป้องกันเนื้อเยื่อไม่ให้ถูกทำลายโดยความเย็นและต้องมีเทคนิคในการลดอุณหภูมิหรือเพิ่มอุณหภูมิเมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อออกจากสภาพเย็นจัดเพื่อนำไปเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้อีกครั้ง ปัญหาในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์แบบ in vitro GenBank (สมยศ มีสุข, 2541) ส่วนใหญ่ยังอยู่ในขั้นของการทดลอง และความยุ่งยากในการเก็บรักษาเช่นเติมน้ำยาหรือไนโตรเจนเหลวอย่างสม่ำเสมอ สำหรับ Cryopreservation หมายถึงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง การเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆ เช่นเก็บในตู้แช่แข็ง (freezer) ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส หรือ -40 องศาเซลเซียส และในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) จะสามารถเก็บไว้ได้ยาวนานหรือตลอดไป (ครุฑิต ธรรมศิริ, 2550) การเก็บโดยวิธีนี้เป็นการเก็บที่อาศัยหลักการลดการเจริญเติบโตหรือลดเมตาบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์จนกระทั่งไม่มีเลยจากนั้นก็นำกลับมาเลี้ยงให้เจริญเติบโตอีกครั้งเมื่อต้องการปัญหาอยู่ที่ว่าเราจะทำอย่างไรจึงสามารถเก็บตัวอย่างไว้ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆ และทำอย่างไรให้ต้นพืชกลับมามีชีวิตได้อีกครั้ง (สุพัตรา สรรธรรม, 2549)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกวัสดุพันธุ์กรรมพะยูนที่ใช้ในการวิจัย

1) ตัวอย่างและประชากรของพะยูนที่ใช้ศึกษา ใช้ใบของพะยูนในแปลงรวบรวมกิ่งพันธุ์ พะยูนสายพันธุ์ดีของกรมป่าไม้ ซึ่งปลูกอยู่ที่ศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) จังหวัดขอนแก่น ซึ่งประกอบด้วยแม่ไม้พะยูนจาก 13 แหล่งกำเนิด (provenances) จำนวน 80 ต้น โดยพะยูนที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้เป็นแม่ไม้ที่กรมป่าไม้คัดเลือกมาจากป่าธรรมชาติซึ่งเป็นป่าธรรมชาติในความรับผิดชอบของกรมป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลาง (สระบุรี ปราจีนบุรี และพิษณุโลก) ซึ่งเป็นแม่ไม้ที่คัดเลือกตามเกณฑ์คัดเลือกแม่ไม้ที่ดี

2) การเดินสำรวจในพื้นที่ศึกษาเพื่อทำการคัดเลือกแม่ไม้ที่ดีในตารางกริดที่พบว่ามีไม้พะยูน ขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น โดยการคัดเลือกแม่ไม้ (plus tree selection) ต้องทำการคัดเลือกต้นไม้พะยูนที่มี คุณลักษณะต่างๆ ที่ดีที่สุดเพื่อใช้เป็นพ่อและแม่ในงานการผสมพันธุ์ ขยายพันธุ์และการผลิตเมล็ดไม้ คุณภาพดี ทั้งนี้อยู่บนสมมุติฐานที่ว่าพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดี ย่อมจะถ่ายทอด ลักษณะที่ดีไปสู่ลูกหลานเสมอ โดยที่ลักษณะต่างๆ ที่ใช้พิจารณาในการคัดเลือกแม่ไม้พะยูน ที่มีลักษณะดี เช่น ความเจริญเติบโตดี ลำต้นกลม เปลือกตรง การลิดกิ่งตามธรรมชาติดี กิ่งมีขนาดปานกลางถึงเล็กเมื่อ เทียบกับลำต้น เรือนยอดเล็ก ได้สัดส่วน และรูปทรงดี ด้านทานต่อโรคและแมลง ทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง ได้ดี และออกดอกซ้ำ ข้อมูลแหล่งที่พบไม้พะยูนที่ได้จากการลาดตระเวนเพื่อสำรวจทรัพยากรธรรมชาตินั้น พบว่าไม้พะยูนส่วนใหญ่ขึ้นเป็นกลุ่มๆ กระจายตัวไปในพื้นที่ราบตามแนวสันเขา ซึ่งข้อมูลนี้ใช้เป็นฐานในการ กำหนดพื้นที่เพื่อระบุแหล่งที่พบไม้พะยูน สามารถสร้างตารางกริดเพื่อเป็นตัวแทนพื้นที่ที่พบไม้พะยูนในพื้นที่ แสดงดัง Figure 6

พญนุ ปณ จิตโต ชีเว

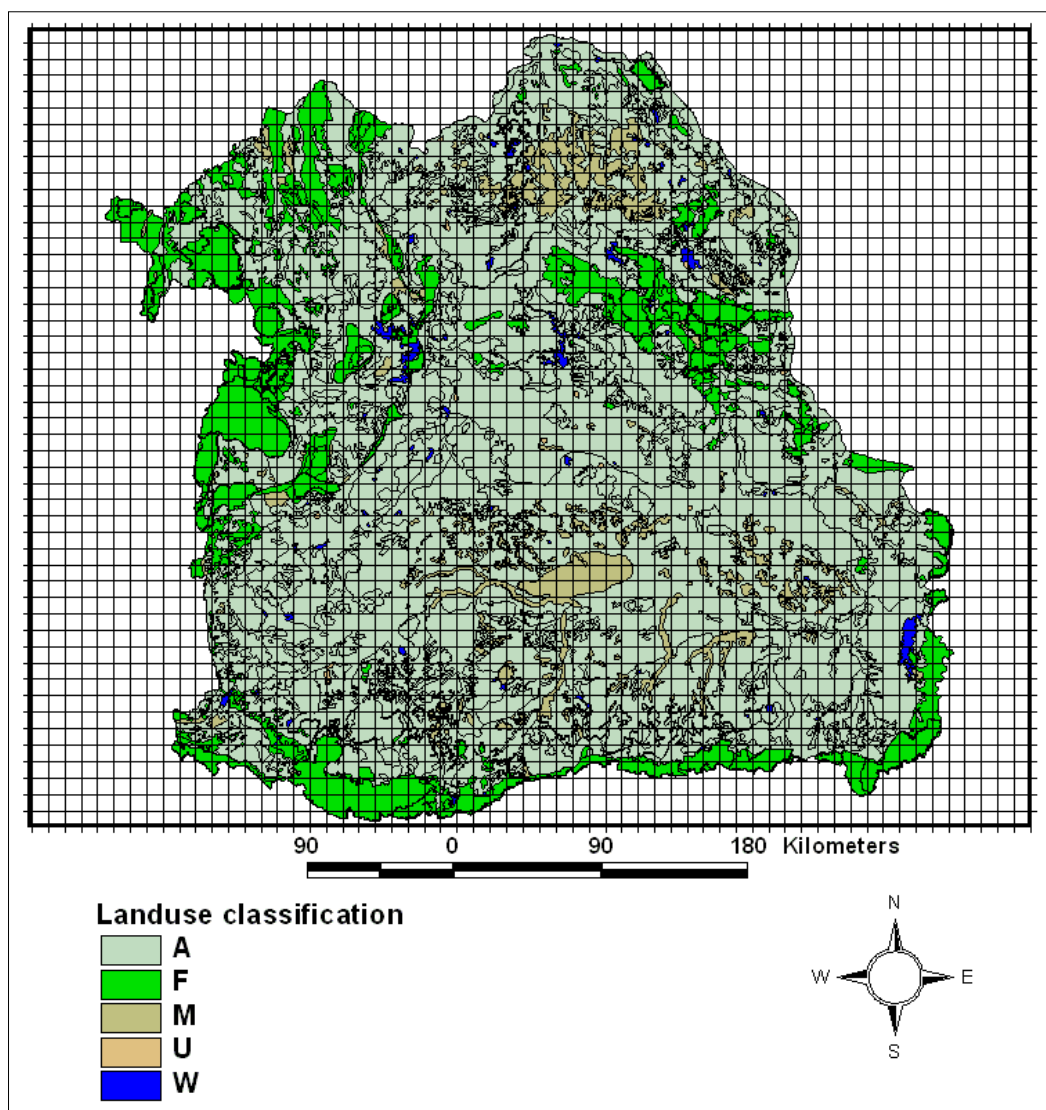


Figure 6 Grid design for selection of areas for select plus tree.

Source : Thailand land use map (Information on forest area project 2020),2563)

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1) วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยความหลากหลายและโครงสร้างประชากรพะยูน

1.1) อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพะยูนเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วย สารดูดความชื้น ถังซิปล็อค สมุดจดบันทึก ปากกา ดินสอ ปากกาเคมี

1.2) อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ

- หลอดทดลอง (microtube)

- ถังมือยาง
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ
- โกร่งบดตัวอย่าง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ
- ชุดฉายแสงและถ่ายภาพดิเอ็นเอ
- เครื่องซังสาร
- ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอ
- เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอสเป็คโตรโฟโตมิเตอร์
- เครื่อง PCR
- เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์
- ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)
- ชุดสำเร็จรูป DNA Purification Kit

2) วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS, 1962)
- สารอินทรีย์ที่ใช้ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยง ประกอบด้วย น้ำตาลทราย
- สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น Benzyladenine (BA) Naphthalene acetic acid (NAA)
- สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ แอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) 95 เปอร์เซ็นต์ ไฮเตอร์ (Haitre) 20 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 หรือ น้ำยาล้างจาน
- สารเคมีที่ใช้ศึกษาการทำเมล็ดเทียม (artificial seeds) เช่น Alginic acid sodium salt, from brown algae (โซเดียมอัลจิเนต) น้ำตาล Sucrose (MERCK) Paraffin Liquid (Ajak Finechem Pty Ltd.) และ Phytigel (SIGMA)
- สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70% และ 95%
- อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้ในการเตรียมสารละลาย ได้แก่ เครื่องซังไฟฟ้าแบบ ละเอียด และหยาบ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ไมโครเวฟ ขวดแก้วบรรจุอาหาร พร้อมฝาปิด ปีกเกอร์ ปิเปต ขวดสีชา กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ขวดรูปชมพู่ แท่งแก้ว ซ้อนดักสาร
- อุปกรณ์และวัสดุสำหรับตัดถ่ายเนื้อเยื่อ เช่น ตู้อายเนื้อเยื่อพืช (lamina air flow) เครื่องมือผ่าตัด คีมมิด ใบมีด ปากคีบ จานแก้ว (plate) ขวดรูปชมพู่ ตะเกียงแอลกอฮอล์
- อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพและวัดขนาด

3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

กรอบการดำเนินงานวิจัยดังแสดงใน Figure 7 และมีรายละเอียดการดำเนินงานตามหัวข้อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

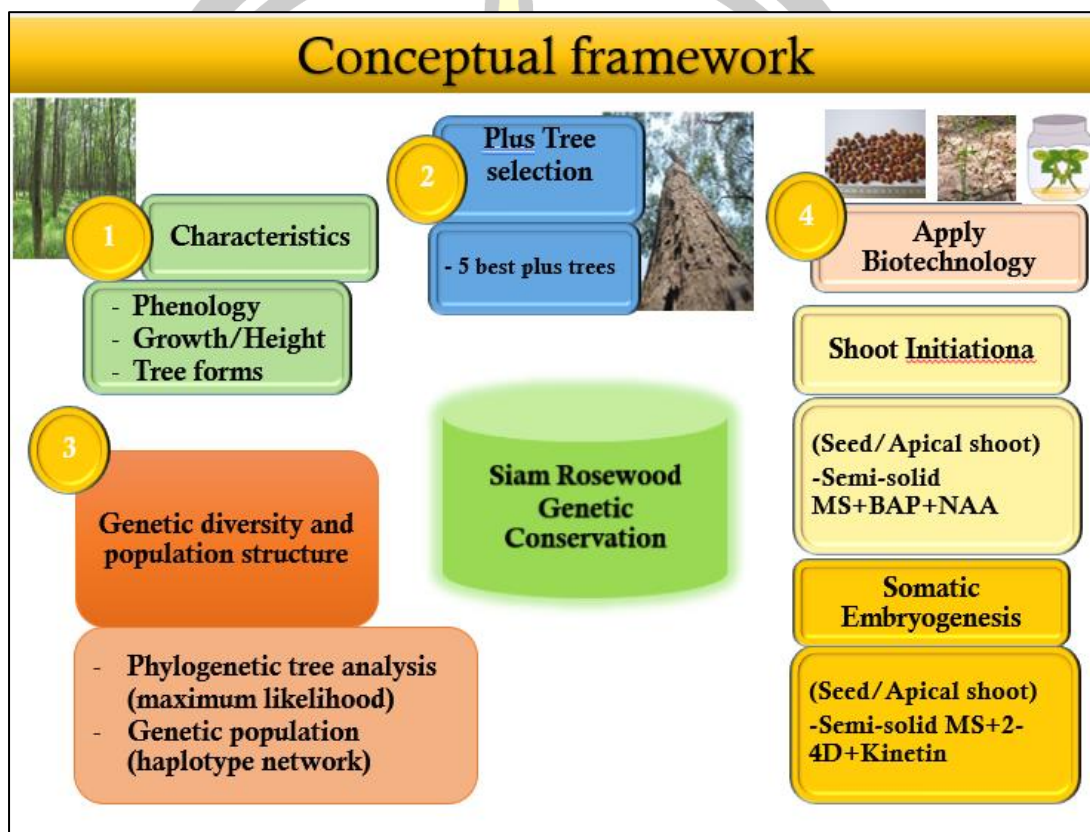


Figure 7 Thesis conceptual framework

3.3.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของพะยูน

3.3.1.1) วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

อบแห้งใบอ่อนพะยูนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเก็บในสารดูดความชื้น (silica gel) ตัวอย่างใบแห้งที่บดละเอียดจะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอทีละตัวอย่างด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) โดยใช้ตัวอย่างละประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมสารละลาย AP1

ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหรือจนกว่าขึ้นตัวอย่างจะละลาย (บ่มข้ามคืนใช้ 37 องศาเซลเซียส) เติมสารละลาย P3 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture ปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที บ่มบนน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส่ใน QIAshredder spin column ที่ใส่ collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกรองเอากากออกและดูดสารละลายใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลาย AW1 ปริมาตร 1.5 เท่า ของปริมาณสารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture ปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารละลายใส่ใน DNeasy Mini spin column ที่ใส่ collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ตั้ง และใส่ DNeasy Mini spin column กลับใน collection tube อันเดิม เติมสารละลาย AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ตั้ง (ทำซ้ำ 2 รอบ) และใส่ DNeasy Mini spin column กลับใน collection tube อันเดิม ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่า ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ collection tube และใส่ DNeasy Mini spin column ในหลอด (ใหม่) 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำ elution buffer ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มาเติม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

3.3.1.2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(polymerase chain reaction; PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน *maturase K (matK)* ในคลอโรพลาสต์ เพื่อยืนยันการจัดจำแนกชนิดของพะยูน และแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยใช้ forward และ reverse primer ดังนี้ *MatK-3F_IH*: 5'-CGT ATA GTA CTC TTG TGT TTA CGA G-3'; *matK-1R_IH*: 5'-ATC CTA TTC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3' ขนาดประมาณ 830 เบส (bp) อัตราส่วนสารละลายที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *matK* ในคลอโรพลาสต์ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (table 1) และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (table 2)

Table 1 Ratio of *matK* gene amplification solution.

PCR reaction mixture (volume 25 μ l)	1x reaction (μ l)
2x PCRBIO HS Taq Mix	12.5
10 μ M Forward primer	0.5
10 μ M Reverse primer	0.5
Nuclease-free water	10.25
Template DNA	1.25
Total	25

Table 2 PCR reaction procedure for amplification of the *matK* gene.

Reactions	Temperature	Time	
initial denature	94 °C	5 mins	
denature	94 °C	1 min	} 35 cycles
annealing	55 °C	1 min	
extension	72 °C	1 min	
final extension step	72 °C	10 mins	

3.3.1.3) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน internal transcribed spacer 4 (*ITS4*) โดยใช้ forward และ reverse primer ดังนี้ ITS4-F: 5'- GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS5 -R: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' ขนาดประมาณ 680 เบส อัตราส่วนสารละลายที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอินทรีออนปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (table 3) และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (table 4)

Table 3 Ratio of *ITS4* gene amplification solution.

PCR reaction mixture (volume 25 μ l)	1x reaction (μ l)
2x PCRBIO HS Taq Mix	12.5
10 μ M Forward primer	0.5
10 μ M Reverse primer	0.5
Nuclease-free water	10.25
Template DNA	1.25
Total	25

Table 4 PCR reaction procedure for amplification of the *ITS4* gene

Reactions	Temperature	Time
initial denature	95 °C	2 mins
denature	95 °C	15 secs
annealing	52 °C	15 secs
extension	72 °C	30 secs
final extension step	72 °C	10 mins

} 40 recycles

3.3.1.4) การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำละลาย 0.5X TBE buffer ละลายโดยใช้ microwave (R-236;Sharp) เทใส่ใน chamber ใส่หลอดเจล ประมาณ 40 นาที ตั้งหลอดเจลออกอย่างระมัดระวังไม่ให้อะกาโรสเจลขาด จากนั้นเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมอะกาโรสเจลใน chamber ผสมดีเอ็นเอตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร กับสี Novel Juice (GeneDire, USA) ประมาณ 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วโหลดลงในแต่ละหลอดอะกาโรสเจล โดยเปรียบเทียบกับ marker (VC100 bp Plus DNA Ladder, USA) จากนั้นทำการ run ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจาก run เสร็จแล้วนำแผ่นอะกาโรสเจลมาส่งดูภายใต้เครื่อง MBE-150 Model (Major Science, Taiwan) บันทึกภาพ และตัดเจลในตำแหน่งที่มีขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.3.1.5) การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำชิ้นอะกาโรสเจลที่ตัดไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร มาแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดย E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega, USA) โดยเติม binding buffer (XP2) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าอะกาโรสเจลจะละลายหมด (กลับหลอดไปมาทุกๆ 5 นาที) และบ่ม elution buffer ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (จนกว่าจะนำมาใช้) จากนั้นดูดอะกาโรสเจลที่ละลายแล้วใส่ลงใน HiBind® DNA Mini Column ที่ใส่ collection tube ขนาด 2 มิลลิตร ปั่นปั่นเหวี่ยง 14,000

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทั้ง และใส่ HiBind® DNA Mini Column ใน collection tube อันเดิม เติม SPW Wash Buffer 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทั้ง และใส่ HiBind® DNA Mini Column ใน collection tube อันเดิม และเติม SPW Wash Buffer 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทั้ง และใส่ HiBind® DNA Mini Column ใน collection tube อันเดิม ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่า 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นย้ายส่วนของ HiBind® DNA Mini Column ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ใหม่) และเติม elution buffer ที่บ่ม 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท DNA sequencing (ATGC, Thailand)

3.3.1.6) การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์เชิงประชากร

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างจะถูกตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรม ABI sequence scanner เวอร์ชัน 1.0 และ BioEdit นำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ทางด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากร ได้แก่ number of polymorphic sites, number of haplotypes (h), haplotype diversity (h_d ; (Saitou, 1987)) และ Nucleotide diversity (π ; (Saitou, 1987)) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่าง haplotype ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP เวอร์ชัน 5.00 (Librado, 2009) และโปรแกรม Arlequin เวอร์ชัน 3.5.1.2 (Excoffier, 2010) วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยการทดสอบ F -statistics (F_{ST}) และวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยการทดสอบ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (จัดกลุ่มประชากรแยกตามพื้นที่) โดยใช้ Arlequin เวอร์ชัน 3.5.1.2 (Excoffier, 2010) ทำการวิเคราะห์ haplotype network (Network เวอร์ชัน 4.6.1.0) โดยใช้หลักการ median-joining algorithm (Bandelt et al., 1999) และวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้หลักการ maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) และ neighbor joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม Paup เวอร์ชัน 4.0 (Swofford, 1998) และวิเคราะห์ Bayesian inference (BI) โดยใช้โปรแกรม MrBayes software package เวอร์ชัน 3.1.2 (Ronquist, 2012)

สำหรับค่าทางสถิติที่ใช้อธิบายผลการประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร (genetic differentiation) โดยวัดจากความแตกต่างของแต่ละประชากรย่อยเปรียบเทียบกับประชากรรวมทั้งหมด (Hedrick PW, 2011)

3.3.2 การศึกษาหาแนวทางการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ

3.3.2.1 คัดเลือกแม่ไม้พะยูนสายพันธุ์ดีเพื่อใช้ในการเป็นต้นแบบชิ้นส่วนพืช

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการศึกษาลักษณะทางการเติบโต ความสูง ความเปลาตรง เพื่อการคัดเลือกแม่ไม้พะยูนสายพันธุ์ดีเพื่อใช้ในการเป็นต้นแบบชิ้นส่วนพืชสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการคัดเลือกไม้พะยูนพันธุ์ดี จากแปลงทดสอบลูกหลานในจังหวัดนครราชสีมาและขอนแก่น โดยกำหนดเกณฑ์การให้คะแนนสำหรับพิจารณาคัดเลือกจากคุณลักษณะสำคัญ 5 ประการ ได้แก่

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| 1) ความสูง | ค่าน้ำหนักคะแนนเป็น 20% |
| 2) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียงอก (dbh) | ค่าน้ำหนักคะแนนเป็น 35% |
| 3) ความยาวของช่วงแกนลำต้น | ค่าน้ำหนักคะแนนเป็น 5% |
| 4) ความตรงของลำต้น | ค่าน้ำหนักคะแนนเป็น 5% |
| 5) สัตส่วนแก่น (hw) | ค่าน้ำหนักคะแนนเป็น 20% |

เมื่อคัดเลือกไม้พะยูนพันธุ์ดีแล้ว ทำการตัดกิ่งอ่อน มาตัดชำในกระบะทราย เพื่อให้ไม้พะยูนได้แตกยอด ยอด ที่จะใช้สำหรับเป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป (Figure 8)



Figure 8 Cutting techniques to produce explants for tissue culture.

3.3.2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้พะยูน

ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพะยูน โดย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

1) ศึกษาการขยายพันธุ์ไม้พะยูนด้านการชักนำและเพิ่มปริมาณยอด (shoot initiation and shoot proliferation) ทำได้โดยการนำยอดอ่อนของพะยูนที่ได้จากการปักชำกิ่งมาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปล้างน้ำเพื่อทำความสะอาดโดยให้น้ำไหลผ่าน นำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 3 ครั้ง จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด นำยอดอ่อนของไม้พะยูนแช่ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำยอดอ่อนของไม้พะยูนไปวางบนจานแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แกะเปลือกหุ้มตาออก ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางยอดไม้พะยูนลงบนจานแก้วชุบด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีความยาว 2 เซนติเมตร แล้วนำลงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตรต่าง ๆ ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ (table 5)

Table 5 MS media supplemented with BA and NAA at different concentrations for shoot initiation

	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)
1	0	0
2	0.4	0.1
3	0.8	0.2
4	1.6	0.4

การทดลองนี้ประกอบด้วยอาหาร 16 สูตร จำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ แต่ละสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำการปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.7 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทำการทดลองสูตรอาหารละ 10 ซ้ำ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่างจากหลอดคู

ไวท์ (cool white) ที่มีความเข้มแสงเฉลี่ย 35-40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกข้อมูลจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน (number of shoots) และเปรียบเทียบสูตรอาหารต่าง ๆ เพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงพะยูนต่อไป

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial experiment) แบบ Completely randomized design (CRD) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA

2) การชักนำเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) (Sing and Chand, 2003) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัส (callus induction and growth) โดยนำเมล็ด หรือยอดอ่อน หรือตาข้างของไม้พะยูนที่ได้จากการปักชำกิ่งหรือหน่อราก (root sucker) มาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปล้างน้ำเพื่อทำความสะอาดโดยให้ผ่านน้ำไหล นำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 3 ครั้ง จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด เช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ (Haiter) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางเมล็ด หรือยอดอ่อน หรือตาข้างของพะยูนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนจานแก้วชุบด้วยกระดาษซับน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีความยาว 2 เซนติเมตร แล้วนำลงเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างกัน ได้แก่ Kinetin และ 2,4-D ที่มีความเข้มข้นต่างกันดังแสดงใน table 6

Table 6 MS media supplemented with Kinetin+2,4-D at different concentrations for Callus Induction

Media	Kinetin (mg/L)	2,4-D (mg/L)
1	0.0	0.0
2	0.1	0.4
3	0.2	0.8
4	0.4	1.6

จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ ไปเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2Ms ที่ไม่เติมฮอร์โมน เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกข้อมูลจำนวนเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายต่อกลุ่มแคลลัส และเปรียบเทียบสูตรอาหารต่าง ๆ จากนั้นนำสูตรอาหารที่ดีที่สุดไปใช้เป็นสูตรตั้งต้นในการทำเมล็ดเทียมเพื่ออนุรักษ์พันธุ์กรรมในระยะยาวต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การกระจายของพะยูนในแหล่งธรรมชาติที่นำมาศึกษา

ผลการสำรวจสามารถคัดเลือกแม่ไม้มซึ่งได้แม่ไม้มที่มีคุณลักษณะดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การกระจายต้นแม่ของกิ่งพันธุ์ ทั้ง 13 แหล่ง แสดงใน Figure 9 ซึ่งตัวอย่างแม่ไม้มพะยูนได้ทำการเก็บ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (voucher specimens) นำส่งเก็บรักษาไว้ที่หอพรรณไม้ของกรม อุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ทั้งนี้แม่ไม้มพะยูนได้รับการคัดเลือกและนำกิ่งพันธุ์มาทำการเสียบ ยอดและปลูกเก็บรวบรวมพันธุ์ไว้ที่ศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) (Figure 10) นั้นเป็นแม่ไม้มที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในป่าธรรมชาติ เช่น ป่าสงวนแห่งชาติ ซึ่งจะพบว่าแม่ไม้มพะยูนใน แหล่งธรรมชาตินั้น มักพบขึ้นในป่าดิบแล้งและป่าเบญจพรรณ ที่มีสภาพพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลางประมาณ 200-500 เมตร ชนิดดินและสภาพพื้นที่ของแหล่งที่พบแม่ไม้มพะยูนส่วนใหญ่ พบขึ้นในดินร่วน หรือดินร่วนปนทราย สภาพพื้นที่เป็นที่ราบเนินเขา ที่ราบที่มีความลาดชันน้อยถึงปานกลาง พรรณไม้ที่ขึ้นร่วมในสังคม เช่น นนทรีป่า ประดู่ป่า กระบาก สมอพิเภก ไม้ มะกอก ตั้ว พลับพลา ขว้าว ชิงชัน จั้ว มะเฒ่า โสมมัน ลำตวน ปอหู่ โสกน้ำ ไคร้ย้อย กล้วยป่า ถ่อน หวาย ไม้ซาง ไม้ข้าวหลาม เกล้ง พลอง หมือด ไม้ซางนวล เป็นต้น ซึ่งการคัดเลือกแม่ไม้มพะยูนโดยทำการคัดเลือกต้นที่มีคุณลักษณะต่าง ๆ ที่ต้องการดีที่สุด เพื่อใช้เป็นพ่อและแม่ในงานการผสมพันธุ์และงานการผลิตเมล็ดไม้คุณภาพดี ทั้งนี้อยู่บน สมมุติฐานที่ว่า พ่อแม่มีลักษณะทางพันธุดี ย่อมจะถ่ายทอดลักษณะดีไปสู่ลูกหลานเสมอ โดยที่ ลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้พิจารณาในการคัดเลือกแม่ไม้มพะยูนสำหรับนำมาปลูกครั้งนี้ ตัวอย่างแบบฟอร์มใน การคัดเลือกแม่ไม้มแสดงใน Figure 11 ทำการประเมินลักษณะรูปทรงของแม่ไม้มพะยูนที่จะคัดเลือกเก็บ ตัวอย่างมาศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้เกณฑ์การประเมินดัดแปลงจากวิธีการของ (Pinyopusarerk, 1990) และมีรายละเอียดดังนี้

- 1) มีความเจริญเติบโตดี ลำต้นกลม เปล่า ตรง คุณภาพเนื้อไม้ดี
- 2) การลิดกิ่งตามธรรมชาติดี กิ่งมีขนาดปานกลางถึงเล็กเมื่อเทียบกับลำต้น
- 3) เรือนยอดเล็ก ได้สัดส่วน และรูปทรงดี
- 4) ด้านทานต่อโรคและแมลง
- 5) ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี
- 6) ออกดอกซ้ำ

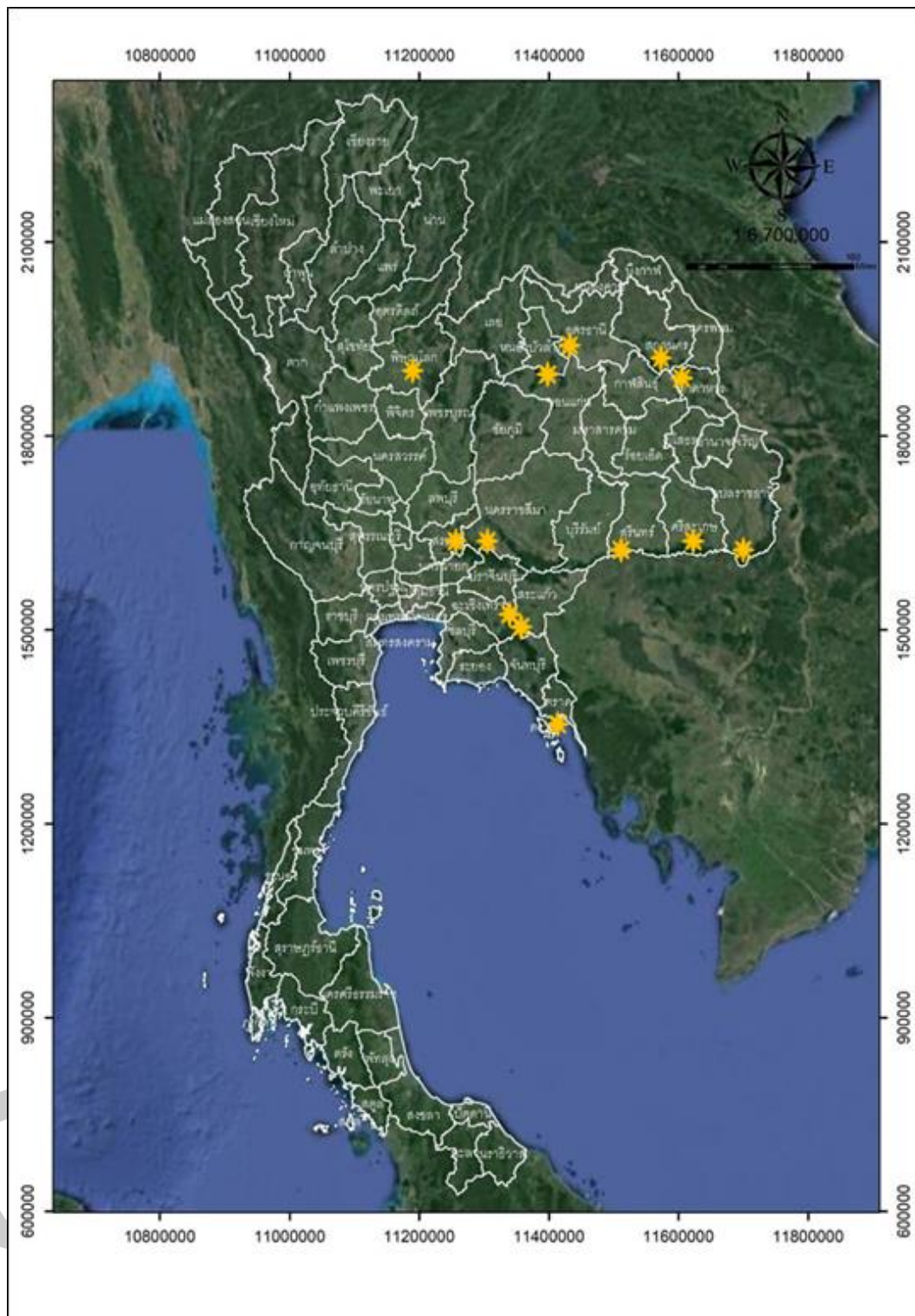


Figure 9 Distribution of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre for this research.

Source : Thailand land use map (Information on forest area project, Royal Forest Department 2020)



Figure 10 Hedge orchard of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre at Northeastern Forest Tree Seed Center (Khon kaen)



ทะเบียนประวัติแม่ไม้

1. ชื่อไม้ _____
2. เลขที่แม่ไม้ _____ Clone no. _____
3. สถานที่เก็บเลือก (ก) แหล่ง _____
(ข) หน่วยงาน/สำนัก _____
(ค) อำเภอ _____
(ง) จังหวัด _____
4. ชื่อป่า _____
5. ตำแหน่งที่ตั้ง _____
6. ชนิดดิน _____ สภาพพื้นที่ _____
7. การขึ้นกับชุมชนธรรมชาติ _____
8. ลักษณะดินบริเวณปลูก (DBH) _____ ซม. ความสูง _____ เมตร
9. ความสูงจากดินบริเวณปลูก (DBH) _____ เมตร ความสูงจากดินบริเวณปลูก _____ เมตร
10. ลักษณะดินบริเวณปลูก _____
11. รูปทรงของลำต้น (ก) ความตรง ☐ ตรง ☐ แขนงเล็กน้อย ☐ แขนงมาก ☐
(ข) ความโค้งงอจากโคนเล็กน้อย ☐ ตรงเล็กน้อย ☐ โค้งงอเล็กน้อย ☐ โค้งงอเล็กน้อย
12. ลักษณะเรือนยอด (ก) ขนาด (เทียบกับลำต้น) ☐ เล็ก ☐ กลาง ☐ ใหญ่ ☐
(ข) รูปทรง ☐ สมนก ☐ รูปไข่ ☐ ไม่สม ☐ ไม่สม
13. ลักษณะกิ่ง (ก) ขนาด (เทียบกับลำต้น) ☐ เล็ก ☐ กลาง ☐ ใหญ่ ☐
(ข) ความถี่ของกิ่ง ☐ 35 - 50 ☐ 51 - 70 ☐ 71 - 90 ☐
(ค) การขึ้นกับชุมชนธรรมชาติ ☐ มี ☐ ไม่มี ☐ ไม่มี ☐
(ง) จำนวนกิ่งเล็กตามลำต้น (ก) ไม่มี ☐ มี ☐ ไม่มี ☐
14. ลักษณะลำต้น (ก) ความตรง ☐ ตรง ☐ คดเล็กน้อย ☐ คดเล็กน้อย ☐
(ข) การขึ้นกับชุมชน ☐ ตรง ☐ คดเล็กน้อย ☐ คดเล็กน้อย ☐
(ค) ความกลม ☐ กลม ☐ คดเล็กน้อย ☐ คดเล็กน้อย ☐
(ง) รูปร่าง ☐ ไม่มี ☐ คดเล็กน้อย ☐ คดเล็กน้อย ☐
15. ลักษณะการแตกกิ่ง ☐ คด ☐ คดปานกลาง ☐ ไม่คด ☐
16. การทำลายของโรคและแมลง (ก) ขึ้น ☐ ไม่มี ☐ มีเล็กน้อย ☐ มีมาก ☐
(ข) ขึ้น ☐ ไม่มี ☐ มีเล็กน้อย ☐ มีมาก ☐
17. การขยายพันธุ์ (ก) ขึ้น ☐ ไม่มี ☐ มีเล็กน้อย ☐ มีมาก ☐
(ข) ขึ้น ☐ ไม่มี ☐ มีเล็กน้อย ☐ มีมาก ☐
18. หมายเหตุ _____
19. วันที่เก็บเลือก _____ ผู้เก็บเลือก _____
20. หน่วยงานเก็บเลือก _____

a

b

Figure 11 Plus tree Selecting Data form

Note : a=plus tree b=form

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอใบพะยูนด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) พบว่าได้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 22.44-154.19 (ng/μl) และมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง (ratio, A260/A280) 1.37-1.75 ซึ่งจากผลการสกัดดีเอ็นเอจะพบว่ามี ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพบว่า ค่อนข้างมีการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ อยู่เล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับที่ Ribeiro & Lovato (2007) ได้รายงานว่ใบของต้นไม้ในสกุล Dalbergia มีสารฟิสิกัลเป็นจำนวนมากทำให้เป็นอุปสรรคในการสกัดดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่สะอาด ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตามต้องการ (Ribeiro, 2007)

Table 7 PCR products used of Sample for nucleotide sequencing analysis from 13 sources.

No	Code	matK	ITS	Source	No. of
1	TRT-M1	/	/	Natural forest resources, Trat Province	8
2	TRT-M2	/	/	Natural forest resources, Trat Province	
3	TRT-M3	/	/	Natural forest resources, Trat Province	
4	TRT-M4	/	-	Natural forest resources, Trat Province	
5	TRT-KY1	/	/	Natural forest resources, Trat Province	
6	TRT-KY2	/	/	Natural forest resources, Trat Province	
7	TRT-KY3	/	/	Natural forest resources, Trat Province	
8	TRT-KY4	/	-	Natural forest resources, Trat Province	
9	SSK-PS1	/	-	Natural forest resources, Sisaket Province	9
10	SSK-PS2	/	/	Natural forest resources, Sisaket Province	
11	SSK-PS3	/	/	Natural forest resources, Sisaket Province	
12	SSK-PS4		/	Natural forest resources, Sisaket Province	
13	SSK-PS5	/	/	Natural forest resources, Sisaket Province	
14	SSK-KL1	/	/	Natural forest resources, Sisaket Province	
15	SSK-KL2	/	/	Natural forest resources, Sisaket Province	
16	SSK-KL3	/	/	Natural forest resources, Sisaket Province	
17	SSK-KL4	-	/	Natural forest resources, Sisaket Province	4
18	SRN-KC1	/	/	Natural forest resources, Surin Province	
19	SRN-KC2	/	/	Natural forest resources, Surin Province	
20	SRN-KC3	/	/	Natural forest resources, Surin Province	
21	SRN-KC4	/	-	Natural forest resources, Surin Province	6
22	SRI76	/	-	Natural forest resources, Surin Province	
23	SRI80	/	-	Natural forest resources, Saraburi Province	
24	SRI	/	-	Natural forest resources, Saraburi Province	
25	SRI6	-	/	Natural forest resources, Saraburi Province	
26	SRI27	-	/	Natural forest resources, Saraburi Province	
27	SRI34	-	/	Natural forest resources, Saraburi Province	10
28	SNK-PP1	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	

No	Code	matK	ITS	Source	No. of
29	SNK-PP2	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
30	SNK-PP3	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
31	SNK-PP4	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
32	SNK-PP5	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
33	SNK-M1	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
34	SNK-M2	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
35	SNK-M3	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
36	SNK-M4	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	
37	SNK-M5	/	/	Natural forest resources, Sakon Nakhon Province	3
38	SKW-WY1	/	/	Natural forest resources, Sa Kaeo Province	
39	SKW-WY2	/	/	Natural forest resources, Sa Kaeo Province	
40	SKW-WY3	/	/	Natural forest resources, Sa Kaeo Province	3
41	NMA-BK1	/	/	Natural forest resources, Prachin Buri Province	
42	NMA-BK2	/	/	Natural forest resources, Prachin Buri Province	
43	NMA-BK3	/	/	Natural forest resources, Prachin Buri Province	7
44	KKN-WK1	/	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	
45	KKN-WK2	/	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	
46	KKN-WK3	/	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	
47	KKN-WK4	/	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	
48	KKN-WK5	/	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	
49	KKN-WK6	/	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	
50	KKN-WK7	-	/	Natural forest resources, Khon Kaen province.	4
51	CCO-TT1	/	/	Natural forest resources, Chachoengsao province	
52	CCO-TT2	/	/	Natural forest resources, Chachoengsao province	
53	CCO-TT3	/	/	Natural forest resources, Chachoengsao province	
54	CCO-TT4	/	/	Natural forest resources, Chachoengsao province	6
55	UBN-NC1	-	/	Natural forest resources, Ubon Ratchathani	
56	UBN-NC2	-	/	Natural forest resources, Ubon Ratchathani	
57	UBN-NC4	-	/	Natural forest resources, Ubon Ratchathani	
58	UBN-NY1	-	/	Natural forest resources, Ubon Ratchathani	
59	UBN-NY2	-	/	Natural forest resources, Ubon Ratchathani	
60	UBN-NY3	-	/	Natural forest resources, Ubon Ratchathani	4
61	MDH8	-	/	Natural forest resources, Mukdahan province	
62	MDH12	-	/	Natural forest resources, Mukdahan province	
63	MDH41	-	/	Natural forest resources, Mukdahan province	
64	MDH67	-	/	Natural forest resources, Mukdahan province	3
65	UDN36	-	/	Natural forest resources, Mukdahan province	
66	UDN37	-	/	Natural forest resources, Udon Thani province.	
67	UDN43	-	/	Natural forest resources, Udon Thani province.	5
68	UDN45	-	/	Natural forest resources, Phitsanulok province.	
69	PLK5	-	/	Natural forest resources, Phitsanulok province.	
70	PLK9	-	/	Natural forest resources, Phitsanulok province.	
71	PLK21	-	/	Natural forest resources, Phitsanulok province.	
72	PLK32	-	/	Natural forest resources, Phitsanulok province.	

4.3 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของพะยูน

4.3.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยยีน maturase K (*matK*) ในคลอโรพลาสต์

จากแผนภูมิต้นไม้สัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของพะยูนวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน maturase K (*matK*) โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุลเดียวกันที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ พืชกลุ่มสกุล *Dalbergia spp.* จำนวน 78 ตัวอย่าง จากประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม ภูฏาน จีน เนปาล มาดากัสการ์ แทนซาเนีย พม่า อินเดีย บราซิล ฟลอริดา สหรัฐอเมริกา บังคลาเทศ อินโดนีเซีย บอร์เนียว ปาปัวนิวกินี และประดู่ป่า จำนวน 1 ตัวอย่างโดยใช้ประดู่ป่า *Pterocarpus macrocarpas* Kurz (AB924813) เป็น out-group สามารถแบ่งเป็น 2 clades อย่างชัดเจน โดยตัวอย่างพะยูนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ใน Clades A แผนภูมิต้นไม้สัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงใน Figure 12 และใน table 8

เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนม *matK* ผลการวิเคราะห์แสดงใน table 9 Figure 13 ซึ่งพบว่ารูปแบบของยีน (alleles) *matK* ของพะยูน ทั้งหมด 48 ตัวอย่าง สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 34 haplotypes โดยพบว่าเป็น unique haplotypes ทั้ง 34 haplotypes โดยมีค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) ในพะยูนแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-1.000 และ 0.000-0.016 ตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมซึ่งถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่ฝ่ายเดียวเท่านั้น ทำให้รูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกับแม่และมีความพิเศษของแต่ละสายพันธุ์และแต่ละแหล่ง

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ตาม table 9 พบว่าที่ประชากรพะยูนที่มีค่า Haplotype diversity (h) สูงที่สุดได้แก่ พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดขอนแก่น (DC-KKN-WK) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.009 และค่า π เท่ากับ 0.014 ± 0.003 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมัน จังหวัดนครราชสีมา (DC-NMA-KB) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.074 และค่า π เท่ากับ 0.008 ± 0.002 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสระแก้ว (DC-SKW-WY) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.272 และค่า π เท่ากับ 0.008 ± 0.002 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมันจังหวัดสกลนคร (DC-SNK-M) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.126 และค่า π เท่ากับ 0.007 ± 0.001 และพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมันจังหวัดสกลนคร (DC-SNK-PP) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.126 และค่า π เท่ากับ 0.012 ± 0.00

สำหรับแหล่งพะยูนที่มีค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) ต่ำที่สุด ได้แก่ แหล่งพะยูนจากป่าธรรมชาติจังหวัดสระบุรี (DC-SRI) มีค่า h เท่ากับ 0.000 ± 0.000 และมีค่า π เท่ากับ 0.000 ± 0.000



Figure 12 Phylogenetic tree of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre where the nucleotide sequences were analyzed with the *matK* gene with neighbor-joining.

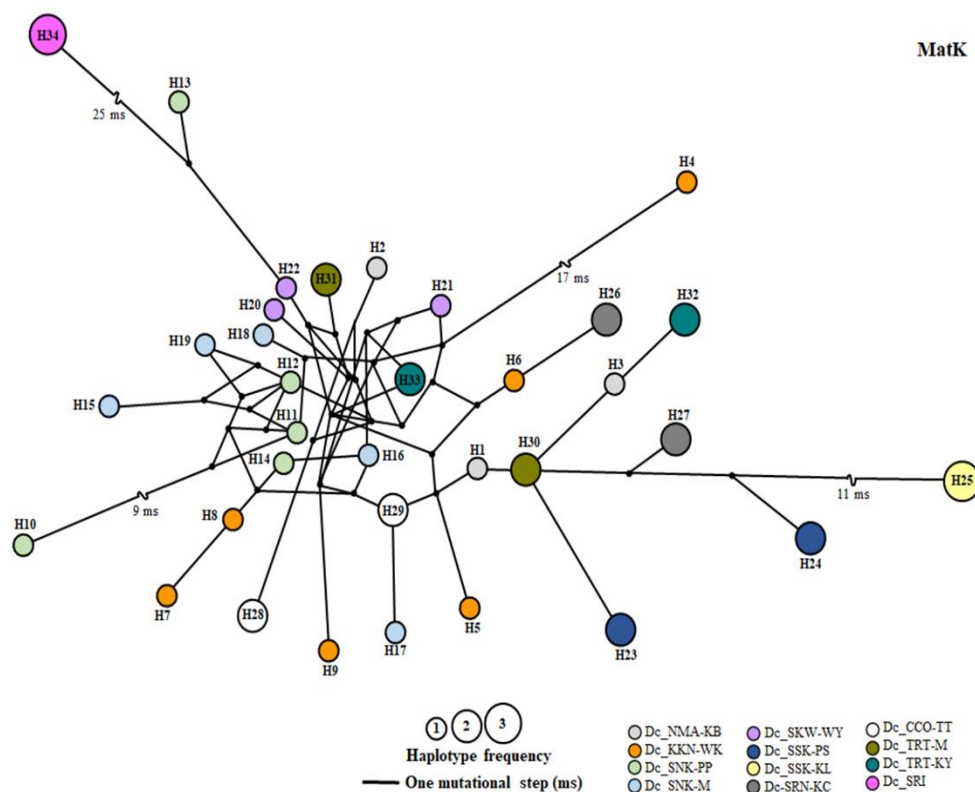


Figure 13 Haplotype diversity (h) where the nucleotide sequences were analyzed with the *matK* gene with neighbor-joining.

4.3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยยีนนิวเคลียส Internal transcribed spacer 4 (*ITS4*)

จากแผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของพะยุง วิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Internal transcribed spacer 4 (*ITS4*) โดยทำการวิเคราะห์ ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุลเดียวกันที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ พืชกลุ่มสกุล *Dalbergia* 78 ตัวอย่าง จากประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม ภูฏาน จีน เนปาล มาดากัสการ์ แทนซาเนีย พม่า อินเดีย บราซิล ฟลอริดา สหรัฐอเมริกา บังคลาเทศ อินโดนีเซีย บอร์เนียว ปาปัว นิวกินี และประดู่ป่า จำนวน 1 ตัวอย่างโดยใช้ประดู่ป่า *Pterocarpus macrocarpas* Kurz (AB924813) เป็น out-group สามารถแบ่งเป็น 2 clades อย่างชัดเจน โดยตัวอย่างพะยุงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดอยู่ใน Clades A แผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงใน Figure 14 และ table 8

เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Internal transcribed spacer 4 (ITS4) พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของพะยูน ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ITS4 ตาม Figure 15 ด้วยการวิเคราะห์แบบ neighbor-joining ยีน ITS จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 65 ตัวอย่าง มีทั้งหมด 31 haplotype โดยพบ unique haplotype ทั้งหมด 15 haplotypes และมีค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) ในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-1.000 และ 0.000-0.008 ตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนนิวเคลียสจีโนมซึ่งถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางพ่อและแม่ ทำให้รูปแบบดีเอ็นเอมีความผันแปรของไปตามพ่อและแม่ของแต่ละสายพันธุ์และแต่ละแหล่ง

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ตาม table 9 พบว่า ประชากรที่มีค่า Haplotype diversity (h) สูงที่สุด ได้แก่ พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดขอนแก่น (DC-KKN-WK) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.076 และค่า π เท่ากับ 0.008 ± 0.001 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมัน จังหวัดนครราชสีมา (DC-NMA-KB) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.272 และค่า π เท่ากับ 0.002 ± 0.001 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมันจังหวัดสกลนคร (DC-SNK-M) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.126 และค่า π เท่ากับ 0.004 ± 0.001 และพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสุรินทร์ (DC-SRN-KC) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.272 และค่า π เท่ากับ 0.004 ± 0.001 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดพิษณุโลก (DC-PLK) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.177 และค่า π เท่ากับ 0.004 ± 0.001 พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสระบุรี (DC-SRN) มีค่า h เท่ากับ 1.000 ± 0.272 และค่า π เท่ากับ 0.002 ± 0.001

สำหรับแหล่งพะยูนที่มีค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) ต่ำที่สุด ได้แก่ แหล่งพะยูนจากป่าธรรมชาติจังหวัดฉะเชิงเทรา (Dc-CCO-TT) มีค่า h เท่ากับ 0.000 ± 0.000 และมีค่า π เท่ากับ 0.000 ± 0.000 รายละเอียดตาม table 9



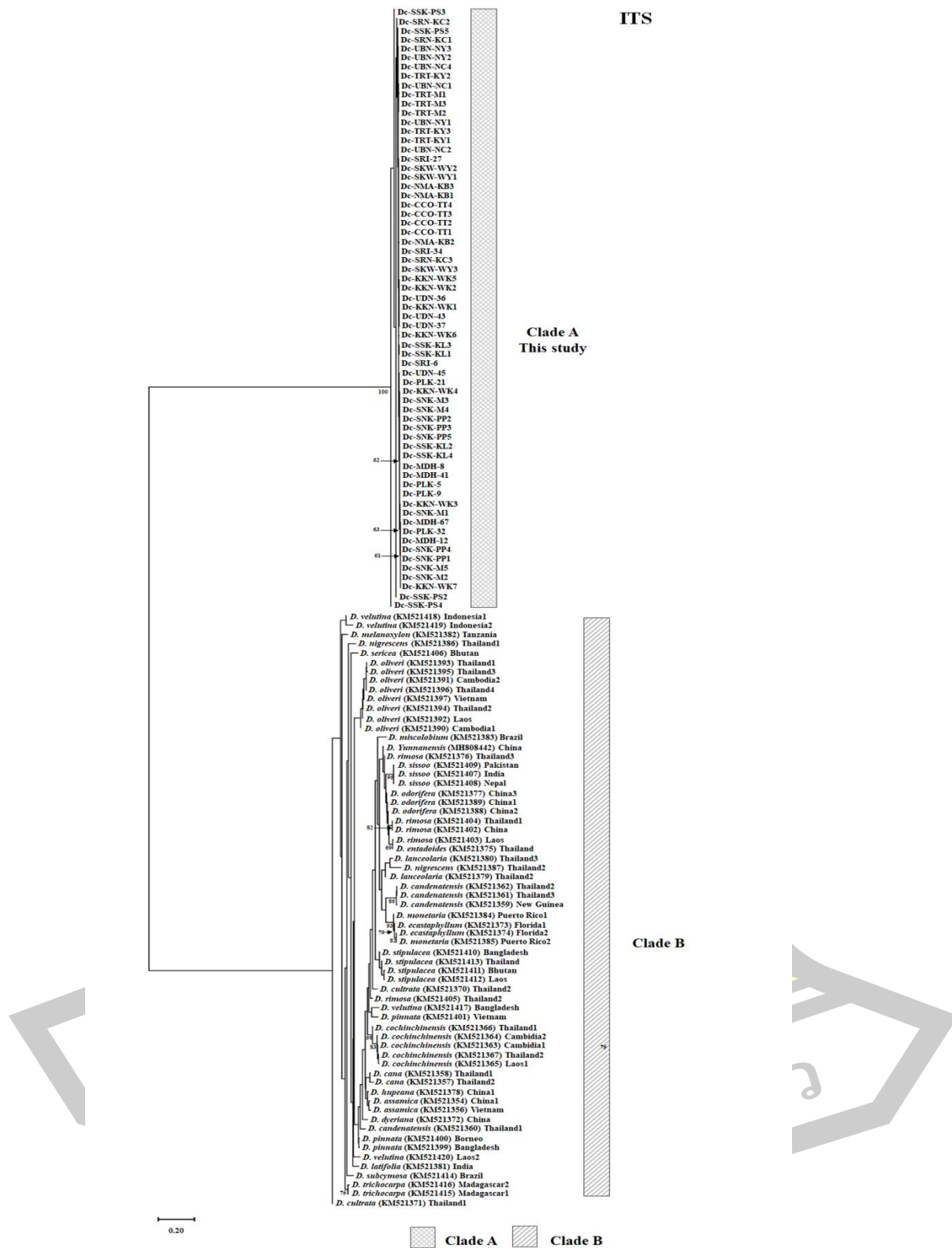


Figure 14 Phylogenetic tree of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre where the nucleotide sequences were analyzed with the ITS gene with neighbor-joining.

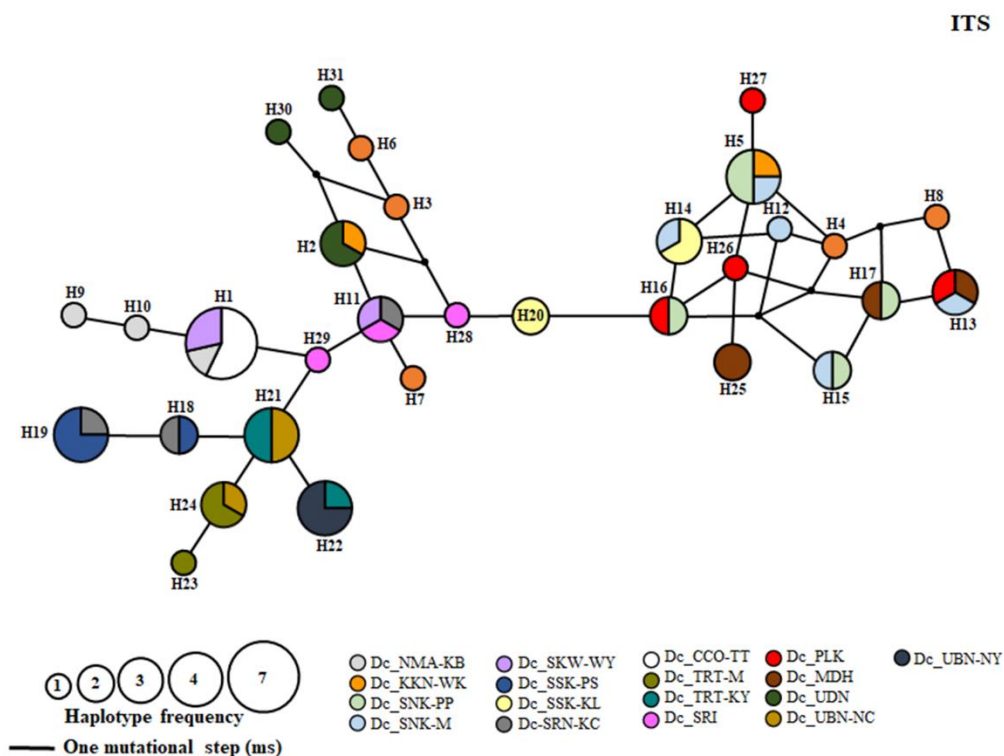


Figure 15 Haplotype diversity (h) where the nucleotide sequences were analyzed with the *ITS* gene with neighbor-joining.

Table 8 Plant sample data in the GenBank database and accession number.

Specimen name, incl. origin	Voucher	Genbank accession numbers	
		<i>matK</i>	ITS
<i>D. assamica</i> China1	Hu & But 22805 (L)	KM521275	KM521354
<i>D. assamica</i> China2	Fei-yan <i>et al.</i> 1530a (AAU)	KM521273	-
<i>D. assamica</i> Vietnam	Poillane 25005 (AAU)	KM521272	KM521356
<i>D. benthamii</i> China	Hu & But 20533 (L)	KM521278	-
<i>D. cana</i> Thailand1	FRDU & Van der Welzen 9 (L)	KM521284	KM521358
<i>D. cana</i> Thailand2	Larsen 2260 (AAU)	KM521279	KM521357
<i>D. candenatensis</i> New Guinea	Verdcourt & Katik 4964 (L)	KM521280	KM521359
<i>D. candenatensis</i> Thailand1	Kerr 15404 (AAU)	KM521281	KM521360
<i>D. candenatensis</i> Thailand2	Van der Kevie 25 (L)	KM521283	KM521362
<i>D. candenatensis</i> Thailand3	Larsen 30989 (AAU)	KM521282	KM521361
<i>D. cochinchinensis</i> Cambodia1	Hartvig Larsen 28 (C)	KM521288	KM521363
<i>D. cochinchinensis</i> Cambodia2	Virachey Botanical Survey 114 (E)	KM521286	KM521364
<i>D. cochinchinensis</i> Laos1	Hartvig Larsen 35 (C)	KM521289	KM521365
<i>D. cochinchinensis</i> Laos2	Nanthavong BT499 (E)	KM521326	-

Specimen name, incl. origin	Voucher	Genbank accession numbers	
		matK	ITS
<i>D. cochinchinensis</i> Thailand1	Premradsamee 46 (C)	KM521285	KM521366
<i>D. cochinchinensis</i> Thailand2	Middleton D.J. 233 (K)	KM521287	KM521367
<i>D. cultrata</i> China	M. Czako, Univ. South Carolina, USA (coll. from Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Yunnan, China)	KM521300	KM521369
<i>D. cultrata</i> Myanmar	Flora of Burma 4141, Herb. J.H. Lace (K)	KM521292	-
<i>D. cultrata</i> Thailand1	Niyomdham <i>et al.</i> 130 (C)	KM521290	KM521371
<i>D. cultrata</i> Thailand2	Hartvig Larsen & Maxwell 37 (C)	KM521291	KM521370
<i>D. dyeriana</i> China	Sino-America Guizhou Botanical Expedition 2221 (L)	KM521295	KM521372
<i>D. ecastaphyllum</i> Florida1	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521296	KM521373
<i>D. ecastaphyllum</i> Florida2	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521297	KM521374
<i>D. entadoides</i> Thailand	Niyomdham 5099 (AAU)	KM521298	KM521375
<i>D. hancei</i> China1	Leeuwenberg 14069 (L)	KM521303	-
<i>D. hancei</i> China2	Hu & But 21333 (L)	KM521302	-
<i>D. horrida</i> var. <i>glab.</i> Laos	Poilane 11947 (AAU)	KM521304	-
<i>D. hupeana</i> China1	Wang Yang-Ming 326 (K)	KM521305	KM521378
<i>D. hupeana</i> China2	Lei 913 (L)	KM521306	-
<i>D. lanceolaria</i> Thailand1	Maxwell 00-194 (CMU)	KM521307	-
<i>D. lanceolaria</i> Thailand2	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521270	KM521379
<i>D. lanceolaria</i> Thailand3	Niyomdham 894 (C)	KM521308	KM521380
<i>D. latifolia</i> India	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521309	KM521381
<i>D. melanoxyton</i> Tanzania	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521310	KM521382
<i>D. mimosoides</i> China	F 138 (AAU)	KM521311	-
<i>D. miscolobium</i> Brazil	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521312	KM521383
<i>D. monetaria</i> Puerto Rico1	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521313	KM521384
<i>D. monetaria</i> Puerto Rico2	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521314	KM521385
<i>D. nigrescens</i> Thailand1	Larsen 3344 (L)	KM521317	KM521386
<i>D. nigrescens</i> Thailand2	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521318	KM521387
<i>D. nigrescens</i> Thailand3	Larsen 31702 (AAU)	KM521315	-
<i>D. nigrescens</i> Thailand4	Larsen 34002 (AAU)	KM521316	-
<i>D. odorifera</i> China1	M. Czako, Univ. South Carolina, USA (coll. from Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Yunnan, China)	KM521320	KM521389
<i>D. odorifera</i> China2	Chun, N.K. & C.L. Tso 44712 (K)	KM521319	KM521388
<i>D. odorifera</i> China3	How 70769 (K)	KM521301	KM521377
<i>D. oliveri</i> Cambodia1	Hartvig Larsen 21 (C)	KM521277	KM521390
<i>D. oliveri</i> Cambodia2	Hartvig Larsen 30 (C)	KM521276	KM521391
<i>D. oliveri</i> Laos	Hartvig Larsen 36 (C)	KM521325	KM521392
<i>D. oliveri</i> Thailand1	Niyomdham 915 (C)	KM521321	KM521393
<i>D. oliveri</i> Thailand2	Thai-Leiden Expedition 1973 5841 (E)	KM521323	KM521394
<i>D. oliveri</i> Thailand3	Bloembergen 528 (K)	KM521294	KM521395
<i>D. oliveri</i> Thailand4	Larsen 2153 (L)	KM521324	KM521396
<i>D. oliveri</i> Vietnam	Hartvig Larsen 13 (C)	KM521322	KM521397

Specimen name, incl. origin	Voucher	Genbank accession numbers	
		matK	ITS
<i>D. ovata</i> Myanmar	Po Khant 1084 (K)	KM521327	-
<i>D. ovata</i> Thailand	Maxwell 75-159 (L)	KM521328	KM521398
<i>D. pinnata</i> Bangladesh	Huq & A.I. 10430 (L)	KM521330	KM521399
<i>D. pinnata</i> Borneo	Lugas 1843 (K)	KM521329	KM521400
<i>D. pinnata</i> Vietnam	Cuong et al 1045 (L)	-	KM521401
<i>D. rimosa</i> China	M. Czako, Univ. South Carolina, USA (coll. from Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Yunnan, China)	KM521271	KM521402
<i>D. rimosa</i> Laos	Libman & Souliya LAOS_628 (L)	KM521333	KM521403
<i>D. rimosa</i> Thailand1	Larsen 45463 (L)	KM521332	KM521404
<i>D. rimosa</i> Thailand2	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521334	KM521405
<i>D. sericea</i> Bhutan	Grierson & Long 1711 (K)	KM521336	KM521406
<i>D. rimosa</i> Thailand3	Bjørnland/Schumacher 570 (C)	KM521299	KM521376
<i>D. sissoo</i> India	Hiremath 111 (K)	-	KM521407
<i>D. sissoo</i> Nepal	Herbal Garden, Kanazawa Univ. Japan (East Nepal) 9555013 (E)	KM521338	KM521408
<i>D. sissoo</i> Pakistan	Rechinger 29498 (AAU)	KM521337	KM521409
<i>D. stipulacea</i> Bangladesh	Huq & A.I. 10437 (L)	-	KM521410
<i>D. stipulacea</i> Bhutan	Grierson & Long 3555 (K)	KM521341	KM521411
<i>D. stipulacea</i> Laos	Newman et al. LAO 322 (E)	KM521340	KM521412
<i>D. stipulacea</i> Thailand	Larsen 2995 (C)	KM521339	KM521413
<i>D. subcymosa</i> Brazil	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521342	KM521414
<i>D. trichocarpa</i> Madagascar1	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521343	KM521415
<i>D. trichocarpa</i> Madagascar2	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521344	KM521416
<i>D. velutina</i> Bangladesh	Huq & Mia 10336 (L)	KM521335	KM521417
<i>D. velutina</i> Indonesia1	Argent & Wilkie 941 (E)	KM521345	KM521418
<i>D. velutina</i> Indonesia2	Kessler et al BK2022 (L)	KM521348	KM521419
<i>D. velutina</i> Laos1	Newman et al LAO 302 (E)	KM521346	-
<i>D. velutina</i> Laos2	Svengsuksa BT 334 (L)	KM521347	KM521420
<i>D. volubilis</i> Thailand1	Niyomdham et al. 1326 (AAU)	KM521350	-
<i>D. volubilis</i> Thailand2	Maxwell 74-142 (AAU)	KM521349	-
<i>Machaerium lunatum</i>	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521425	KM521421
<i>Machaerium salvadorese</i>	living coll., M. Czako, Univ. South Carolina, USA	KM521352	KM521422

Letters in brackets correspond to herbarium codes, L = National Herbarium Nederland, Leiden University branch, AAU = Aarhus University, Denmark,

C = Natural History Museum of Denmark, Copenhagen, E = Royal Botanic Garden Edinburgh, UK, K = Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

"-" means sequencing failed.

Table 9 Nucleotide sequence variation in the matK and ITS genes of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre

Population	<i>MatK</i>					
	<i>N</i>	<i>s</i>	<i>H</i>	<i>U_h</i>	<i>H_d</i> ± SD	Π ± SD
Dc_CCO-TT	4	12	2	0	0.667 ± 0.204	0.010 ± .003
Dc_KKN-WK	6	28	6	6	1.000 ± 0.009	0.014 ± 0.003
Dc_NMA-KB	3	10	3	3	1.000 ± 0.074	0.008 ± 0.002
Dc_SKW-WY	3	10	3	3	1.000 ± 0.272	0.008 ± 0.002
Dc_SNK-M	5	12	5	5	1.000 ± 0.126	0.007 ± 0.001
Dc_SNK-PP	5	22	5	5	1.000 ± 0.126	0.012 ± 0.003
Dc_SRN-KC	4	10	2	0	0.667 ± 0.204	0.008 ± 0.002
Dc_SSK-KL	3	0	1	0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Dc_SSK-PS	4	11	2	0	0.667 ± 0.204	0.009 ± 0.003
Dc_TRT-KY	4	4	2	0	0.667 ± 0.204	0.003 ± 0.001
Dc_TRT-M	4	5	2	0	0.667 ± 0.204	0.004 ± 0.001
Dc_UBN-NC	-	-	-	-	-	-
Dc_UBN-NY	-	-	-	-	-	-
Dc_MDH	-	-	-	-	-	-
Dc_PLK	-	-	-	-	-	-
Dc_SRI	3	0	1	0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Dc_UDN	-	-	-	-	-	-
Total	48	66	34	22	0.986 ± 0.007	0.016 ± 0.002
<i>ITS</i>						
Dc_CCO-TT	4	0	1	0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Dc_KKN-WK	7	11	7	5	1.000 ± 0.076	0.008 ± 0.001
Dc_NMA-KB	3	2	3	2	1.000 ± 0.272	0.002 ± 0.001
Dc_SKW-WY	3	2	2	0	0.667 ± 0.314	0.002 ± 0.001
Dc_SNK-M	5	5	5	1	1.000 ± 0.126	0.004 ± 0.001
Dc_SNK-PP	5	4	4	0	0.900 ± 0.161	0.004 ± 0.001
Dc_SRN-KC	3	3	3	0	1.000 ± 0.272	0.004 ± 0.001
Dc_SSK-KL	4	3	2	0	0.667 ± 0.204	0.003 ± 0.001
Dc_SSK-PS	4	1	2	0	0.500 ± 0.265	0.001 ± 0.000
Dc_TRT-KY	3	1	2	0	0.667 ± 0.314	0.001 ± 0.000
Dc_TRT-M	3	1	2	1	0.667 ± 0.314	0.001 ± 0.000
Dc_UBN-NC	3	1	2	0	0.667 ± 0.314	0.001 ± 0.000
Dc_UBN-NY	3	0	1	0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Dc_MDH	4	4	3	0	0.833 ± 0.222	0.004 ± 0.001
Dc_PLK	4	6	4	2	1.000 ± 0.177	0.004 ± 0.001
Dc_SRI	3	2	3	2	1.000 ± 0.272	0.002 ± 0.001
Dc_UDN	4	5	3	2	0.833 ± 0.222	0.004 ± 0.001
Total	65	17	31	15	0.968 ± 0.008	0.007 ± 0.000

N = number of *H. nassa* examined, *s* = number of polymorphic sites, *H* = number of haplotypes,

U_h = unique haplotypes, *H_d* = haplotype diversity, Π = nucleotide diversity

4.3.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพะยูน (Genetic differentiation)

ผลการประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร (pairwise genetic differentiation, Φ_{ST}) โดยวัดจากความแตกต่างของแต่ละประชากรย่อยเปรียบเทียบกับประชากรรวมทั้งหมด เป็นการวัดที่ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมภายในประชากรพะยูนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ แสดงผลใน table 10 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) ผลการวิเคราะห์ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* โดยที่ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรม (pairwise genetic differentiation- Φ_{ST}) ของพะยูนจำนวน 12 กลุ่มประชากร พบว่าพะยูนจากป่าธรรมชาติที่มีค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมต่ำที่สุดคือพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดอุบลราชธานี (UBN-NC)

พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดมุกดาหาร (MDH) แหล่งป่าธรรมชาติจากจังหวัดพิษณุโลก (PLK) และพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดอุดรธานี มีค่า Φ_{ST} เท่ากับ 0.000 ซึ่งหมายความว่าพะยูนกลุ่มเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมกับพะยูนในแหล่งอื่น ๆ

สำหรับความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรม หรือเรียกว่าค่า Pairwise genetic differentiation- Φ_{ST} ที่มีค่าสูงที่สุด ได้แก่ พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสระบุรี (SRI) โดยมีค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยูนแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดตราด (TRT-KY, TRT-M) มากที่สุด มีค่า Φ_{ST} เท่ากับ 0.953 และ 0.944 รองลงมาคือพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดตราด (TRT-M) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยูนแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดศรีสะเกษ (SSK-KL) ซึ่งมีค่า Φ_{ST} เท่ากับ 0.912 และพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสุรินทร์โดยมีค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยูนแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมันจังหวัดนครราชสีมา มีค่า Φ_{ST} เท่ากับ 0.912

2) ผลการวิเคราะห์ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* โดยที่ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรม (pairwise genetic differentiation- Φ_{ST}) ของพะยูนจำนวน 17 กลุ่มประชากร พบว่าพะยูนจากป่าธรรมชาติที่มีค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมต่ำที่สุดคือพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสกลนคร (SNK-M-1) ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมกับพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสกลนคร (SNK-PP)

พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดตราด (TRT-KY) ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมพะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดอุบลราชธานี (UBN-NC) พะยูนในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดมุกดาหาร (MDH) ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมพะยูนในแหล่งป่า

ธรรมชาติจังหวัดพิษณุโลก (PLK) โดยที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรม มีค่า D_{ST} เท่ากับ 0.000

สำหรับความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรม หรือเรียกว่าค่า Pairwise genetic differentiation- D_{ST} ที่มีค่าสูงที่สุด ได้แก่ พะยงในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดฉะเชิงเทรา (CCO-TT) มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยงในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดอุบลราชธานี (UNB-NY) โดยมีค่า D_{ST} เท่ากับ 1.000

พะยงในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสุรินทร์ (โดยมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยงแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดตราดมากที่สุด มีค่า D_{ST} เท่ากับ 0.953 และ 0.944 รองลงมาคือพะยงในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดตราด ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยงแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดศรีสะเกษ ซึ่งมีค่า D_{ST} เท่ากับ 0.912 และพะยงในแหล่งป่าธรรมชาติจังหวัดสุรินทร์โดยมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางพันธุกรรมจากพะยงแหล่งป่าธรรมชาติป่าคลองน้ำมันจังหวัดนครราชสีมา มีค่า D_{ST} เท่ากับ 0.912

4.3.4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะด้านสัณฐานวิทยาของแม่ไม้พะยง

สำหรับพิจารณาในการคัดเลือกแม่ไม้พะยงสำหรับนำมาปลูกครั้งนี้ เนื่องจากได้ทำการประเมินลักษณะรูปทรงของแม่ไม้พะยงที่จะเก็บตัวอย่างโดยใช้เกณฑ์การประเมินด้านความเจริญเติบโตดี ลำต้นกลม เปล่า ตรง คุณภาพเนื้อไม้ดี มีการลิดกิ่งตามธรรมชาติดี กิ่งมีขนาดปานกลาง ถึงเล็กเมื่อเทียบกับลำต้น มีเรือนยอดเล็ก ได้สัดส่วน และรูปทรงดี มีด้านทานต่อโรคและแมลง มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีตลอดจนออกดอกช้า เมื่อใช้เกณฑ์การคัดเลือกที่จำเพาะ ทำให้ได้ตัวอย่างที่มีความพิเศษเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวัสดุพันธุกรรมพะยงสายพันธุ์ดีเพื่อการขยายพันธุ์ตลอดจนการอนุรักษ์สายพันธุ์ต่อไป และเมื่อพิจารณาพร้อมกับผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมครั้งนี้ สามารถวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) พบว่ารูปแบบของยีน (alleles) *matK* ของพะยง พบว่ากลุ่มประชากรพะยงที่ศึกษามีความเป็นพิเศษเฉพาะของแต่ละกลุ่ม (unique haplotype) ทั้งหมด 34 haplotypes โดยมีค่า Haplotype diversity (h) อยู่ระหว่าง 0.000-1.000 ซึ่งจัดว่ามีค่าสูง ส่วนค่า Nucleotide diversity (π) ในพะยงแต่ละประชากร อยู่ระหว่าง 0.000-0.014 จัดว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ตามลำดับในขณะที่ยีน *ITS* พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 31 haplotypes แต่พบกลุ่มที่มีความพิเศษเฉพาะเพียง 15 haplotypes ความหลากหลายของ haplotype 0.000 ± 1.000 และ Nucleotide diversity ที่ 0.000-0.008 ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า

Nucleotide diversity ของทั้ง 2 ยีนแล้วพบว่ามิพะยุงที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยุง ที่ได้มีนักวิจัยทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยุง 10 กลุ่มประชากรที่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของไทยรวมถึงประเทศลาว พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำเพราะมีค่า haplotype diversity (h) และค่า nucleotide diversity (π) เท่ากับ 0.608 และ 0.00033 และพบรูปแบบดีเอ็นเอรวม 11 haplotypes และพบว่ามีปรากฏในสัดส่วนที่แตกต่างกัน จำนวน haplotype ที่พบอยู่ระหว่าง 1-4 haplotype ในแต่ละกลุ่มประชากร (ราตรี อยู่เย็น, 2556) แต่ทั้งนี้เป็นการศึกษาด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมเพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์เป็นยีนกึ่งอนุรักษ์ ผู้วิจัยได้เสนอแนะไว้ว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถอธิบายความแปรผันทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

จากการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยุงในครั้งนี้ ให้ความสอดคล้องกับคำอธิบายด้านพันธุศาสตร์และลักษณะสัณฐานวิทยาของพืช ทั้งนี้ลักษณะพันธุกรรมของพืชมีบทบาทสำคัญในการกำหนดสัณฐานวิทยาซึ่งหมายถึงลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของพืช ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์และสัณฐานวิทยาในพืชมีความซับซ้อนและมีหลายแง่มุม เนื่องจากปัจจัยทางพันธุกรรมมีอิทธิพลต่อการพัฒนาการของพืชในแง่มุมต่าง ๆ รวมถึงรูปแบบการเจริญเติบโต รูปร่างใบ โครงสร้างดอก และสถาปัตยกรรมโดยรวมของพืช โดยที่พืชชนิดต่างๆ มียีนที่ควบคุมลักษณะกายภาพโดยรวมและการพัฒนาของส่วนต่าง ๆ ยีนเหล่านี้ควบคุมการสร้างราก ลำต้น ใบ และดอก ตัวอย่างเช่น ยีนโฮมติกกำหนดลักษณะเฉพาะของอวัยวะดอกไม้ เช่น กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้ และคาร์เพล ซึ่งมีส่วนรวมในการสร้างสัณฐานวิทยา ปัจจัยทางพันธุกรรมมีอิทธิพลต่อการผลิตและการส่งสัญญาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน และกรดแอบไซซิก ฮอรโมนเหล่านี้ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ การยืดตัว และความแตกต่าง จึงมีอิทธิพลต่อสัณฐานวิทยาของพืช การแปรผันทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอรโมนและการตอบสนอง ซึ่งนำไปสู่ความแตกต่างในการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของพืช การแสดงออกของยีนเป็นการแสดงออกของยีนเฉพาะในระยะต่าง ๆ ของการพัฒนาพืชมีความสำคัญต่อการสร้างสัณฐานวิทยาของพืช ปัจจัยทางพันธุกรรมควบคุมเวลา ตำแหน่ง และระดับของการแสดงออกของยีน ตัวอย่างเช่น การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของใบจะเป็นตัวกำหนดรูปร่าง ขนาด และการจัดเรียงของใบบนลำต้น

การเกิด Polyploidy และ Hybridization เป็นสิ่งที่สามารถใช้อธิบายการแปรผันทางพันธุกรรม เช่น polyploidy (มีโครโมโซมหลายชุด) และการผสมข้ามพันธุ์ (การผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์หรือพันธุ์ต่างๆ) สามารถส่งผลกระทบต่อสัณฐานวิทยาของพืชได้อย่างมีนัยสำคัญ กระบวนการเหล่านี้

สามารถแนะนำการผสมยีนใหม่และเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสัณฐานวิทยาของพืช นอกจากนี้ด้านความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมและถิ่นกำเนิดก็มีส่วนให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม แม้ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมจะเป็นตัวกำหนดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชเป็นหลัก แต่สภาวะแวดล้อมก็สามารถมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืชได้เช่นกัน ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ และสารอาหารที่มีอยู่ สามารถส่งผลต่อสัณฐานวิทยาของพืชในการตอบสนองต่อปัจจัยเหล่านี้ สิ่งสำคัญคือต้องสังเกตว่าความสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์และสัณฐานวิทยามีความซับซ้อนสูง และการศึกษาพันธุศาสตร์พืชและผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นพื้นที่ของการวิจัย ความก้าวหน้าทางอณูชีววิทยาและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถเข้าใจและจัดการกับสัณฐานวิทยาของพืชได้ดีขึ้นโดยกำหนดเป้าหมายไปที่ยีนและวิถีทางพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจง



Table 10 Pairwise genetic differentiation (Φ_{ST}) of 13 populations of rosewood using the nucleotide sequences of *matK* gene (top triangle) and 17 populations of *ITS* gene (bottom triangle)

Population	CCO-TT	KKN-WK	NMA-KB	SKW-WY	SNK-M	SNK-PP	SRN-KC	SSK-KL	SSK-PS	TRT-KY	TRT-M	UBN-NC	UBN-NY	MDH	PLK	SRI	UDN
CCO-TT	-	0.063	0.111	0.176	0.087	0.111	0.228	0.753	0.303	0.333	0.244*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.872*	0.000
KKN-WK	0.435*	-	0.011	0.063	0.091	0.123*	0.104	0.602*	0.190*	0.243*	0.134*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.799*	0.000
NMA-KB	0.429	0.355*	-	0.130	0.152	0.131	0.130	0.815	0.172	0.169	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.912	0.000
SKW-WY	0.111	0.264*	0.077	-	0.039	0.090	0.130	0.818	0.369*	0.169	0.176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.898*	0.000
SNK-M	0.747*	0.100	0.685*	0.635*	-	0.000	0.283*	0.786*	0.382*	0.256*	0.192	0.000	0.000	0.000	0.000	0.888*	0.000
SNK-PP	0.768**	0.096	0.703*	0.653*	0.000	-	0.257*	0.695*	0.359**	0.279	0.255*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.809*	0.000
SRN-KC	0.676**	0.301*	0.500	0.312	0.635*	0.651**	-	0.769**	0.263	0.417*	0.286*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.893*	0.000
SSK-KL	0.778*	0.049	0.667*	0.587*	0.216	0.236	0.572*	-	0.704*	0.912*	0.880*	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
SSK-PS	0.933*	0.510*	0.813*	0.759**	0.775**	0.792**	0.007	0.787*	-	0.474**	0.238	0.000	0.000	0.000	0.000	0.892	0.000
TRT-KY	0.884*	0.371*	0.654	0.572	0.689**	0.710*	0.250	0.701*	0.727*	-	0.400*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.953*	0.000
TRT-M	0.919*	0.462**	0.769	0.700	0.730*	0.750*	0.500	0.751**	0.816*	0.600	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.944*	0.000
UBN-NC	0.884*	0.380*	0.700	0.571	0.689*	0.710*	0.250	0.701*	0.727*	0.000	0.333	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
UBN-NY	1.000*	0.446*	0.750	0.778	0.749**	0.772*	0.563	0.786*	0.892*	0.500	0.857	0.750	-	0.000	0.000	0.000	0.000
MDH	0.815*	0.204	0.740*	0.701*	0.128	0.040	0.686*	0.471	0.824*	0.754*	0.784*	0.754*	0.809	-	0.000	0.000	0.000
PLK	0.727*	0.013	0.646*	0.582**	0.000	0.000	0.582*	0.231	0.759*	0.653*	0.703	0.653*	0.729*	0.000	-	0.000	0.000
SRI	0.724*	0.135	0.478	0.143	0.592*	0.609**	0.214	0.458*	0.740*	0.571	0.700	0.571	0.778	0.669*	0.525*	-	0.000
UDN	0.667*	0.074	0.496	0.402*	0.578**	0.580*	0.406*	0.509*	0.695*	0.563*	0.656*	0.579*	0.655*	0.617*	0.496*	0.264*	-

P value *<0.05, **<0.001

4.4 ผลการศึกษาด้านการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.4.1 ผลการศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ

ผลการฟอกฆ่าเชื้อพบว่า เมื่อนำเมล็ดของไม้พะยูน (Figure 16) จากต้นแม่ไม้ที่มีลักษณะดี มาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปล้างน้ำเพื่อทำความสะอาดโดยให้ผ่านน้ำไหล ทำการล้างเมล็ดอย่างละเอียดด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำยาฟอกขาว (bleach solution 7 drops/100 mL distilled water, v/v) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการแบ่งเมล็ดจำนวน 25 เมล็ดต่อปิเก็ตวอร์ แชนแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นแล้ว ทำการฟอกฆ่าเชื้อ (sterilization treatments) ในตู้ laminar flow chamber โดยนำเมล็ด 25 เมล็ดต่อขวด ทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% Hieter ความเข้มข้น 30% และ Tween 20 จำนวน 2 หยด เขย่าขวดเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางเมล็ดของพะยูนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนจานแก้วซับด้วยกระดาษซับน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำลงเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS สูตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดซึ่งเป็นการฟอกฆ่าเชื้อที่ให้ผลสำเร็จในการเพาะเมล็ดพะยูนที่มีความปนเปื้อนน้อย



Figure 16 Physical characteristics of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre seeds taken with a Leica microscope

โดยที่การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดพะยูนแตกต่างจากการศึกษาของ ยุพา มงคลสุข และคณะ (2555) ได้ศึกษาการพัฒนาเทคโนโลยีการขยายพันธุ์ไม้พะยูนด้วยระบบ Temporary immersion เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมและ ผลิตไม้แปรรูป โดยการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีเตรียมต้นพะยูนปลอดเชื้อและหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดในหลอดทดลอง วิธีฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมคือนำเมล็ดพะยูนมาจุ่มลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 1 นาที ล้างในน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ เป็นเวลา 5-10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง

4.4.2 ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

ทำการคัดเลือกเมล็ดที่เก็บมาจากแม่ไม้พะยูนจำนวน 3 ต้น แบ่งทดสอบที่ละแม่ไม้ทดสอบการงอกของเมล็ด ด้วยการกำหนดให้มีการปฏิบัติต่อเมล็ดก่อนเพาะเปรียบเทียบกับเพาะเมล็ดโดยตรง ใช้วิธีการขลิบเมล็ดเพียงเล็กน้อยหลังฟอกฆ่าเชื้อแล้วทำลงแช่ในน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเพาะเมล็ดลงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) medium โดยทำการเพาะลงขวดละ 5 เมล็ด จำนวน 20 ขวด รายละเอียดแสดงใน table 11

Table 11 Seed germination test and pre-seeding practices.

Treatment	Seeds	Germinated Date	Percentage Germination	Percentage contamination
Control (no treatment)	100	6 days after sowing	72%	40.00%
Soaking in distill water and clip seed coat (12hours)	100	3 days after sowing	90%	5.00%
Soaking in distill water and clip seed coat (24hours)	100	1-2 day after sowing	100%	0.00%

ผลการทดสอบการงอกของเมล็ดและการปฏิบัติก่อนเพาะ 3 วิธี ได้แก่ 1) ไม่ทำอะไรๆ กับเมล็ดเลย 2) ขลิบเปลือกเมล็ดและแช่น้ำฟอกฆ่าเชื้อ (distilled water) 12 ชั่วโมง และ 3) ขลิบเปลือกเมล็ดและแช่น้ำ distilled water 24 ชั่วโมง พบว่าวิธีที่ทำให้เมล็ดงอกเร็วที่สุดคือวิธีที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การงอก 100% และไม่พบการปนเปื้อนในขวดเพาะเลี้ยง (contamination) ภาพการผลการทดสอบการงอกของเมล็ดและการปฏิบัติก่อนเพาะ แสดงดัง Figure 17

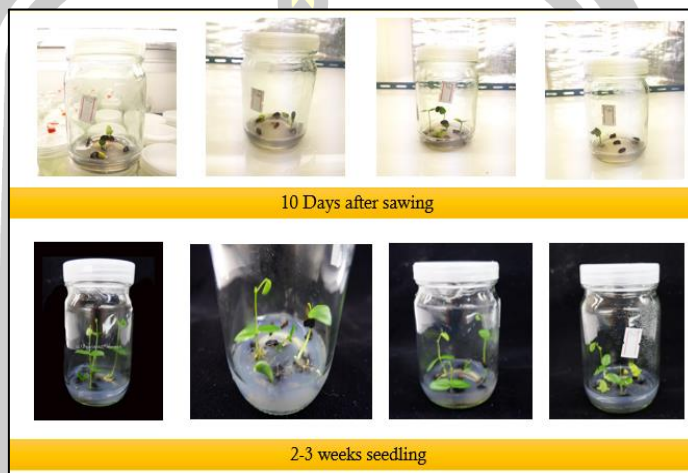


Figure 17 Seedlings of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre seeds at 2-3 weeks.

4.4.3 ผลการศึกษาการชักนำและเพิ่มปริมาณยอด (shoot initiation and shoot proliferation)

เมื่อนำเมล็ดหรือยอดอ่อนหรือตาข้างของไม้พะยูนที่ได้จากการปักชำกิ่งหรือหน่อราก (root sucker) มาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปล้างน้ำเพื่อทำความสะอาดโดยให้ผ่านน้ำไหล นำไปล้างด้วยน้ำยา ล้างจาน 3 ครั้ง จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด เช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไป ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวางบนจานแก้ว ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตามด้วยฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่า เชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางเมล็ด หรือยอดอ่อน หรือตาข้างของพะยูนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลง บนจานแก้วชุบด้วยกระดาษซับน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีความยาว 2 เซนติเมตร แล้วนำลง เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS สูตร ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างกัน ได้แก่ BAP Kinetin และ NAA ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ให้ผลดัง table 12 และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ดัง table 13 และภาพการเตรียม Explants สำหรับเพาะในอาหารที่ชักนำยอด แสดงใน Figure 18-20

Table 12 The number of shoots obtained on the MS medium supplemented with different concentrations of BAP and NAA.

No	Media	Normal Shoot
1	0Ms	0.89±0.04
2	Ms+0.4BAP+0NAA	1.14±0.00 ^{ab}
3	Ms+0.8BAP+0NAA	1.19±0.08
4	Ms+1.6BAP+0NAA	2.24±0.17
5	Ms+0BAP+0.1NAA	0.93±0.08
6	Ms+0.4BAP+0.1NAA	1.20±0.08 ^{ab}
7	Ms+0.8BAP+0.1NAA	1.25±0.16 ^b
8	Ms+1.6BAP+0.1NAA	1.88±0.10 ^c
9	Ms+0BAP+0.2NAA	0.95±0.08
10	Ms+0.4BAP+0.2NAA	1.01±0.02 ^{ab}
11	Ms+0.8BAP+0.2NAA	1.03±0.05
12	Ms+1.6BAP+0.2NAA	1.95±0.07 ^c
13	Ms+0BAP+0.4NAA	1.01±0.02
14	Ms+0.4BAP+0.4NAA	1.02±0.04 ^{ab}
15	Ms+0.8BAP+0.4NAA	1.02±0.03 ^b
16	Ms+1.6BAP+0.4NAA	2.04±0.12 ^c

Table 13 Analysis of variance of MS medium supplemented with different concentrations of BAP and NAA.

Source	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.965 ^a	6	0.494	44.090	0.000
Intercept	25.673	1	25.673	2290.819	0.000
BAP	2.925	3	0.975	87.012	0.000*
NAA	0.045	3	0.015	1.352	0.318
Error	0.101	9	0.011		
Total	29.976	16			
Corrected Total	3.066	15			

a. R Squared = 0.967 (Adjusted R Squared = 0.945)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยที่พบว่า สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดสูงได้แก่ อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วย Ms+1.6BAP+0NAA อาหารสูตรที่ 16 ประกอบด้วย Ms+1.6BAP+0.4NAA อาหารสูตรที่ 12 ประกอบด้วย Ms+1.6BAP+0.2NAA และอาหารสูตรที่ 8 ประกอบด้วย Ms+1.6BAP+0.1NAA โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.17 1.97 1.90 และ 1.80 ยอดตามลำดับ

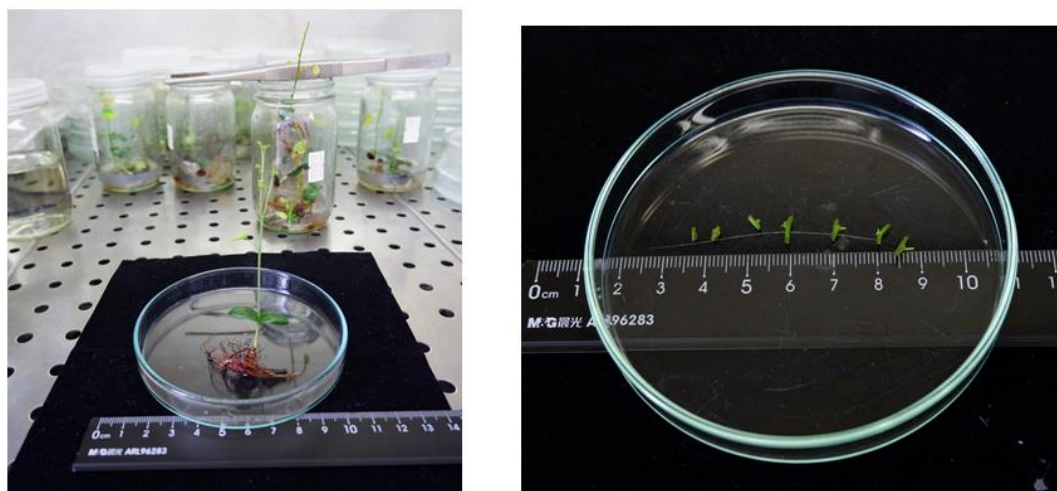


Figure 18 Preparation of explants from seedling in shoot-inducing medium.



Figure 19 The 4 best mediums for shoot initiation.

Note : Formular 4 : Ms+1.6BAP+0NAA Formular 8 : Ms+1.6BAP+0.1NAA
 Formular 12 : Ms+1.6BAP+0.2NAA Formular 16 : Ms+1.6BAP+0.4NAA

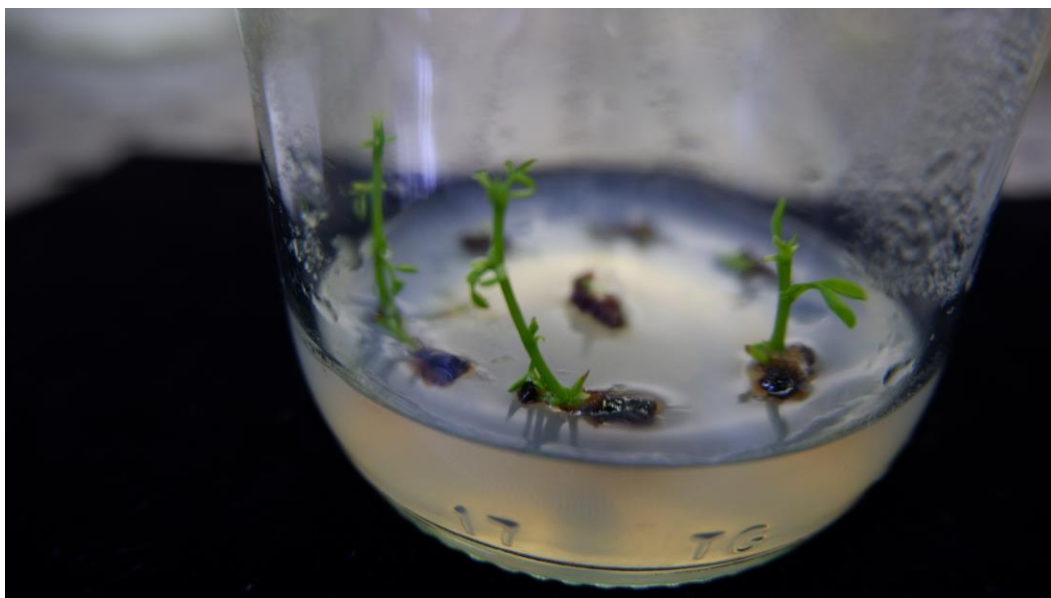


Figure 20 Young shoot of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre after inoculation in medium.

4.4.4 ผลการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis)

ผลการทดลองการชักนำเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) (Sing and Chand, 2003) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเติบโตของแคลลัส (callus induction and growth) โดยนำเมล็ด หรือยอดอ่อน หรือตาข้างของไม้พะยูนที่ได้จากการปักชำกิ่งหรือหน่อราก (root sucker) มาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปล้างน้ำเพื่อทำความสะอาดโดยให้ผ่านน้ำไหล นำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 3 ครั้ง จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด เช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางเมล็ด หรือยอดอ่อน หรือตาข้างของพะยูนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนจานแก้วชุบด้วยกระดาษซับน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีความยาว 2 เซนติเมตร แล้วนำลงเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างกัน ได้แก่ Kinetin และ 2,4-D ที่มีความเข้มข้นต่างกัน การเตรียมอาหารสำหรับทดลองการชักนำเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายแสดงดัง Figure 21-24



Figure 21 Media preparing for callus induction.

Note : a= pH adjustment b=medium in flask for autoclave
c=autoclave d=transfer medium to peti-disc

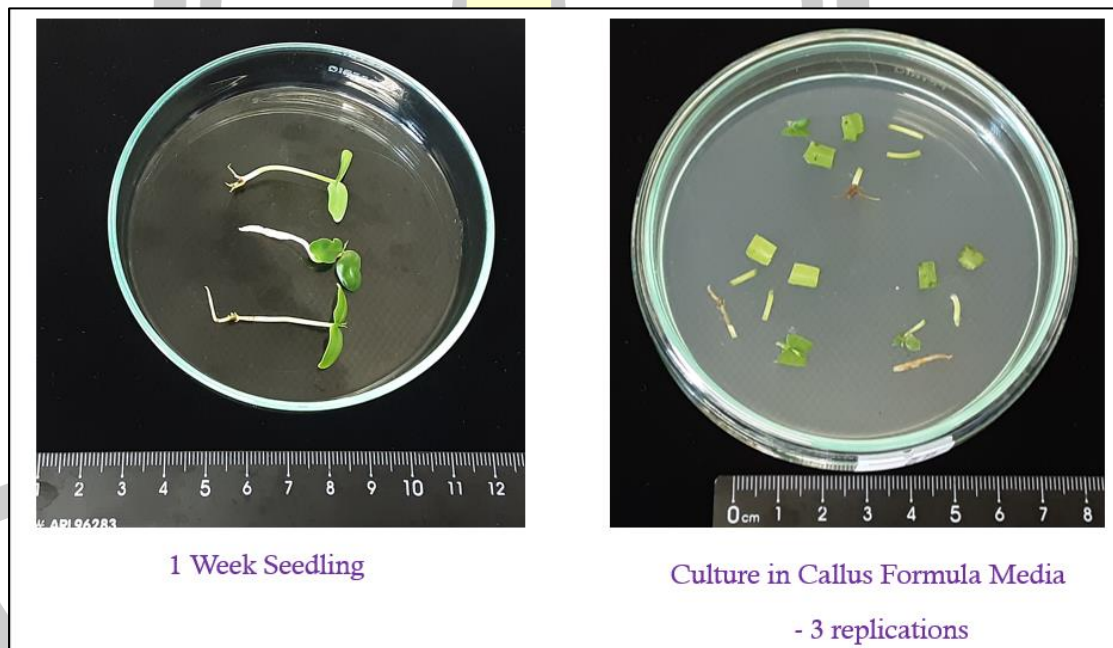


Figure 22 Preparation of explants for studying callus induction.

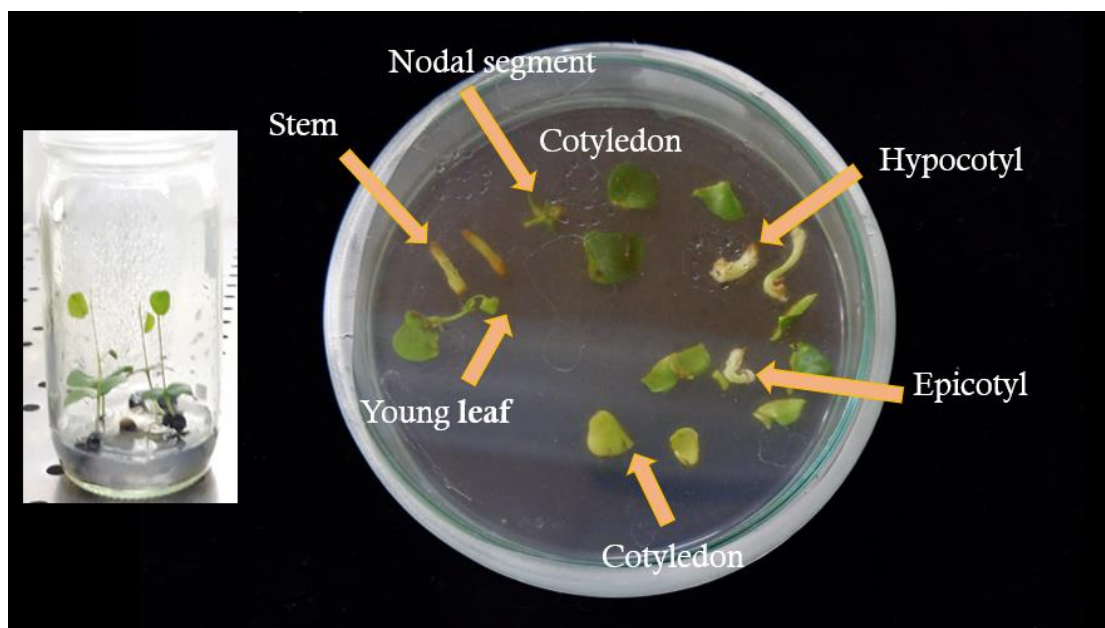


Figure 23 Part of explants for studying callus induction.

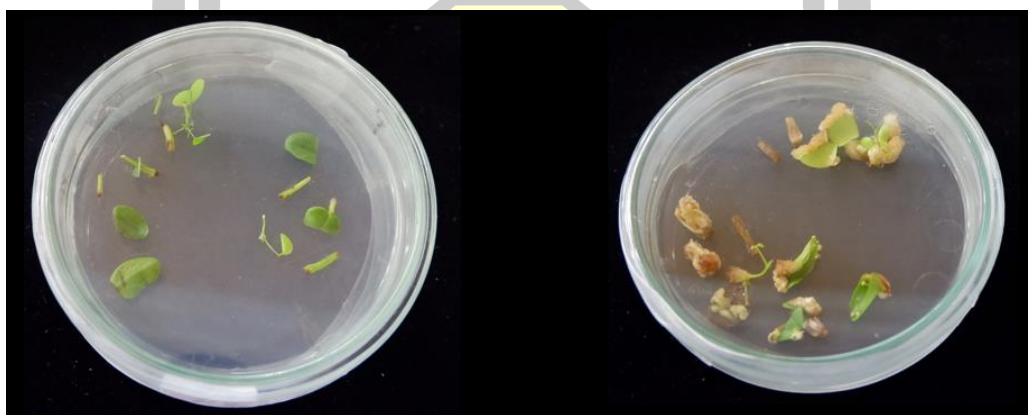


Figure 24 Callus induction of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre at 3 weeks.

Table 14 Callus formation of various explant sources.

Explant	Number (pieces/formula)	Number of Callus induction	Percentages	Type of Callus
Cotyledon	128	53	41.41	Friable
Hypocotyls	6	5	83.33	Friable
Epicotyl	6	5	83.33	Friable
Root	3	1	33.33	Friable
Young leaf	6	6	100.00	Compact
Shoot	6	6	100.00	Compact

Table 15 Callus formation of cotyledon fragments at different concentrations of medium.

No	Media	No of Explant	Callus Number $\pm$ SD	Type of Callus
1	Ms+0 2,4-D+ 0 Kinetin	8	0.00 $\pm$ 0.00	Friable
2	Ms+0.4 2,4-D+ 0 Kinetin	8	2.00 $\pm$ 0.00	Friable
3	Ms+0.8 2,4-D+ 0 Kinetin	8	2.67 $\pm$ 0.58	Friable
4	Ms+1.6 2,4-D+ 0 Kinetin	8	3.67 $\pm$ 0.58	Friable
5	Ms+0 2,4-D+ 0.1 Kinetin	8	0.00 $\pm$ 0.00	Friable
6	Ms+0.4 2,4-D+ 0.1 Kinetin	8	4.00 $\pm$ 0.00	Friable
7	Ms+0.8 2,4-D+ 0.1 Kinetin	8	4.00 $\pm$ 0.00	Friable
8	Ms+1.6 2,4-D+ 0.1 Kinetin	8	4.00 $\pm$ 0.00	Friable
9	Ms+0 2,4-D+ 0.2 Kinetin	8	0.00 $\pm$ 0.00	Friable
10	Ms+0.4 2,4-D+ 0.2 Kinetin	8	4.00 $\pm$ 0.00	Friable
11	Ms+0.8 2,4-D+ 0.2 Kinetin	8	4.00 $\pm$ 0.00	Friable
12	Ms+1.6 2,4-D+ 0.2 Kinetin	8	8.00 $\pm$ 0.00	Friable
13	Ms+0 2,4-D+ 0.4 Kinetin	8	0.00 $\pm$ 0.00	Friable
14	Ms+0.4 2,4-D+ 0.4 Kinetin	8	4.67 $\pm$ 0.58	Friable
15	Ms+0.8 2,4-D+ 0.4 Kinetin	8	4.33 $\pm$ 0.58	Friable
16	Ms+1.6 2,4-D+ 0.4 Kinetin	8	7.33 $\pm$ 0.58	Friable

Table 16 Callus formation on MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and Kinetin.

No	Media	%Callus
1	Ms+0 2,4-D+ 0 Kinetin	0.00 ^a
2	Ms+0.4 2,4-D+ 0 Kinetin	25.00 ^b
3	Ms+0.8 2,4-D+ 0 Kinetin	33.33 ^c
4	Ms+1.6 2,4-D+ 0 Kinetin	45.83 ^d
5	Ms+0 2,4-D+ 0.1 Kinetin	0.00 ^a
6	Ms+0.4 2,4-D+ 0.1 Kinetin	50.00 ^b
7	Ms+0.8 2,4-D+ 0.1 Kinetin	50.00 ^c
8	Ms+1.6 2,4-D+ 0.1 Kinetin	50.00 ^d
9	Ms+0 2,4-D+ 0.2 Kinetin	0.00 ^a
10	Ms+0.4 2,4-D+ 0.2 Kinetin	50.00 ^b
11	Ms+0.8 2,4-D+ 0.2 Kinetin	50.00 ^c
12	Ms+1.6 2,4-D+ 0.2 Kinetin	100.00 ^d
13	Ms+0 2,4-D+ 0.4 Kinetin	0.00 ^a
14	Ms+0.4 2,4-D+ 0.4 Kinetin	58.33 ^b
15	Ms+0.8 2,4-D+ 0.4 Kinetin	54.17 ^c
16	Ms+1.6 2,4-D+ 0.4 Kinetin	91.67 ^d
		41.15

Table 17 Analysis of variance of MS medium supplemented with 2,4-D and Kinetin at different concentrations.

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
2,4-D	16.000	6	2.667	6.000	0.009*
Kinetin	9.473	6	1.579	1.358	0.326

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D และ Kinetin พบว่าสูตรอาหารที่เติม 2,4-D จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยที่พบว่า สูตรอาหารที่ทำให้เกิดแคลลัสมากที่สุดได้แก่ อาหารสูตร 12DK ซึ่งเป็นสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D จำนวน 2.4mg/L และเติม Kinetin 0.30 mg/L โดยที่ชิ้นส่วนพืชที่ได้แคลลัสมากที่สุดคือ ชิ้นส่วนใบเลี้ยง หรือ Cotyledon explants

เมื่อทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่ทำให้เกิดแคลลัสมากที่สุดได้แก่ อาหารสูตร 12DK ซึ่งเป็นสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D จำนวน 2.4mg/L และเติม Kinetin 0.30 mg/L แล้ว จากนั้นทำการศึกษาการเลี้ยงและขยายปริมาณแคลลัสด้วยอาหารสูตรที่ 12DK โดยทำการทดลอง 4 แบบ ได้แก่ 1) สูตร 12DK 2) สูตร 12DK ที่เติมน้ำมะพร้าว 100 ml/L 3) สูตร 12DK ที่เติมน้ำสกัดจากมันฝรั่ง 300 ml/L 4) สูตร 12DK ที่เติมทั้งน้ำมะพร้าวและน้ำสกัดจากมันฝรั่ง เพื่อศึกษาว่าสูตรไหนใช้เลี้ยงแคลลัสได้นานที่สุดและเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากที่สุด Figure 25

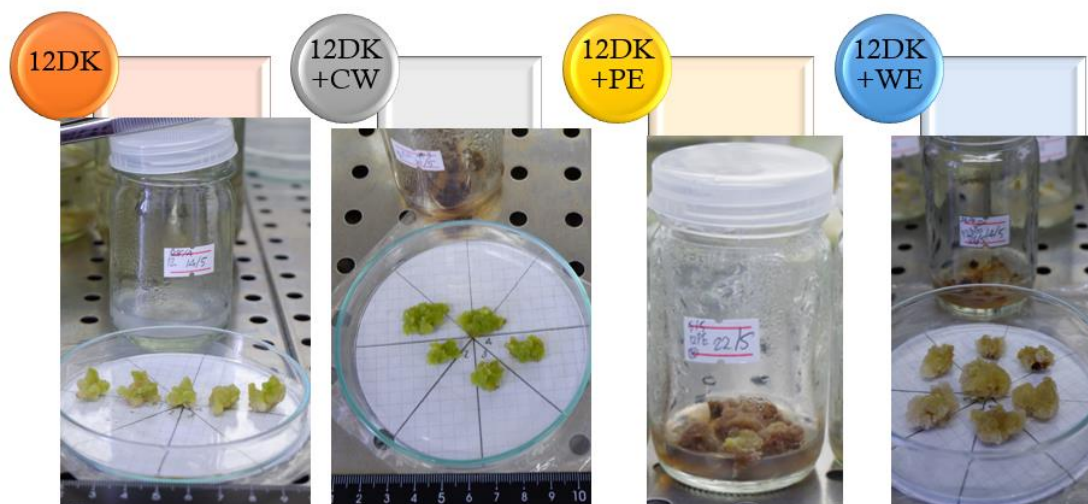


Figure 25 Callus Maintenance in each media.

ผลการทดลองพบว่าสูตร 12DK ให้ compact callus แต่มีการเติบโตไม่มากและเมื่อเลี้ยงไป 10 วันแคลลัสเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาล (brownish) และตายไปในที่สุด สูตรที่ 2 12DK+CW ให้ compact callus ที่มีสีเขียว เพิ่มปริมาณได้มากและอายุยาวกว่าสูตรที่ 1 สูตรที่ 3 12DK+PE ให้ Fiable callus และเลี้ยงได้ 10 10 วันแคลลัสเริ่มเกิดอาการสีน้ำตาล (brownish) และตายไปในที่สุด และสูตรที่ 4 12DK+WE ให้ผลเช่นเดียวกับสูตรที่ 3 แต่อยู่ได้นานกว่า

ดังนั้นสูตรที่ควรนำไปเลี้ยงแคลลัสคือสูตรที่ 2 12DK+CW และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงแคลลัสและทำการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพื่อหาอัตราการเติบโตและอายุของแคลลัสในการเพาะเลี้ยง พบว่าสามารถเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 2 อาทิตย์ จากนั้นแคลลัสจะเริ่มเกิดสีน้ำตาลและตาย จึงควรเปลี่ยนย้ายอาหารใหม่ทุก 14 วัน

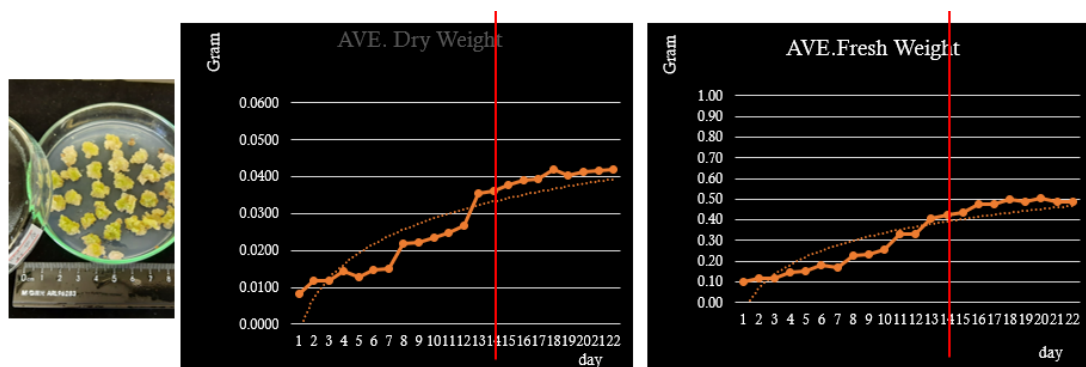


Figure 26 The average of dry weight and fresh weight of callus.



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สกัดดีเอ็นเอใบพะยูนด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) พบว่าได้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 22.44-154.19 (ng/μl) และมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง (ratio, A260/A280) 1.37-1.75 ซึ่งจากผลการสกัดดีเอ็นเอจะพบว่ามี ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพบว่าค่อนข้างมีการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ อยู่เล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับที่ Ribeiro & Lovato (2007) ได้รายงานว่ใบของต้นไม้ในสกุล *Dalbergia* มีสารทุติยภูมิเป็นจำนวนมากทำให้เป็นอุปสรรคในการสกัดดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่สะอาด ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตามต้องการ

5.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของพะยูน

จากแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของพะยูนวิเคราะห์ด้วย ลำดับเบสบริเวณ matK โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุลเดียวกันที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ พืชกลุ่มสกุล *Dalbergia* spp. จำนวน 78 ตัวอย่าง จากประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม ภูฏาน จีน เนปาล มาดากัสการ์ แทนซาเนีย พม่า อินเดีย บราซิล ฟลอริดา สหรัฐอเมริกา บังคลาเทศ อินโดนีเซีย บอร์เนียว ปาปัวนิวกินี และประดู่ป่า จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้ประดู่ป่า *Pterocarpus macrocarpas* Kurz (AB924813) เป็น out-group สามารถแบ่งเป็น 2 clades อย่างชัดเจน

จากแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของพะยูนวิเคราะห์ด้วย ลำดับเบสบริเวณ Internal transcribed spacer 4 (ITS4) โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ของพืชในสกุลเดียวกันที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ พืชกลุ่มสกุล *Dalbergia* 78 ตัวอย่าง จากประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม ภูฏาน จีน เนปาล มาดากัสการ์ แทนซาเนีย พม่า อินเดีย บราซิล ฟลอริดา สหรัฐอเมริกา บังคลาเทศ อินโดนีเซีย บอร์เนียว ปาปัวนิวกินี และประดู่ป่า จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้ประดู่ป่า *Pterocarpus macrocarpas* Kurz (AB924813) เป็น out-group สามารถแบ่งเป็น 2 clades อย่างชัดเจน โดยตัวอย่างพะยูนที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้จัดอยู่ใน Clades A

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนม *matK* พบว่ารูปแบบของยีน (alleles) *matK* ของพะยูน ทั้งหมด 48 ตัวอย่าง จาก 13 กลุ่มประชากร สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 34 haplotypes โดยพบว่าเป็น unique haplotypes ทั้ง 34 haplotypes โดยมีค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) ในพะยูนแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-1.000 และ 0.000-0.014 ตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมซึ่งถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่ฝ่ายเดียวเท่านั้น ทำให้รูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกับแม่และมีความพิเศษของแต่ละสายพันธุ์และแต่ละแหล่ง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Internal transcribed spacer 4 (ITS4) พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของพะยูนที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ITS4 ด้วยการวิเคราะห์แบบ neighbor-joining จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 65 ตัวอย่าง มีทั้งหมด 31 haplotype โดยพบ unique haplotype ทั้งหมด 15 haplotypes และมีค่า Haplotype diversity (h) และค่า Nucleotide diversity (π) ในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-1.000 และ 0.000-0.008 ตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนนิวเคลียสจีโนมซึ่งถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางพ่อและแม่ ทำให้รูปแบบดีเอ็นเอมีความผันแปรของไปตามพ่อและแม่ของแต่ละสายพันธุ์และแต่ละแหล่ง

การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่ายีน *ITS* มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่ายีน *matK* อาจเป็นเพราะยีน *matK* เป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งจะเป็นกึ่งอนุรักษ์ (conserve gene) มากกว่า จึงทำให้พบความแปรผันทางพันธุกรรมน้อยกว่า ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของราตรี (2559) ได้เสนอแนะไว้ว่า การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพะยูนด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนคลอโรพลาสต์จีโนมอย่างเดียวซึ่งถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านทางแม่ฝ่ายเดียวเท่านั้น รูปแบบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จึงเหมือนกับแม่ ความผันแปรทางพันธุกรรมจะม้น้อยกว่าในนิวเคลียสจีโนม เพราะฉะนั้นผลความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์ด้วยส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนมจึงมีค่าต่ำ ซึ่งผู้วิจัยได้เสนอแนะว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงควรศึกษาเพิ่มจากส่วนของนิวเคลียสจีโนมร่วมด้วย

5.2 การศึกษาด้านการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพะยูนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การฟอกฆ่าเชื้อพบว่า เมื่อนำเมล็ดของไม้พะยูนจากต้นแม่ไม้ที่มีลักษณะดีมาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปล้างน้ำเพื่อทำความสะอาดโดยให้ผ่านน้ำไหล ทำการล้างเมล็ดอย่างละเอียดด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำยาฟอกขาว (bleach solution 7 drops/100 mL distilled water, v/v) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการแบ่งเมล็ดจำนวน 25 เมล็ดต่อบีกเกอร์ แช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาทำการล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นแล้ว ทำการฟอกฆ่าเชื้อ (sterilization treatments) ในตู้ laminar flow chamber โดยนำเมล็ด 25 เมล็ดต่อขวด ทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% Hieter ความเข้มข้น 30% และ Tween 20 จำนวน 2 หยด เขย่าขวดเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นวางเมล็ดของพะยูนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนจานแก้วซับด้วยกระดาษซับน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำลงเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS สูตร เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดซึ่งเป็นการฟอกฆ่าเชื้อที่ให้ผลสำเร็จในการเพาะเมล็ดพะยูนที่มีความปนเปื้อนน้อย

การทดสอบการงอกของเมล็ดและการปฏิบัติก่อนเพาะ 3 วิธี ได้แก่ 1) ไม่ทำใดๆ กับเมล็ดเลย 2) ขลิบเปลือกเมล็ดและแช่น้ำ distilled water 12 ชั่วโมง และ 3) ขลิบเปลือกเมล็ดและแช่น้ำ distilled water 24 ชั่วโมง พบว่าวิธีที่ทำให้เมล็ดงอกเร็วที่สุดคือวิธีที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การงอก 100% และไม่พบการเกิดเชื้อปนเปื้อนหรือการเกิด Contamination

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยที่พบว่า สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดสูงได้แก่ อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0NAA$ อาหารสูตรที่ 16 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0.4NAA$ อาหารสูตรที่ 12 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0.2NAA$ และอาหารสูตรที่ 8 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0.1NAA$ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.17 1.97 1.90 และ 1.80 ยอดตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยที่พบว่า สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดสูงได้แก่ อาหารสูตรที่ 4 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0NAA$ อาหารสูตรที่ 16 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0.4NAA$ อาหารสูตรที่ 12 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0.2NAA$ และอาหารสูตรที่ 8 ประกอบด้วย $Ms+1.6BAP+0.1NAA$ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.17 1.97 1.90 และ 1.80 ยอดตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D และ Kinetin ความเข้มข้นต่างกัน ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยที่พบว่า สูตรอาหารที่ทำให้เกิดแคลลัสมากที่สุดได้แก่ สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D จำนวน 2.4mg/L และเติม Kinetin 0.30 mg/L โดยที่ชิ้นส่วนพืชที่ได้แคลลัสมากที่สุดคือ ชิ้นส่วนใบเลี้ยง (cotyledon explants)

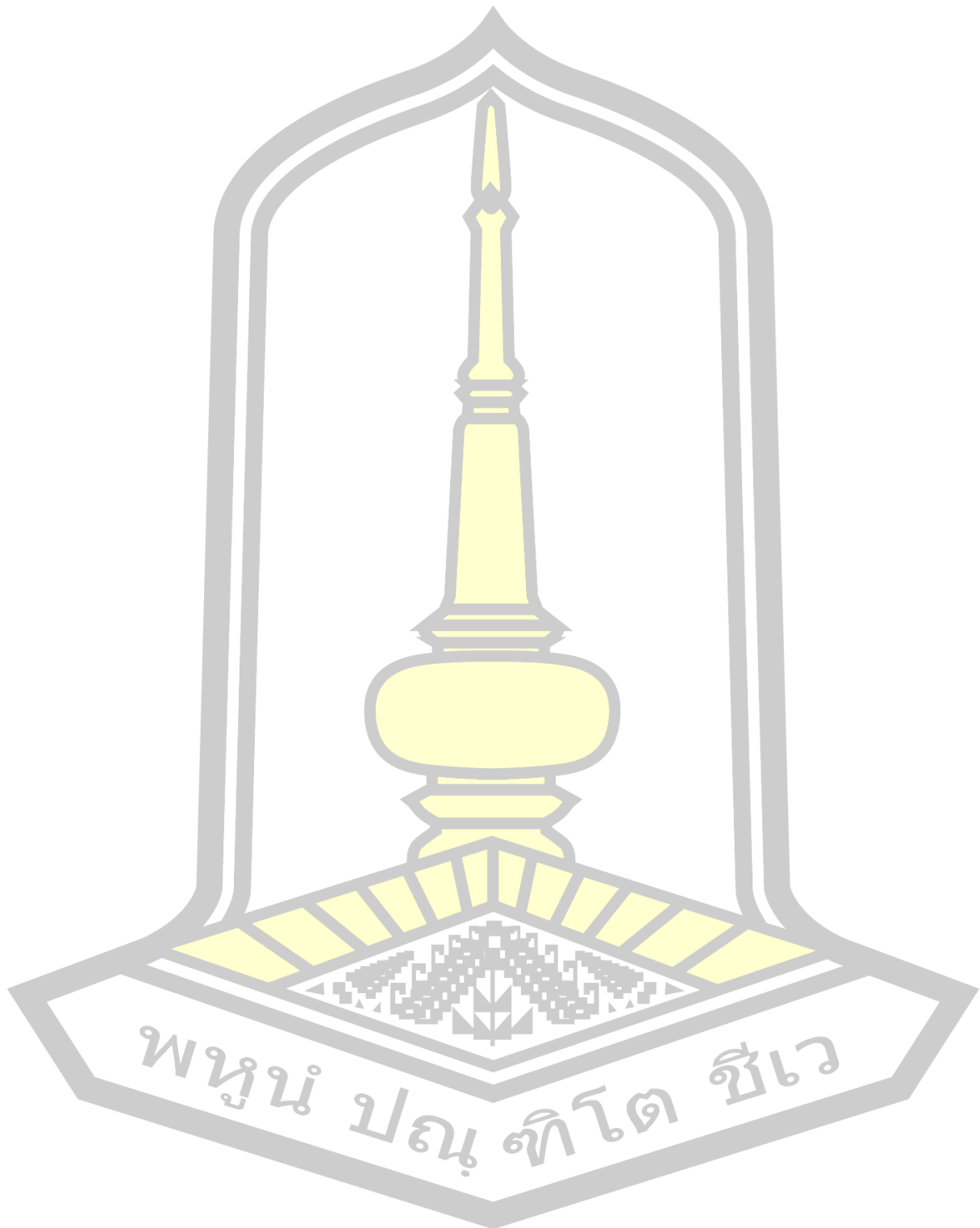
5.3 ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ

สำหรับการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้เป็นช่วงที่ประเทศไทยและทั่วโลกประสบปัญหาด้านโรคระบาด Covid-19 ทำให้กระทบการวางแผนทำงานในห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากมหาวิทยาลัยประกาศปิดการเรียนการสอน ทำให้การทำงานในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและชีวโมเลกุลไม่เป็นไปตามแผนโดยเฉพาะด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องใช้ระยะเวลายาวนานและต้องทำอย่างต่อเนื่อง

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic Structure) ของพะยูน หากมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและจำนวนแหล่งพันธุกรรมในธรรมชาติเพิ่มจะทำให้ได้ข้อมูลที่หลากหลายและแม่นยำมากขึ้น

แนวทางการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมพะยูนนั้นมีความสำคัญเพราะจะเป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืชที่กำลังจะสูญพันธุ์ แต่อาจมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคตไว้ การเก็บรักษาประชากรพืชที่มีคุณลักษณะพิเศษ สำหรับการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์พืชไว้ เช่น มีความต้านทานต่อโรคและแมลง หรือทนความแห้งแล้งได้ดี การเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ใช้เป็นประชากรสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป การเก็บรักษาประชากรพืชที่มีความสำคัญในอนาคตไว้เพราะมีลักษณะที่ค่อนข้างเด่นอยู่ การเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้สำหรับเป็นแหล่งงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ในอนาคต การใช้เป็นแหล่งผลิตเมล็ดก่อนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ตลอดจนเป็นหลักประกันว่าการสูญเสียลักษณะทางพันธุ (genetic loss) จากการปรับปรุงพันธุ์แบบคัดเลือก (selective breeding) จะไม่เกิดขึ้นเพราะได้ทำการรักษาพันธุ์เดิมไว้แล้ว ทั้งนี้การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมพันธุ์ไม้พะยูน นิยมดำเนินการสองรูปแบบคือการเก็บรักษาในสภาพป่าหรือ ในถิ่น (*In situ* conservation) และการเก็บรักษาในรูปแบบรวบรวมพันธุ์นอกถิ่น (*Ex situ* conservation)

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. (2561). รายงานสรุปสถิติคดีเกี่ยวกับการป่าไม้.

Retrieved from <http://portal.dnp.go.th/Content?contentId=2134>

ครรชิต ธรรมศิริ. (2550). กล้วยไม้ไทย: การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน.

กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).

คำณูณ กาญจนภูมิ. (2544). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: บริษัทด้านสุขภาพการพิมพ์ จำกัด

กรุงเทพมหานคร.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. (2529). เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์: ม.ป.ท..

จำนรรจ์ เพียรอนุรักษ์, ประสิทธิ์ เพียรอนุรักษ์ และ สาโรจน์ วัฒนสุขสกุล. (2558). ผลของอัตราส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินและออกซินในอาหารต่อการพัฒนาขึ้นพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพะยูน. เอกสารเผยแพร่ผลงานวิจัย สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 8 หน้า.

จิตราพรรณ พิสิท. (2536). การเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 82 น.: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปทุม บุญจะฤดี, จำนงค์ กาญจนบุรากร, พิศาส วสุวานิช. (2542). อิทธิพลของการปฏิบัติต่อเมล็ดก่อนเพาะเพื่อเร่งการงอกของเมล็ดไม้ป่า 10 ชนิด. รายงานงานวิจัย(ประจำปี 2542), 21.

พวงพรรณ ยงรัตนา, สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ, ปทุม บุญจะฤดี, เบญจรัตน์ พรหมเพ็ญ และ ประพันธ์ ผู้กฤตยาคามิ. (2557). ชีววิทยาดอกและซีพลักซ์ไม์พะยูน. เอกสารนำเสนอในการจัดแสดงนิทรรศการการประชุมวิชาการป่าไม้ปี 2557, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. (2536). วิธีการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อย. เอกสารประกอบการบรรยาย การปรับปรุงพันธุ์อ้อย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร, 58.

ภูมรินทร์ คงมณี. (2544). การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ. (ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.,

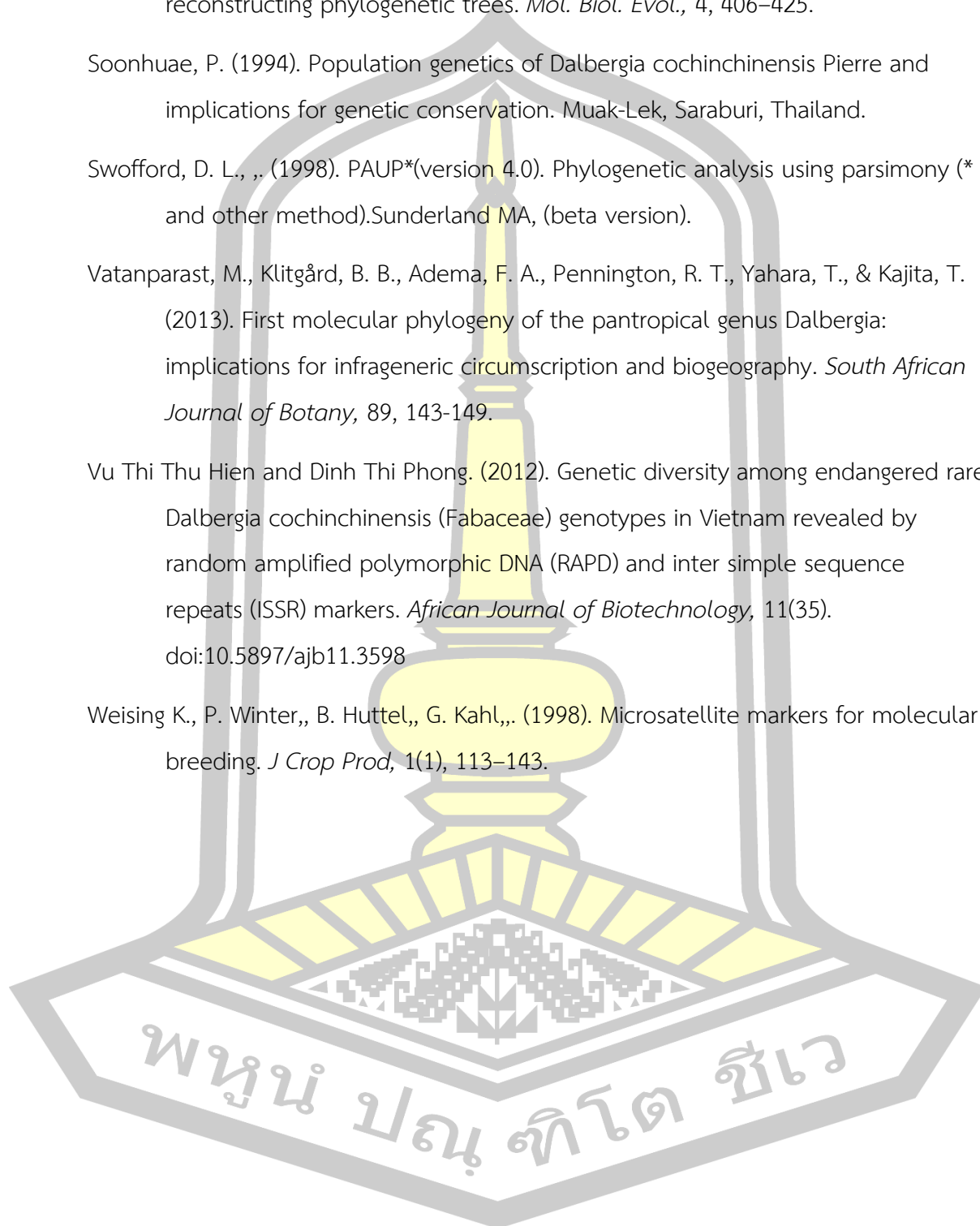
ราตรี อยู่ยืน. (2556). การประเมินความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จีโนม: วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- วรรณสิริ วรรณรัตน์. (2561). โครงการการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาต้นพะยุงปลอดเชื้อในสภาพเยือกแข็งเพื่อการเก็บรักษาสายพันธุ์พะยุงในระยะยาว. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย. ห้องสมุดงานวิจัยสำหรับสาธารณะ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- วิชาญ เอียดทอง และ สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ. (2557). ลักษณะนิเวศแหล่งกระจายพันธุ์และสถานภาพทางประชากรของต้นพะยุงในประเทศไทย. 1-15.
- สุจิตรา จางตระกูล, กิตติยา สิงห์ทอง และ ชุลินา ลากส่งผล. (2552). พะยุง *The progress in developing DNA markers (microsatellite) in Dalbergia*. รายงานการประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์แก้วิกฤตพลังงานชาติ” คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี.
- สุพัตรา สระธรรม, ลักษณะ เพ็ชรประดับ และ สมยศ มีสุข. (2549). การศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เอื้องแซะหอมภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำ [ไม่ลัด]. มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่เฉลิมพระเกียรติ.
- สุวรรณ ตั้งมิตรเจริญ. (2556). พะยุง: แนวทางการอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรพันธุกรรม. การประชุมการป่าไม้ประจำปี พ.ศ. 2556 “ผลผลิตและงานวิจัยป่าไม้ สู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน”, กรมป่าไม้.
- หัวหน้าคณะรักษาความสงบแห่งชาติ. (2557). ประกาศคณะรักษาความสงบแห่งชาติ ฉบับที่ ๑๐๖/๒๕๕๗ เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมกฎหมายว่าด้วยป่าไม้.
- AFoCO (Producer). (2015). Projects 2011-2012. (online). Retrieved from http://www.afocosec.org/html/contents.jsp?id=active_03
- Alfred E. Szmidt. (1987). Genetic Composition of Seed Orchard Crops. *Forest Ecology and Management*, 19 (1987), 227-232.
- Ali, A., Rizwan, M., Majid, A., Saleem, A., & Naveed, N. H. (2012). Effect of media type and explants source on micropropagation of *Dalbergia sissoo*: A tree of medicinal importance. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(9), 1742-1751.
- An, C. H., Kim, Y. W., Moon, H. K., & Yi, J. S. (2016). Effects of in vitro culture types on regeneration and acclimatization of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) from somatic embryos. *Journal of Plant Biotechnology*, 43(1), 110-118.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.

- Chu, I. (1995). Economic analysis of automated micropropagation. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, 19-27.
- CITES. (2018). *Appendices I, II and III (valid from 4 October 2017)*. . Paper presented at the Covention on International Trade in ENdangered Species of Wild Fauna and Flora (October).
- Etienne, E., Teisson, C., Alvard, D., Lartaud, M., Berthouly, M., Georget, F., . . . Lorenzo, J. (1999). *Temporary immersion for plant tissue culture*. Paper presented at the Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century: Proceedings of the IX th International Congress of the International Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology Jerusalem, Israel, 14–19 June 1998.
- Excoffier, L. H. E. L., . (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. . *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Hedrick PW. (2011). *Population genetics of malaria resistance in humans. Heredity (Edinb)*. . 2011 Oct;107(4):283-304. doi: 10.1038/hdy.2011.16. (2011 Mar 23 ed., Vol. 107(4)).
- Jo, U., Murthy, H., Hahn, E., & Paek, K. (2008). Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44, 26-32.
- Kim, S. J., Dewir, Y. H., & Moon, H. K. (2011). Large-scale plantlets conversion from cotyledonary somatic embryos of *Kalopanax septemlobus* tree using bioreactor cultures. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20, 241-248.
- Kulus, D. (2018). Genetic resources and selected conservation methods of tomato. *J. Appl. Bot. Food Qual*, 91, 135-144.
- Librado, P. J. R., . (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. . *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.

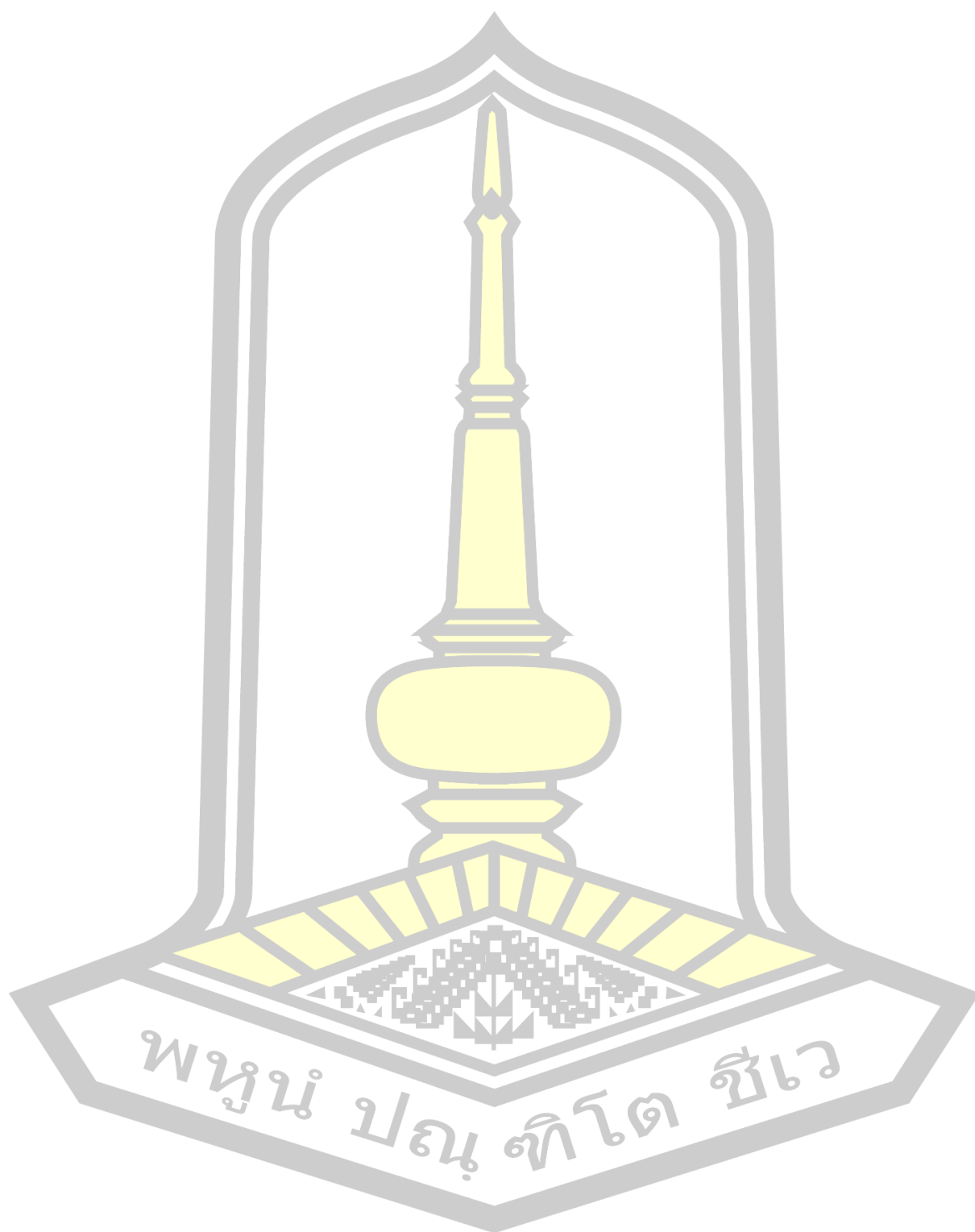
- Máximo, W. P. F., Santos, P. A. A., Martins, G. S., Mendonça, E. G., & Paiva, L. V. (2018). In vitro multiplication of Eucalyptus hybrid via temporary immersion bioreactor: culture media and cytokinin effects. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18, 131-138.
- Murashige, T. (1977). *Plant cell and organ cultures as horticultural practices*. Paper presented at the Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes 78.
- Niyomdham, C. (2002). An account of Dalbergia (Leguminosae-Papilionoideae) in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, 0(30), 124-166. Retrieved from <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/ThaiForestBulletin/article/view/24860>
- Pinyopusarerk, K., . (1990). *Acacia auriculiformis: An Annotated Bibliography*. . Winrock International-F/FRED and ACIAR, Bangkok, Thailand.
- Quiala, E., Cañal, M.-J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., . . . Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109, 223-234.
- Redenbaugh, K. (1993). *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*: CRC Press Inc.
- Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M., & Paasch, B. (1984). *Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production*. Paper presented at the IN VITRO-JOURNAL OF THE TISSUE CULTURE ASSOCIATION.
- Ribeiro, R. A. a. L., M. B. ,,. (2007). Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus Dalbergia. *Genetics and Molecular Research* (6(1)), 173-187.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Hohna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard & J. P. Huelsenbeck,,. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539-542.

- Saitou, N., Nei, M., . (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406–425.
- Soonhuae, P. (1994). Population genetics of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre and implications for genetic conservation. Muak-Lek, Saraburi, Thailand.
- Swofford, D. L., . (1998). PAUP*(version 4.0). Phylogenetic analysis using parsimony (* and other method).Sunderland MA, (beta version).
- Vatanparast, M., Klitgård, B. B., Adema, F. A., Pennington, R. T., Yahara, T., & Kajita, T. (2013). First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: implications for infrageneric circumscription and biogeography. *South African Journal of Botany*, 89, 143-149.
- Vu Thi Thu Hien and Dinh Thi Phong. (2012). Genetic diversity among endangered rare *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae) genotypes in Vietnam revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(35). doi:10.5897/ajb11.3598
- Weising K., P. Winter,, B. Huttel,, G. Kahl,,. (1998). Microsatellite markers for molecular breeding. *J Crop Prod*, 1(1), 113–143.



บรรณานุกรม





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางเบญจรัตน์ พรหมเพ็ญ
วันเกิด	3 ตุลาคม 2519
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	161 หมู่ 20 หมู่บ้านอัครฉัตรธานี ตำบลขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นักวิชาการป่าไม้ชำนาญการพิเศษ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 61 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร 10900
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2542 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2553 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้ ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2566 ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) หลักสูตรความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวลัยรุกเขช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูน ปณ ภิโต ชีเว