นิพนธ์ต้นฉบับ

การชักนำยอดและรากของต้นนนทรีในสภาพปลอดเชื้อ

Shoot and Root Induction of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Back. ex Heyne in *In Vitro* Culture

ไพลิน สุระโคตร
พฤทธิ์ ราชรักษ์*

Pailin Surakhotand
Phruet Racharak*

คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Faculty of Forestry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
*Corresponding Author, E-mail: fforprr@ku.ac.th

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2563 **รับแก้ไข** 9 มิถุนายน 2563 **รับลงพิมพ์** 16 มิถุนายน 2563

ABSTRACT

Peltophorum pterocarpum (DC.) Back. ex Heyne is a valuable tree, which has been planted for a long time due to the multi-purpose nature of its use. In *in vitro* culture, the use of axillary buds derived from a high-quality seed stand, was the most efficient way to select a good tree. The surface disinfectant Clorox at a concentration of 20%, applied for 20 min, resulted in the best sterilization percentage, even though it caused surface wilting on the explant. Nevertheless, it was able to recover after a culture of 14-28 days. A shoot induction formula comprising of an MS medium combined with two types of cytokinins, Kn and BAP, gave excellent results compared to a combination of with cytokinins (Kn or BAP) and auxin (NAA). Moreover, the MS medium mixed with a single plant growth regulator, cytokinin or auxin, was unsuitable to use for shoot induction formula. The highest shoot proliferation average obtained was 3.2±0.04 shoots per explant under an MS media mixed with 0.1 ppm Kn and 0.5 ppm BAP. Furthermore, these formulas caused unwanted callus, which resulted in a low explants response and death. These symptoms could be found in every shoot induction formula but they were far fewer in number. Similar average shoot lengths were obtained through all the formulas. A root initiation with 2.0 ppm IBA resulted in an average number of root induction of 2.0±0.01 roots per explants, which showed a low response and inappropriate results. However, it showed a robust and vigorous root characteristic, sufficient for acclimatization and growth.

Keywords: *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Back. ex Heyne, Tissue culture, Shoot induction, Propagation, Unwanted callus

บทคัดย่อ

นนทรีเป็นไม้ต้นที่ทรงคุณค่าและมีประโยชน์มากมายหลากหลายด้าน การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อด้วยการใช้ตาข้างจากต้นแม่ไม้ที่มีอายุหลายปีเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยคัดเลือกต้นลักษณะดีได้โดยตรง การเตรียมตัวอย่างปลอดเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้นร้อยละ 20 ระยะเวลาการฟอก 20 นาที ได้ผลร้อยละความปลอดเชื้อสูงที่สุด ถึงแม้ว่าผิวชิ้นตัวอย่างอาจจะแห้งแต่สามารถฟื้นตัวได้ดีภายหลังการเลี้ยง 14-28 วัน การชักนำยอดด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนินสองชนิด (Kn และ BAP) ให้ผลดีกว่าการใช้ร่วมกับสารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) หรือใช้เพียงสารใดสารหนึ่งเพียงชนิดเดียว ผลการชักนำยอด พบว่า สามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 3.2±0.04 ยอดต่อชิ้นตัวอย่าง เมื่อใช้สูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต 0.1 พีพีเอ็ม (ppm) Kn และ 0.5 ppm BAP และพบว่า สูตรอาหารชักนำยอดส่งผลต่อการเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์ซึ่งเป็นสาเหตุให้ชิ้นตัวอย่างตอบสนองต่อสูตรอาหารต่ำและตาย ซึ่งสามารถพบแคลลัสนี้ได้ในทุกสูตรอาหารชักนำยอดแต่พบในปริมาณที่น้อยแตกต่างกัน ส่วนความยาวยอดเฉลี่ยมีความยาวใกล้เคียงกันในทุกสูตรอาหาร การชักนำรากจากยอดที่ได้จากการชักนำ พบว่า ชิ้นตัวอย่างตอบสนองต่อสูตรอาหารค่อนข้างต่ำและพบรากจำนวนน้อย โดยพบจำนวนรากเฉลี่ย 2.0±0.01 รากต่อชิ้นตัวอย่างเมื่อชักนำด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต 2.0 ppm IBA แต่อย่างไรก็ตาม รากที่ชักนำได้มีขนาดค่อนข้างใหญ่และแข็งแรงซึ่งเพียงพอต่อการปรับตัวเพื่อลงปลูก

คำสำคัญ: นนทรี เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำยอด การขยายพันธุ์ แคลลัสไม่พึงประสงค์

คำนำ

นนทรี (*Peltophorum pterocarpum* (DC.) Back. ex Heyne) พืชในวงศ์ Fabaceae วงศ์ย่อย Caesalpinioideae เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงใหญ่ เรือนยอดแผ่กิ่งก้านให้ร่มเงา มีดอกสีเหลืองสวยงาม และทนต่อสภาพอากาศแห้งแล้งได้ดี จึงนิยมปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับตามอาคารบ้านเรือน เป็นชนิดไม้มีค่าที่ใช้เป็นหลักประกันในการกู้ยืมจากสถาบันการเงิน มีอัตราการเติบโตเร็ว รอบตัดฟันสั้น จึงเป็นชนิดไม้ทางเลือกหนึ่งในการปลูกเพื่อใช้เนื้อไม้ (Bank for Agriculture and Agricultural Cooperatives and Kasetsart University, 2019) และยังพบว่าเปลือกและใบมีสรรพคุณทางยาต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Vadlapudi, 2010) ลดความเป็นพิษ กำจัดอนุมูลอิสระ บรรเทาโรคเบาหวาน และบำรุงหัวใจ (Raj *et al*., 2013; Jha *et al*., 2016) และต้นนนทรียังเป็น 1 ใน 350 ชนิด ต้นไม้ทรงปลูกในรัชกาลที่ 9 ตามรายงานข้อมูลต้นไม้ทรงปลูกของกรมป่าไม้ และเป็นต้นไม้ประจำมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์อีกด้วย (Siriwachaphan *et al*., 2011)

จากประโยชน์ของต้นนนทรีข้างต้นทำให้มีการขยายพันธุ์เพาะเลี้ยงต้นนนทรีเพิ่มมากขึ้น ในปัจจุบันนิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดในกรณีที่ต้องการต้นกล้าจำนวนมากและไม่มุ่งเน้นลักษณะพันธุ์ดี เนื่องจากการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดมีโอกาสการกลายพันธุ์สูงและพบว่ามีอัตราการงอกต่ำ (Shafiq and Iqbal, 2007) ส่วนวิธีการตอนกิ่งมีการนำมาใช้บ้างแต่ไม่เป็นที่นิยม การขยายพันธุ์ต้นนนทรีในสภาพปลอดเชื้อหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ไม่อาศัยเพศและได้ต้นกล้าตรงตามลักษณะพันธุ์ดี คือ ต้นเปลาตรง พบโรคแมลงเข้าทำลายน้อย มีรูปทรงของต้นที่ดีไม่กลายพันธุ์ และมีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณแม่ไม้ที่ได้รับการคัดเลือกให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจากต้นแม่ไม้ที่มีลักษณะดีและอายุหลายปีได้โดยตรง โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารควบคุมการเติบโต (plant growth regulator) กลุ่มออกซิน เช่น 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) และ Indole-3-butyric acid (IBA) ร่วมกับกลุ่มไซโทไคนิน เช่น Kinetin และ 6-Benzylaminopurine (BAP) (Husain *et al*., 2008) ในการชักนำยอดจำนวนมาก

และในกระบวนการชักนำรากนิยมใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น Indole-3-butyric acid (IBA) เพียงอย่างเดียว และพบว่าสัดส่วนการนำไปใช้งานจะมีความหลากหลายแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนที่จะนำไปใช้ในการชักนำ (Smith, 2013) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนนทรีมีรายงานการใช้ชิ้นส่วนตัวอย่างจากข้อใบเลี้ยงและส่วนปลายยอดที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (Uddin *et al*., 2005) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากเป็นชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ และอยู่ในสภาพ totipotency (Smith, 2013) แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากเป็นชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเมล็ดจึงมีโอกาสได้รับเมล็ดที่ไม่ใช่ตัวแทนที่ดีหรือเกิดการกลาย พืชในวงศ์ Fabaceae ชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การเพิ่มปริมาณการแตกตาข้างของประดู่แขกที่ใช้ 1.0 พีพีเอ็ม (ppm) BAP ร่วมกับ 0.25 ppm NAA และชักนำรากโดยใช้ 1 ppm IBA (Bakshi *et al*., 2018) และ พะยูง ที่ใช้สารควบคุมการเติบโต 5.0 ppm BAP ในการชักนำยอดจำนวนมาก (Wannarat *et al*., 2015) ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการใช้ตัวอย่างตาข้างจากต้นแม่ไม้นนทรีที่มีขนาดใหญ่ มีอายุหลายปี ลำต้นเปลาตรง ซึ่งเป็นลักษณะพันธุ์ดีที่ได้รับการคัดเลือกและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเนื้อไม้ได้นอกเหนือจากการปลูกเพื่อความสวยงามเป็นตัวอย่างเริ่มต้นในการศึกษา เพื่อเป็นการพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์ต้นนนทรีโดยตรงจากตาข้างต้นแม่ไม้พันธุ์ดีที่ได้รับจากการคัดเลือกและหรือต้นแม่ไม้ที่มีความสำคัญ เช่น ต้นนนทรีทรงปลูกที่มีอายุมาก โดยทำการศึกษาการชักนำยอดและการชักนำรากซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตาข้าง และยังเป็นการเตรียมข้อมูลพื้นฐานเพื่อปรับประยุกต์ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นนนทรีที่จะได้รับในการเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ได้โดยตรงจากในสภาพปลอดเชื้อโดยไม่ต้องลงแปลงปลูก รวมทั้งยังเป็นการช่วยอนุรักษ์ต้นนนทรีซึ่งเป็นต้นไม้ที่มีค่าและมีความสำคัญของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

คัดเลือกต้นแม่ไม้นนทรีที่มีลักษณะต้นเปลาตรง พบแมลงและโรคเข้าทำลายน้อย มีรูปทรงของต้นที่ดี ร่วมกับลักษณะความสำคัญในกรณีที่เป็นต้นทรงปลูกจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ จากนั้นนำชิ้นส่วนตาข้างต้นนนทรีที่ได้จากการคัดเลือกจำนวน 90 ชิ้นตัวอย่าง ทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น นำเอาหูใบออก และขัดบริเวณตาข้างที่มีขนเบาๆ ซับให้แห้งด้วยทิชชู และทำความสะอาดชิ้นส่วนตัวอย่างอีกครั้งด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ซับให้แห้ง

การฟอกฆ่าเชื้อ

นำชิ้นส่วนตัวอย่างตาข้างนนทรีมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการมาตรฐานด้วยคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 15 และ 20 ระยะเวลาการฟอกเท่ากัน 20 นาที จากนั้นย้ายลงอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารเร่งการเติบโต ทำการฟอก 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นตัวอย่าง และย้ายเลี้ยงในห้องปลอดเชื้อภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส บันทึกผลร้อยละความปลอดเชื้อและความมีชีวิตจากสีและการเหี่ยวของชิ้นตัวอย่างเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน

การชักนำยอด

ย้ายชิ้นส่วนตาข้างต้นนนทรีที่ปราศจากเชื้อลงอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน ดังนี้

1. สูตรอาหาร MS ร่วมกับ 0.1 ppm และ 0.5 ppm NAA ตามลำดับ

2. สูตรอาหาร MS ร่วมกับ 0.1 ppm และ 0.5 ppm Kn ตามลำดับ

3. สูตรอาหาร MS ร่วมกับ 0.1 ppm และ 0.5 ppm BAP ตามลำดับ

4. สูตรอาหาร MS และ 0.1 ppm Kn ร่วมกับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm NAA ตามลำดับ

5. สูตรอาหาร MS และ 0.1 ppm Kn ร่วมกับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm BAP ตามลำดับ

6. สูตรอาหาร MS และ 0.1 ppm BAP ร่วมกับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ppm NAA

ทำการเลี้ยง 3 ซ้ำต่อสูตรอาหาร ซ้ำละ 10 ชิ้นตัวอย่าง บันทึกผลจำนวนยอด ความยาวยอด และการตอบสนองต่อสูตรอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ภายใต้แสง 3,000 ลักซ์ จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส

การชักนำราก

นำยอดที่ผ่านการชักนำย้ายลงอาหารสูตร ¼MS และ MS ที่ปราศจากสารเร่งการเติบโต และย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารเร่งการเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ppm เลี้ยง 3 ซ้ำต่อสูตรอาหาร ซ้ำละ 10 ชิ้นตัวอย่าง บันทึกผลจำนวนราก ความยาวราก การตอบสนองต่อสูตรอาหาร ย้ายเลี้ยงภายใต้แสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการฟอกฆ่าเชื้อ การชักนำยอดและการชักนำราก โดย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ $p<0.05$ และหาค่า standard errors (mean±SE) และหาร้อยละความปลอดเชื้อและร้อยละการตอบสนองของชิ้นตัวอย่าง ดังนี้

1. ร้อยละความปลอดเชื้อ = (จำนวนชิ้นตัวอย่างที่ปลอดเชื้อ/จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด) x 100

2. ร้อยละการตอบสนองของชิ้นตัวอย่าง = (จำนวนชิ้นตัวอย่างที่พบการเติบโต/จำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมด) x 100

ผลและวิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นตัวอย่างตาข้าง

ชิ้นส่วนตัวอย่างตาข้างนนทรีจะมีหูใบและขนปกคลุมซึ่งพบได้มากน้อยแตกต่างกันไปตามสภาพพื้นที่และพันธุกรรม โดยพบว่าขนที่ปกคลุมตาข้างและบริเวณกิ่งเป็นแหล่งที่มีการสะสมเชื้อโรคอันเป็นสาเหตุของการติดเชื้อสูง จากการทดลองเบื้องต้นโดยไม่กำจัดขนปกคลุมตาข้างออก พบว่า มีร้อยละความปลอดเชื้อต่ำ จากการปรับเปลี่ยนวิธีการขจัดขนปกคลุมตาข้างออกและฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้นคลอรอกซ์ที่แตกต่างกัน พบว่ามีร้อยละของความปลอดเชื้อเพิ่มขึ้น โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของคลอรอกซ์เพิ่มสูงขึ้นจะช่วยเพิ่มร้อยละของความปลอดเชื้อที่สูงเพิ่มมากขึ้นด้วย (Table 1) โดยพบว่า ร้อยละของความปลอดเชื้อของชิ้นส่วนตัวอย่างเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน ที่ความเข้มข้นคลอรอกซ์ร้อยละ 20 ระยะเวลาการฟอก 20 นาที มีร้อยละของความปลอดเชื้อสูงใกล้เคียงกัน และมีร้อยละของความปลอดเชื้อลดลงเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงครบเป็นระยะเวลา 7 วัน พบร้อยละของความปลอดเชื้อลดลงจาก 85 เป็นร้อยละ 82 ซึ่งลดลงค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการฟอกฆ่าเชื้อที่คลอรอกซ์ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 15 ตามลำดับ (Table 1 และ Figure 1) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าความเข้มข้นของคลอรอกซ์ที่สูงขึ้นส่งผลต่อชิ้นตัวอย่าง โดยพบว่าชิ้นตัวอย่างจะมีสีที่เขียวเข้มเพิ่มมากขึ้นจนถึงสีน้ำตาลเข้ม และพบว่าผิวชิ้นตัวอย่างบางส่วนมีลักษณะแห้งและค่อนข้างเหี่ยวโดยเฉพาะชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเล็กและค่อนข้างอ่อน และสามารถพบได้ในทุกความเข้มข้นของคลอรอกซ์ที่ทำการทดลองและจะพบเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจาก 3 วัน เป็น 7 วัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ถึงความมีชีวิตของชิ้นตัวอย่าง ซึ่งชิ้นตัวอย่างที่มีสีเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือเกิดอาการเหี่ยวจะแสดงถึงความมีชีวิตลดลงและส่งผลต่อการตอบสนองต่อสูตรอาหารชักนำยอด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ชิ้นตัวอย่างที่แห้งและเหี่ยวบางส่วนสามารถกลับมามีชีวิตอีกครั้งเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14-28 วัน และสามารถสังเกตพบการเติบโตทางปลายยอด (Figure 1C) โดยชิ้นส่วนตาข้างขนาดใหญ่จะฟื้นตัวได้รวดเร็วและ

มากกว่าชิ้นส่วนตาข้างขนาดเล็ก แต่อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนตาข้างขนาดใหญ่จะมีการสะสมเชื้อราและแบคทีเรียที่นำไปสู่การตายของชิ้นตัวอย่างได้มากกว่า (Bonga and Durzan, 1982)

Table 1 Surface sterilization percentage of *P. pterocarpum* axillary bud under different conditions.

Number of days after culture (days)	Sterilization percentage (%)			Explant color
	10% Clorox 20 min*	15% Clorox 20 min*	20% Clorox 20 min*	
3 days	40±0.04 [b]	65±0.02 [d]	85±0.01 [e]	Light green
5 days	35±0.17 [b]	50±0.15 [c]	83±0.01 [e]	Light to dark green
7 days	22±0.01 [a]	32±0.22 [b]	82±0.02 [e]	Dark green to brown

Remark: *Values are represented as mean±SE and values followed by the same letter(s) in each column are not significantly different (p≥0.05).

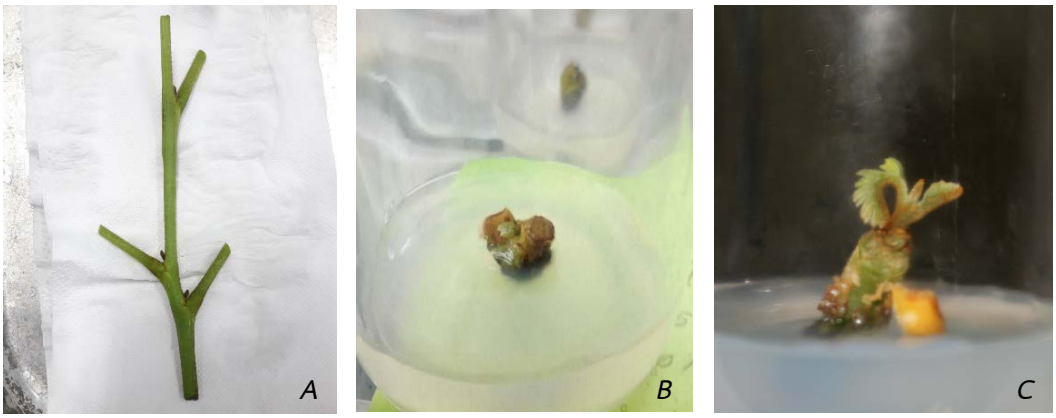

Figure 1 Surface disinfection of *P. pterocarpum* axillary bud (A) and samples sterilized with 20% Clorox, 20 min after a culture of 7 days (B and C).

การชักนำยอด

การชักนำยอดจากชิ้นตัวอย่างตาข้างปลอดเชื้อด้วยสารควบคุมการเติบโตทั้งสองกลุ่ม คือ ไซโทไคนินและออกซิน พบว่า ชิ้นตัวอย่างตาข้างมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารได้ดีทุกสูตรอาหาร โดยพบชิ้นตัวอย่างมีการเติบโตเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งแสดงถึงผลของการตอบสนองของชิ้นตัวอย่างต่อสูตรอาหารโดยพบร้อยละการตอบสนองอยู่ระหว่างร้อยละ 79-92 ชิ้นตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ปลอดเชื้อและฟื้นตัวจากสารฟอกฆ่าเชื้อจะมีการเติบโตเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในตำแหน่งตาข้างและจะพบการตอบสนองได้ดีในชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่มากกว่าชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก ทั้งนี้เนื่องมาจากชิ้นตัวอย่างขนาดใหญ่จะมีปริมาณอาหารและฮอร์โมนสะสมอยู่มากกว่าชิ้นตัวอย่างขนาดเล็กจึงทำให้มีการตอบสนองต่อสูตรอาหารได้ดี (Bakshi *et al*., 2018) ปริมาณยอดที่ได้จากการชักนำ พบว่า ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำได้ในระดับค่อนข้างต่ำ ซึ่งพบจำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1-3 ยอดต่อชิ้นตัวอย่างตาข้าง (Table 2) ซึ่งเป็นจำนวนยอดที่พบได้ส่วนใหญ่ใกล้เคียงกันในทุกสูตรอาหาร ซึ่งจำนวนยอดดังกล่าวให้ผลใกล้เคียงกับการชักนำยอดจากตาข้างในไม้ต้นชนิดอื่นโดยเฉพาะในกลุ่มไม้ป่าโตช้ารอบตัดฟันยาว เช่น พะยูง (Wannarat *et al*., 2015) หรือกลุ่มไม้ในวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) (Sahu *et al*., 2014) ซึ่งมักจะพบว่าสามารถชักนำยอดได้น้อย และจะ

แตกต่างอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไม้ป่าโตเร็ว เช่น ยูคาลิปตัส ที่สามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้ถึง 7-9 ยอดต่อชิ้นตัวอย่าง (Chotpiwat and Siripatanadilok, 2014) และพบว่า ชิ้นตัวอย่างตาข้างมักจะชักนำยอดได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับการชักนำยอดจากข้อใบเลี้ยงตาข้าง หรือตายอดที่ได้จากต้นอ่อนจากการเพาะเมล็ด แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การใช้ตาข้างในการชักนำยอดสามารถขจัดปัญหาการกลายจากการใช้เมล็ดได้ (Smith, 2013)

กลุ่มของสารควบคุมการเติบโตมีผลต่อการชักนำยอดจากตาข้างของนนทรีค่อนข้างมาก จากการทดลองพบว่า การใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนินร่วมกันสองชนิด คือ Kn และ BAP สามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้ระหว่าง 1.8-3.2 ยอดต่อชิ้นตัวอย่าง ซึ่งมากกว่าการใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน (Kn หรือ BAP) ร่วมกับสารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) ซึ่งสามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้ระหว่าง 1.5-1.8 ยอดต่อชิ้นตัวอย่าง (Table 2) นั่นแสดงถึงการใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนินร่วมกันจำนวนสองชนิดมีประสิทธิภาพในการชักนำยอดได้ดีกว่าการใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนินร่วมกับกลุ่มออกซิน ผลการชักนำยอดเฉลี่ยสูงสุดพบจำนวน 3.2 ยอดต่อชิ้นตัวอย่าง เมื่อชักนำด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับ 0.1 ppm Kn และ 0.5 ppm BAP (Figure 2) ส่วนความยาวยอดเฉลี่ยพบว่า ทุกสูตรอาหารมีผลความยาวยอดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (Table 2) ส่วนการใช้สารควบคุมการเติบโตกลุ่มไซโทไคนินหรือกลุ่มออกซินเพียงอย่างเดียวในการชักนำยอด พบว่า ให้จำนวนยอดเฉลี่ยค่อนข้างต่ำ โดยยอดที่เติบโตส่วนใหญ่จะเติบโตเพียงยอดเดียวและยืดยาวอย่างรวดเร็ว

Table 2 Average number of shoot proliferations, average shoot length, and response percentage of *P. pterocarpum* axillary bud in shoot induction medium after culture of 6 weeks.

Plan growth regulators (ppm)			Average number of shoot proliferations*	Average shoot length (cm)*	Response (%)
NAA	Kn	BAP			
0.1			1.2±0.04 [a]	1.4±0.11	81
0.5			1.4±0.06 [b]	1.8±0.13	80
	0.1		1.4±0.11 [b]	1.6±0.13	89
	0.5		1.4±0.05 [b]	1.6±0.16	82
		0.1	1.5±0.18 [b]	1.4±0.08	83
		0.5	1.5±0.02 [b]	1.5±0.05	84
0.1	0.1		1.5±0.23 [b]	1.6±0.03	86
0.3	0.1		1.8±0.51 [c]	1.6±0.17	81
0.5	0.1		1.8±0.21 [c]	1.8±0.05	82
0.7	0.1		1.8±0.04 [c]	1.8±0.02	79
	0.1	0.1	1.8±0.08 [c]	1.5±0.11	90
	0.1	0.3	2.0±0.02 [d]	2.7±0.03	89
	0.1	0.5	3.2±0.04 [e]	2.0±0.06	80
	0.1	0.7	2.2±0.12 [d]	1.8±0.09	92
0.1		0.1	1.6±0.12 [bc]	1.7±0.01	84
0.3		0.1	1.8±0.11 [c]	1.3±0.22	92
0.5		0.1	1.5±0.22 [b]	1.4±0.21	88
0.7		0.1	1.8±0.15 [c]	1.3±0.10	87

Remark: *Values are represented as mean±SE and values followed by the same letter(s) in each column are not significantly different ($p \geq 0.05$).

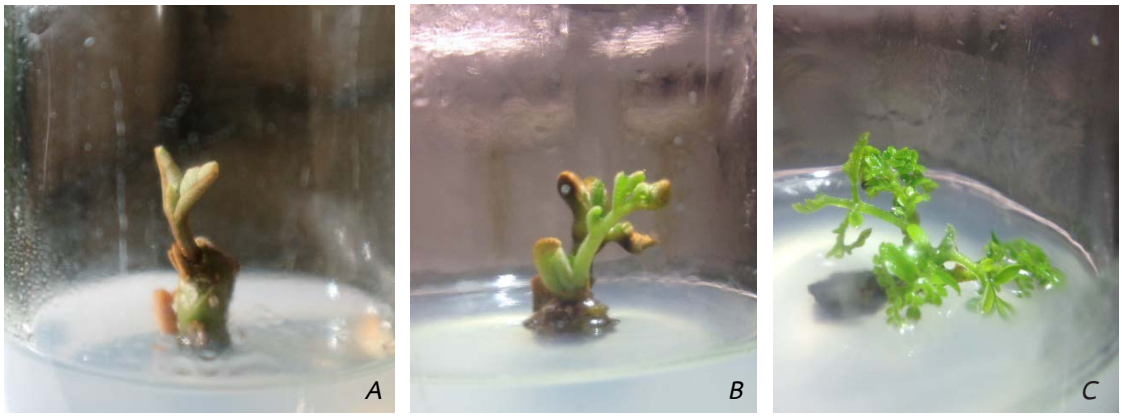

Figure 2 Shoot proliferation of *P. pterocarpum* axillary bud under a shoot induction formula after a culture of 6 weeks comprising of (A) MS + 0.1 ppm Kn + 0.1 ppm BAP, (B) MS + 0.1 ppm Kn + 0.3 ppm BAP, and (C) MS + 0.1 ppm Kn + 0.5 ppm BAP.

การเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์ (unwanted callus)

ผลจากการชักนำยอดจากตาข้างนนทรี พบว่าชิ้นตัวอย่างบางส่วนเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์โดยสามารถพบได้ในทุกสูตรอาหารชักนำยอด โดยชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่มักจะเกิดแคลลัสที่ไม่พึงประสงค์มากกว่าชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถจำแนกตามลักษณะการเกิดได้ 2 รูปแบบ คือ แคลลัสที่พัฒนามาจากขนขนาดเล็กที่เจริญอยู่ที่ผิวของกิ่งและจะพัฒนาจนยืดยาวออกมาและเมื่อปล่อยทิ้งไว้จะทำให้ชิ้นตัวอย่างโทรมและตายในที่สุด (Figure 3A) และแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนที่เกิดบาดแผลซึ่งส่วนใหญ่จะพบแคลลัสเติบโตจนมีขนาดใหญ่ที่โคนของชิ้นตัวอย่างที่เกิดบาดแผลจากกระบวนการตัดแต่งชิ้นส่วนตัวอย่างก่อนการย้ายลงสู่อาหารชักนำยอด โดยแคลลัสในรูปแบบนี้สามารถพบได้ทั้งในชิ้นตัวอย่างตาข้างที่มีขนาดใหญ่และมีขนาดเล็ก (Figure 3B and 3C) ซึ่งเกิดจากกระบวนการซ่อมแซมตัวเองในกรณีเกิดบาดแผลของชิ้นตัวอย่าง (Stobbe *et al*., 2002) ซึ่งสาเหตุหลักของการเกิดแคลลัสดังกล่าวเกิดจากปริมาณฮอร์โมนที่สะสมอยู่ในแต่ละชิ้นตัวอย่างไม่เท่ากันประกอบกับสารควบคุมการเติบโตที่เป็นส่วนผสมในอาหารชักนำยอดจึงทำให้ชิ้นตัวอย่างเกิดการสร้างแคลลัสดังกล่าว ผลของการเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์จะทำให้ชิ้นตัวอย่างใช้พลังงานในระดับเซลล์สูง (Ikeuchi *et al*., 2013) ดังนั้น การเกิดแคลลัสจากทั้งสองกรณีจะส่งผลต่อการตอบสนองต่อสูตรอาหารชักนำยอดและส่งผลต่อการเติบโตของชิ้นตัวอย่าง ซึ่งพบว่าจะเติบโตได้ช้ากว่าชิ้นตัวอย่างที่ไม่เกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์ แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์ดังกล่าวพบได้ในสัดส่วนที่น้อย และถึงแม้ว่าจะพบแนวโน้มการเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์ในชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่มากกว่าชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก แต่การเติบโตและการตอบสนองต่อสูตรอาหารได้ดีของชิ้นตัวอย่างขนาดใหญ่ที่พบว่าเกิดการเติบโตของตาข้างจากการชักนำร่วมกับการเกิดแคลลัสไม่พึงประสงค์ จะสามารถเติบโตต่อไปได้ถ้ามีการตัดแต่งย้ายชิ้นตัวอย่างไปสู่อาหารใหม่ ซึ่งจะช่วยให้การเติบโตยังคงสามารถเติบโตต่อไปได้

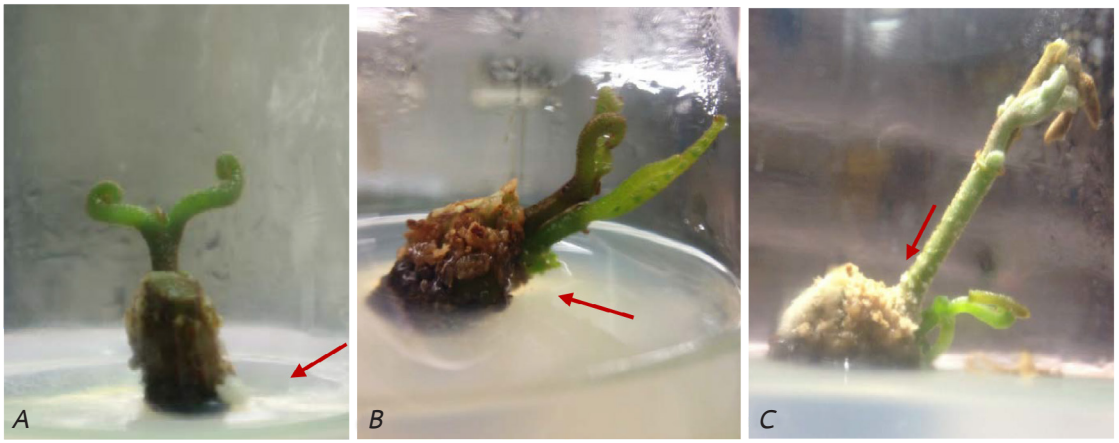

Figure 3 Unwanted callus occurring in the shoot induction formula after a culture of 6 weeks; (A) callus formed from hair covering and (B and C) callus induced at the wound site, indicated by a red arrow.

การชักนำราก

การชักนำรากจากต้นตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการชักนำยอดด้วยสารควบคุมการเติบโตกลุ่มออกซิน คือ IBA พบว่า การเจริญของรากส่วนใหญ่จะออกรากเพียง 1-2 รากต่อชิ้นตัวอย่างและพบการออกรากจำนวนน้อย โดยสูตรอาหารชักนำรากที่ไม่เติมสารควบคุมการเติบโต (¼MS และ MS) และสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเติบโต IBA ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 ซึ่งเป็นความเข้มข้นในระดับต่อการชักนำยอดไม้ป่า พบว่าไม่สามารถชักนำรากได้ การชักนำรากไม้ป่าด้วย 2.0 ppm IBA ให้ผลการชักนำรากเฉลี่ยดีที่สุดจำนวน 2.0±0.01 รากต่อชิ้นตัวอย่าง (Table 3 และ Figure 4) ซึ่งต่างจากการกระตุ้นรากที่ได้จากชิ้นตัวอย่างข้อใบเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งพบว่าสามารถชักนำรากได้ถึง 11 และ 12 รากต่อชิ้นตัวอย่างเมื่อชักนำด้วยสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 1.0 และ 2.0 ppm IBA ตามลำดับ (Uddin *et al.*, 2005) ความยาวรากเฉลี่ยเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีความยาวรากไม่แตกต่างกัน และพบความยาวรากเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.5±0.01 - 0.8±0.01 เซนติเมตร แต่ถึงอย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร้อยละการตอบสนองต่อการออกราก พบว่าอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งบ่งบอกถึงความไม่เหมาะสมของสูตรอาหารต่อการชักนำราก ดังนั้น จึงควรพัฒนาปรับเปลี่ยนสูตรอาหารให้มีความเหมาะต่อการชักนำรากต่อไป

Table 3 Root induction under the MS medium combined with different concentrations of IBA after a culture of 4 weeks.

Plant growth regulator, IBA (ppm)	Average number of root inductions*	Average root length (cm)*	Response (%)
¼ MS only	0	0	0
MS only	0	0	0
0.5	0	0	0
1.0	0	0	0
1.5	1.0±0.01[a]	0.5±0.01	20
2.0	2.0±0.01[a]	0.5±0.02	50
2.5	1.0±0.02[a]	0.8±0.01	45

Remark: *Values are represented as mean±SE and values followed by the same letter(s) in each column are not significantly different ($p \geq 0.05$).

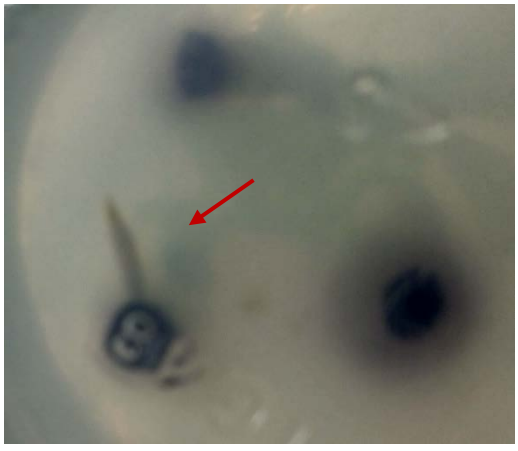

Figure 4 Effect of plant growth regulator, 2.0 ppm IBA, on the root induction of *P. pterocarpum*, after a culture of 4 weeks, indicated by a red arrow.

สรุป

การชักนำยอดและรากของต้นนนทรีในสภาพปลอดเชื้อด้วยชิ้นส่วนตาข้างสามารถเตรียมตัวอย่างปลอดเชื้อด้วยการฟอก ทำความสะอาดด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้นร้อยละ 20 ระยะเวลาการฟอก 20 นาที ให้ร้อยละของความปลอดเชื้อ 82 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน การชักนำยอดตัวอย่างปลอดเชื้อด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต 0.1 ppm Kn และ 0.5 ppm BAP ให้ผลการชักนำยอดดีที่สุด 3.2±0.04 ยอดต่อชิ้นตัวอย่าง และมีความยาวยอดเฉลี่ย 2.0±0.06 เซนติเมตร การชักนำรากด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเติบโต 2.0 ppm IBA พบจำนวนรากเฉลี่ย 2.0±0.01 รากต่อชิ้นตัวอย่าง ซึ่งรากที่ชักนำได้มีความแข็งแรงเพียงพอต่อการปรับตัว (plantlet acclimatization) เพื่อนำปลูกต่อไป

คำนิยม

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ และสนับสนุนทุนในการวิจัย

REFERENCES

Bakshi, M., A. Chauhan and A. Vichitra. 2018. Tissue culture (Micropropagation) of *Dalbergia sissoo* Roxb. as affected by genotypic configuration. **Indian Forester** 144(9): 852-856.

Bank for Agriculture and Agricultural Cooperatives and Kasetsart University. 2019. **The Course Document of Valuable Tree Assessor's Training-Workshop**. Kasetsart University Press, Bangkok. (in Thai)

Bonga, J.M. and D.J. Durzan. 1982. **Tissue Culture in Forestry**. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.

Chotpiwat, U. and S. Siripatanadilok. 2014. Effect of agar concentration and media texture on development in *in vitro* culture of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. x *E. urophylla* F. Muell., pp. 137-145. *In* **The Proceedings of the 52nd Kasetsart University Annual Conference**. **Agricultural Sciences: Leading Thailand to World Class Standards.** 4-7 February 2014. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Husain, M.K., M. Anis and A. Shahzad. 2008. *In vitro* propagation of a multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants. **Acta Physiologiae Plantarum** 30(3): 353-359.

Ikeuchi, M., K. Sugimoto and A. Iwase. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell** 25(9): 3159-3173.

Jha, R., P.T. Ramani, D. Patel, S. Desai and D. Meshram. 2016. Phytochemical analysis and *in vitro* urolithiatic activity of *Peltophorum pterocarpum* leaves (DC) Baker. **Journal of Medicinal Plants Studies** 4(3): 18-22.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-479.

Raj, M.K., C. Balachandran, V. Duraipandiyan, P. Agastian, S. Ignacimuthu and A. Vijayakumar. 2013. Isolation of terrestribisamide from *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex. K. Heyne and its antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Medicinal Chemistry Research** 22(8): 3823-3830.

Sahu, J., S. Khan, R.K. Sahu and A. Roy. 2014. Micropropagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through tissue culture technique. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 17(4): 597-600.

Shafiq, M. and M.Z. Iqbal. 2007. Germination and seedling behaviours of seeds of *Peltophorum pterocarpum* D.C.Baker Ex K.Heyne growing under motor vehicle emission. **Turkish Journal of Botany** 31(6): 565-570.

Siriwachaphan, Y., M. Phothong and M. Chueaarun. 2011. **Tonmai Thrang Pluk (ต้นไม้ทรงปลูก)**. 2nd ed. Pandigital System, Nonthaburi. (in Thai)

Smith, R.H. 2013. **Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments**. 3rd ed. Academic Press, California.

Stobbe, H., U. Schmitt, D. Eckstein and D. Dujesiefken. 2002. Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* sp.). **Annals of Botany** 89(6): 773-782.

Uddin, M.S., K. Nasirujjaman, S. Zaman and M.A. Reza. 2005. Regeneration of multiple shoots from different explants viz. shoot tip, nodal segment and cotyledonary node of *in vitro* grown seedlings of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne. **Biotechnology** 4(1): 35-38.

Vadlapudi, V. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of methanolic extract of selected Indian medicinal plants. **Pharmacophore** 1(3): 214-219.

Wannarat, W., P. Wongwean, S. Supansomporn, W. Kitprechawanich and Y. Pankaew. 2015. Micro-propagation of *Dalbergia cochinchinensis*, pp. 81-84. *In* **Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology: Global Agriculture Trends for Sustainability**. 1-3 July 2015. A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya.