วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2561 : 36 (2) : 126-134

# การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของสักในสภาพหลอดทดลอง

## Shoots Induction from *In Vitro* Node of Teak

เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,2,3*], เยาวพรรณ สนธิกุล[1,5], ประกาย อ่อนวิมล[1,2] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[1,4]
Sermsiri Chanprame [1,2,3*], Yaowaphan Sontikun[1,5], Prakay Onwimol [1,2] and Sontichai Chanprame[1,4]

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA TDZ และสารเสริม 2 ชนิดคือ silver nitrate และ adenine sulfate ในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อสัก โดยการนำต้นสักที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS อายุ 1 เดือน มาตัดเฉพาะส่วนข้อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA 9 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0-12 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าการใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วง 1.0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นที่ทำให้เกิดยอดมากที่สุดคือ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 7.1 ยอดต่อข้อ แต่จำนวนยอดกลับลดลงเหลือเพียง 4.4 ยอดต่อข้อ เมื่อใช้ BA ความเข้มข้น 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการใช้อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 – 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่ให้ผลดีโดยมีจำนวนยอดน้อยกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว และการเกิดยอดมีความแปรปรวนสูง ยอดส่วนใหญ่มีขนาดเล็กและฉ่ำน้ำ สีเขียวอมเหลือง สำหรับการใช้ silver nitrate เข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้ silver nitrate ยอดที่ได้ไม่แสดงลักษณะฉ่ำน้ำแต่ลักษณะยอดสั้นเป็นกระจุก ส่วนการใช้ adenine sulfate เข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลใกล้เคียงกับการไม่เติม แต่การใช้ที่ความเข้มข้นสูงทำให้ยอดใหม่ที่ได้มีขนาดไม่สม่ำเสมอและยังพบลักษณะฉ่ำน้ำเกิดขึ้นด้วย

**คำสำคัญ** : สัก การเกิดยอด ไซโตไคนิน ซิลเวอร์ไนเตรท อะดินีนซัลเฟต

## Abstract

This research studied the effects of MS solid medium supplemented with BA, TDZ, and two additive substances, silver nitrate and adenine sulfate, on shoot proliferation of *in vitro* teak node explants. The teak node explants were cultured on MS medium supplemented with 0 - 12.0 mg/l BA. The CRD with 5 replications, each of 2 nodes were applied. The explants were incubated for 4 weeks at 55 $\mu M/m^2/s$ 16 h light, 25±2 ºC, with two weeks' interval of subculture. The results demonstrated that higher shoot proliferation observed when BA concentration increased in the range of 1.0-6.0 mg/L but decreased at higher concentration of 12 mg/L BA. The treatment using 0.0-6.0 mg/L BA in concerted with 0.1-0.3 mg/L TDZ revealed inadequate result in which less shoot proliferation was obtained compared with only BA

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี,สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[2]ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3]ภาควิชาพืชสวน, [4]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[5] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี อ.เมือง จ. สุราษฎร์ธานี

supplemented. The high variation in shoot proliferation was also observed along with small, glassy appearance with yellowish green shoots. For the treatment that silver nitrate was added to the MS medium supplemented with 3.0 mg/L BA, the shoot proliferation was similar to that of no silver nitrate added but short and bunchy shoots were observed. The treatment of MS medium containing 3.0 mg/L BA supplemented with adenine sulfate was revealed not necessary because at the low concentration (10-20 mg/L), the shoot proliferation was similar to that of no adenine sulfate added. Furthermore, the adenine sulfate added at the higher concentrations caused the high variation in shoot proliferation with the grassy appearance observed.

**Keywords** : teak, shoot proliferation, cytokinin, silver nitrate, adenine sulfate

## คำนำ

สักเป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเนื้อไม้มีสีและลวดลายที่สวยงามและมีความแข็งแรงทนทานต่อการเข้าทำลายของแมลง จึงเป็นที่นิยมจนกระทั่งทำให้มีการตัดโค่นต้นสักจากป่าธรรมชาติเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อสภาพแวดล้อม แต่ด้วยความต้องการที่มีอยู่สูง ภาครัฐจึงได้อนุญาตให้มีการปลูกสร้างสวนป่าสักเพื่อนำไม้มาใช้ประโยชน์ แต่ปัญหาที่ตามมาจากการปลูกสวนป่าสักคือ การปลูกเป็นพืชเชิงเดี่ยวในพื้นที่กว้างทำให้มีปัญหาเรื่องโรคและแมลงเข้าทำลายต้นสัก ส่งผลให้ต้นสักเจริญเติบโตไม่ดีและเนื้อไม้ไม่ได้คุณภาพ (สมคิด, 2517) การปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างสายพันธุ์สักที่ต้านทานต่อโรคและแมลงสามารถทำได้ แต่การปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานโดยการผสมและคัดเลือกพันธุ์ในพืชที่เป็นไม้ยืนต้นนั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการ เช่น ใช้เวลานานหลายปีกว่าจะออกดอก การผสมติดยากและเมล็ดมีการงอกต่ำ รวมทั้งลักษณะความต้านทานแมลงในธรรมชาติยังเป็นลักษณะที่หาได้ยากในพันธุกรรมจากธรรมชาติ (Gyves and Rugini, 2009) แนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาเหล่านี้คือการนำวิธีการทางพันธุวิศวกรรมหรือการถ่ายยีนมาใช้ เพื่อสร้างสายพันธุ์สักพันธุ์ดีที่ต้านทานต่อแมลงและโรค รวมทั้งมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและให้ผลผลิตเนื้อไม้ที่มีคุณภาพดี ซึ่งในอนาคตจะส่งผลให้เกิดการปลูกป่าสักเชิงเศรษฐกิจได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น

ความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้น ปัจจัยหลักส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการมีระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนได้ และชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการที่เป็นผลมาจากการถ่ายยีนได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้ยืนต้นนั้นโดยทั่วไปทำได้ยากกว่าไม้เนื้ออ่อน และมักมีปัญหาเรื่องความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (regeneration) โดยเฉพาะภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการถ่ายยีน ดังนั้นในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์สักโดยวิธีการถ่ายยีนนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นขั้นตอนแรก สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักนั้นมีการรายงานโดย Gupta *et al.* (1980) ที่ได้เพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BA) และ kinetin แล้วชักนำรากในอาหารเหลวสูตร White (1963) และต่อมา Shirin *et al*. (2005) รายงานการชักนำให้เกิดยอดจากข้อสักในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 0.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Akram and Aftab (2008) รายงานว่าการใช้ thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 1.76 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากข้อได้ผลดี

อย่างไรก็ตาม รายงานที่มีมาก่อนหน้านี้เป็นรายงานในต่างประเทศ สายพันธุ์ และสภาพการเพาะเลี้ยงที่ต่างกันก็อาจส่งผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนข้อสักสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการต่อยอดงานวิจัยด้านการถ่ายยีนในสักต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

**การทดสอบประสิทธิภาพของ BA ในการชักนำให้เกิดยอด**

นำต้นสักที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS อายุ 1 เดือน มาตัดใบและปลายยอดออกให้หมด แล้วตัดแยกเป็นข้อเดี่ยว ๆ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 9 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0, 6.0, และ 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชิ้น ในทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยนับจำนวนยอดและบันทึกลักษณะยอดที่เกิดขึ้น นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

สำหรับการชักนำให้ยอดที่ได้ออกรากนั้น ทำโดยคัดเลือกยอดของต้นสักที่มีความสมบูรณ์และมีลักษณะปกติจากแต่ละความเข้มข้นของ BA ที่ทดลอง ตัดเฉพาะส่วนยอดให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร มีใบประมาณ 4 ใบ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตการออกราก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

**การทดสอบประสิทธิภาพของ BA ร่วมกับ thidiazuronในการชักนำให้เกิดยอด**

นำข้อสักมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA เข้มข้น 0, 2.0, 4.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพเดียวกับการทดลองแรก และวางแผนการทดลองและบันทึกข้อมูลรวมทั้งวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองแรก

**การศึกษาผลของของ silver nitrate และ adenine sulfateต่อการชักนำให้เกิดยอด**

การทดลองนี้ใช้สูตรอาหารพื้นฐานคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาผลของการเติม silver nitrate ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ adenine sulfate เข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาพการเพาะเลี้ยง การวางแผนการทดลองและบันทึกข้อมูลรวมทั้งวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองแรก

**การชักนำให้เกิดราก**

เมื่อบันทึกผลการเกิดยอดเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์แล้ว คัดเลือกยอดของต้นสักที่มีความสมบูรณ์และมีลักษณะปกติมากที่สุดจากแต่ละความเข้มข้นของ BA นำมาตัดเฉพาะส่วนยอดให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร มีใบประมาณ 4 ใบ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**ผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก**

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณยอดให้ได้จำนวนมากโดยการชักนำให้เกิดยอดกลุ่ม (multiple shoots) โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อของสักในสภาพเพาะเลี้ยงเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 -12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเริ่มเกิดยอดใหม่ขนาดเล็กจากตาข้างหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์และยอดพัฒนาจนเห็นได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 2 โดยข้อสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.1 ยอดต่อข้อ ส่วนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเกิดยอดเพียง 2 ยอดต่อหนึ่งข้อเท่านั้น *(*Table 1*)*

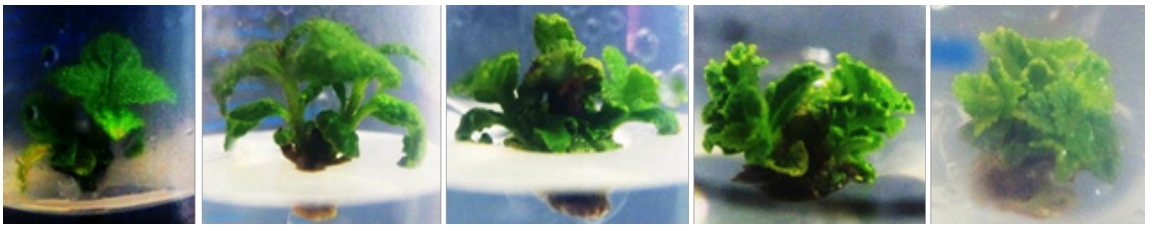
จากการชักนำให้เกิดยอดจากสักด้วย BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินนี้ พบว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียวมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดี โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วง 1.0 - 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น แต่จำนวนยอดที่เกิดขึ้นกลับลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้น 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นนี้อาจเป็นความเข้มข้นในระดับที่สูงเกินไปสำหรับเนื้อเยื่อสัก ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Tiwari *et al.* (2002) ซึ่งเพาะเลี้ยงข้อจากต้นกล้าสักบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ย 5.6 ยอด ซึ่งมากกว่าการเติม BA เข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ย 3.5 ยอดเท่านั้น ทั้งนี้ Bonga *(1982)* อธิบายว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้ดีในพืชหลายชนิด แต่การใช้ในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิดยอดได้

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้นในช่วง 0.5 - 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นยอดที่ได้มีลักษณะเป็นปกติ แต่เมื่อใช้ BA ความเข้มข้นสูงขึ้น ตั้งแต่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะข้อสั้น แต่ละยอดมีความสูงไม่สม่ำเสมอกัน และพบลักษณะใบหงิกงอผิดรูปร่าง นอกจากนี้บางยอดยังมีลักษณะฉ่ำน้ำอีกด้วย โดยเมื่อ BA มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะพบลักษณะดังกล่าวมากขึ้น (Figure 1) ซึ่งลักษณะผิดปกติที่เกิดจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นที่สูงดังกล่าวนี้ มีรายงานว่าพบในพืชชนิดอื่นด้วยเช่นกัน (Vardja and Vardja, 2001)

**Table 1** Number of shoots obtained from node explants of teak after cultured on MS solid medium supplemented with various concentrations of BA for 4 weeks at 55 μM/$m^2$/s 16 h light, 25±2 ºC.

| BA (mg/L) | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 3.0 | 5.0 | 6.0 | 12.0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of shoots | 2.0 ±0.00$^{d}$ | 2.0 ±0.00$^{d}$ | 3.8 ±0.25$^{b}$ | 3.8 ±0.26$^{b}$ | 4.5 ±0.52$^{ab}$ | 5.0 ±0.63$^{a}$ | 5.2 ±0.75$^{a}$ | 7.1 ±0.15$^{a}$ | 4.4 ±0.24$^{b}$ |

[1/] Means followed by the same letter were not significantly different ($p \leq 0.05$) according to DMRT. (%CV=20.97)



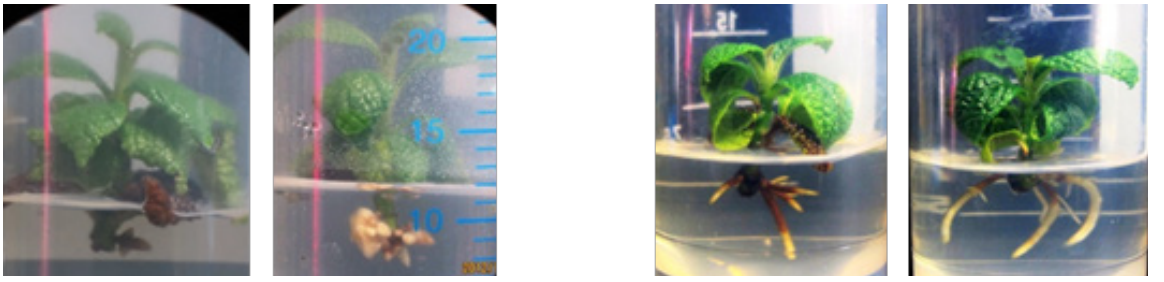
BA (mg/L) 0 1.5 2.0 6.0 12.0

**Figure 1** The morphology of shoots obtained from node explants of teak cultured on MS solid medium supplemented with various concentrations of BA. Malformed shoots were found from explants that cultured on high concentration of BA (6 and 12 mg/L).

จากการทดลองนี้ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงการออกรากของยอดใหม่ที่ได้ โดยการคัดเลือกยอดของต้นสักที่มีความสมบูรณ์และมีลักษณะปกติมากที่สุด จากแต่ละความเข้มข้นของ BA นำมาตัดเฉพาะส่วนยอดให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร มีใบประมาณ 4 ใบ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

8 สัปดาห์ พบว่าทุกยอดสามารถออกรากได้ โดยในช่วง 4 สัปดาห์แรกจะเริ่มมีการสร้างรากขึ้น แต่รากที่เกิดขึ้นจากยอดที่ชักนำได้จาก BA ความเข้มข้นสูงๆ มีลักษณะผิดปกติคือสั้นเป็นปุ่มปม (Figure 2) ซึ่งพบรากลักษณะดังกล่าวได้อย่างชัดเจนจากการชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA ความเข้มข้น 6.0 และ 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการใช้ BA ในช่วงความเข้มข้น 0.5-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นพบว่ายอดมีการสร้างรากได้เป็นปกติเช่นเดียวกับยอดที่เกิดจากทรีทเมนต์ที่ไม่เติม BA โดยพบการเกิดรากตั้งแต่ช่วง 4 สัปดาห์แรก ซึ่งการเกิดรากที่มีลักษณะเป็นปุ่มปมในช่วงแรกที่พบในยอดที่ชักนำได้จากการใช้ BA ความเข้มข้นสูงนี้อาจเนื่องจากผลของ BA ที่ตกค้างภายในเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากในการชักนำให้เกิดยอดนั้นใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA ความเข้มข้นค่อนข้างสูงและเป็นระยะเวลานาน ทำให้ BA มีการสะสมในเนื้อเยื่อพืชมาก อาจส่งผลทำให้สัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินในเนื้อเยื่อพืชมีมากกว่ากลุ่มออกซินจึงเกิดภาวะไม่สมดุล เป็นผลทำให้ยอดที่ถูกชักนำได้จากการใช้ BA ความเข้มข้นสูงบางส่วนไม่สามารถออกรากได้ในช่วง 4 สัปดาห์ หรือเกิดรากที่มีลักษณะผิดปกติเป็นปุ่มปม

อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้นเป็น 8 สัปดาห์ พบว่า สามารถชักนำให้ออกรากได้มากขึ้นและรากมีลักษณะเป็นปกติมากขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saunders and Bingham (1975) ที่พบว่า การใช้ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินต่ำในช่วงของการชักนำให้เกิดยอดมีผลทำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้ดีกว่าการใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูงในการชักนำยอด ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากผลของ BA ที่ตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อพืชลดลงทำให้สัดส่วนของสารไซโตไคนินและสารออกซินในต้นพืชสมดุลกันจึงทำให้การเกิดรากกลับเข้าสู่สภาวะปกติ รากจึงยืดยาวออกได้




BA 6.0 mg/L 12.0 mg/L BA 6.0 mg/L 12.0 mg/L

4 weeks 8 weeks

**Figure 2** The malformed roots obtained from 6.0 and 12.0 mg/L BA at the first 4 weeks on hormone-free MS medium. However, elongated roots were found when shoots were cultured on the same medium for 8 weeks.

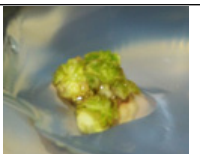
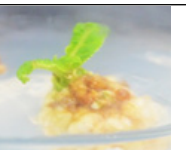
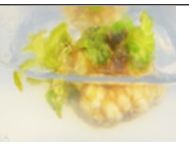
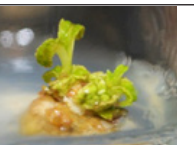
**การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยใช้ BA ร่วมกับ thidiazuron**

สำหรับการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยใช้ thidiazuron (TDZ) นั้น พบได้ในรายงานของพืชหลายชนิด โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับ BA ซึ่งพบว่าสามารถชักนำให้พืชใบเลี้ยงคู่และพืชในกลุ่มของไม้เนื้อแข็งเกิดยอดได้จำนวนมาก (Malabadi *et al*., 2004) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0 - 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากเนื้อเยื่อข้อสัก แต่ผลการทดลองพบว่าการใช้ TDZ ร่วมกับ BA กลับให้จำนวนยอดน้อยกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียวในการทดลองแรก โดยการใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นชุดทดลองที่ให้ผลดีที่สุดนั้น ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเพียง 4.1 ยอดเท่านั้น จำนวนยอดใหม่ที่เกิดจากชิ้นเนื้อเยื่อมีความแปรปรวนสูงจึงทำให้ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดพบว่าไม่แต่ต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยอดที่ได้ยังมีขนาดเล็กและสั้น ยอดส่วนใหญ่มี

ลักษณะฉ่ำน้ำ สีเขียวอมเหลือง รวมทั้งพบการเกิดแคลลัสจากด้านล่างของข้อที่สัมผัสอาหารเพาะเลี้ยง (Table 2) ซึ่งเป็นลักษณะยอดที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับยอดที่เกิดขึ้นจากการใช้ BA เพียงอย่างเดียวที่ได้ยอดมีลักษณะแข็งแรงและสีเขียวเข้ม (Figure 1)

อย่างไรก็ตาม ในการใช้ BA และ TDZ เพื่อชักนำให้เกิดยอดนั้น มีรายงานการทดลองใน *Miscanthus x ogiformis* โดย Nielsen *et al*. (1995) ซึ่งพบว่า ลำดับของการได้รับไซโตไคนินแต่ละชนิดมีผลอย่างมากต่อการเกิดยอด โดยพบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA เพียงอย่างเดียวก่อนในช่วงแรก แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี TDZ เพียงอย่างเดียวในลำดับต่อมา ช่วยกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ ก่อนแล้วจึงย้ายไปลงอาหารที่มี BA ซึ่งNielsen *et al*. (1995) อธิบายผลของลำดับการได้รับ BA และ TDZ นี้ว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานและปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไซโตไคนินและตัวรับสัญญาณไซโตไคนิน (cytokinin receptor) ในพืช ทั้งนี้ BA เป็นไซโตไคนินชนิดที่เป็นอนุพันธุ์ของอะดินิน ขณะที่ TDZ จัดเป็นไซโตไคนินชนิดที่เป็นอนุพันธุ์ของเฟนิลยูเรีย ดังนั้นจึงอาจมีกลไกในการตรวจรับและทำปฏิกิริยากับตัวรับสัญญาณที่แตกต่างกัน

**Table 2** The effects of MS solid medium containing with BA and TDZ on shoot proliferation of teak node explants. The explants were cultured for 4 weeks at 55 μM/$m^2$/s 16 h light, 25±2 ºC, with two weeks' interval of subculture.

| BA (mg/l) | Number and character of shoots | | |
|---|---|---|---|
| | 0.1 mg/l TDZ | 0.2 mg/l TDZ | 0.3 mg/l TDZ |
| 0.0 |  | |  |
| | 3.2±0.53 | 2.3±0.28 | 2.0±0.14 |
| 2.0 | | | |
| | 2.4±0.25 | 2.7±0.45 | 2.3±0.20 |
| 4.0 | | | |
| | 3.6±0.62 | 4.1±0.74 | 3.2±0.60 |
| 6.0 | |  |  |
| | 2.9±0.52 | 3.5±0.49 | 3.3±0.60 |
| C.V. (%) | 44.58 | 48.05 | 47.17 |
| F-test | ns | ns | ns |

ns = non-significant ($p \leq 0.05$)

**ผลของของ silver nitrate และ adenine sulfate ต่อการชักนำให้เกิดยอด**

จากกรณีการเกิดปัญหายอดฉ่ำน้ำที่พบจากบางทรีทเมนต์ของการทดลองชักนำยอดโดยใช้ BA ความเข้มข้นต่างๆ ในการทดลองแรกนั้น ที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวในพืชอื่นด้วย เช่น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟ ซึ่งพบว่าการใช้ silver nitrate ช่วยลดการฉ่ำน้ำและเพิ่มจำนวนยอดได้ (Sridevi *et al*., 2010) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ silver nitrate ที่เข้มข้น 0-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากข้อของสัก ผลการทดลองพบว่า การใช้ silver nitrate เข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 5.17 ยอดต่อข้อ (Table 3) อย่างไรก็ตามจำนวนยอดที่ชักนำได้จากการใช้ silver nitrate ทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้ silver nitrate แต่พบว่ายอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารที่เติม silver nitrate ทุกความเข้มข้นมีลักษณะสั้นเป็นกระจุก บางยอดไม่สามารถแยกออกเป็นยอดเดี่ยวได้ ใบมีขนาดใหญ่สีเขียวเข้มและบางใบมีรูปร่างผิดปกติ อย่างไรก็ตามไม่พบลักษณะฉ่ำน้ำในยอดใหม่ที่เกิดขึ้น (Figure 3) ดังนั้น การใช้ silver nitrate ร่วมกับ BA จึงไม่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดจากข้อสัก

สำหรับการใช้ adenine sulfate ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น มีรายงานที่ระบุว่า adenine sulfate ช่วยกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีขึ้นรวมทั้งลดปัญหาการฉ่ำน้ำ เนื่องจาก adenine sulfate อาจทำหน้าที่คล้ายสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโตไคนิน หรืออาจไปช่วยในการส่งเสริมการสร้างไซโตไคนินตามธรรมชาติ จึงส่งผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และส่งเสริมการสร้างยอดได้ (Naaz *et al*., 2014) ในการทดลองนี้จึงได้เพาะเลี้ยงข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ adenine sulfate เข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า การเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดจำนวน 5.83 ยอดต่อข้อ ซึ่งมากกว่าการไม่เติม adenine sulfate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติรองลงมาคือที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 3) การเติม adenine sulfate ความเข้มข้นต่ำ (10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลทำให้ยอดที่เกิดใหม่มีขนาดสม่ำเสมอและใกล้เคียงกับที่ไม่เติม adenine sulfate แต่การใช้ adenine sulfate ความเข้มข้นสูง (30-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้ยอดใหม่ที่ได้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ และยังพบลักษณะฉ่ำน้ำเกิดขึ้นด้วย (Figure 3) ดังนั้นในการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของสักจึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ adenine sulfate

MS+3.0 mg/L BA + SN 0 1.0 2.0 3.0 5.0 mg/L

MS+3.0 mg/L BA + AS 0 10 20 30 50 mg/L

**Figure 3** The morphology of shoots obtained from node explant of teak cultured on MS solid medium supplemented with 3.0 mg/L BA and various concentration of silver nitrate (SN) or adenine sulfate (AS) at 4 weeks of cultured at 55 μM/$m^2$/s 16 h light, 25±2 ºC.

**Table 3** The effects of MS medium containing 3.0 mg/L BA and supplemented with various concentrations of silver nitrate (SN) or adenine sulfate (AS) on shoot proliferation of teak node explants. The explants were incubated for 4 weeks at 55 μM/$m^2$/s 16 h light, 25±2 ºC, with two weeks' interval of subculture.

| Treatment | Number of shoot[1/] | Shoot height (cm)[1/] |
|---|---|---|
| silver nitrate 0 mg/L | 4.67±0.52 | 2.17±0.36[a] |
| silver nitrate 1.0 mg/L | 5.17±0.75 | 1.33±0.33[b] |
| silver nitrate 2.0 mg/L | 5.17±0.98 | 0.86±0.21[c] |
| silver nitrate 3.0 mg/L | 4.33±0.82 | 1.03±0.19[bc] |
| silver nitrate 5.0 mg/L | 4.67±0.52 | 0.89±0.22[bc] |
| F-test | ns | * |
| C.V. (%) | 15.85 | 43.98 |
| adenine sulfate 0 mg/L | 5.00±0.63[b] | 3.62±0.80 |
| adenine sulfate 10 mg/L | 5.17±0.75[ab] | 3.77±0.84 |
| adenine sulfate 20 mg/L | 4.83±0.41[b] | 3.78±0.55 |
| adenine sulfate 30 mg/L | 5.00±0.63[b] | 4.32±1.74 |
| adenine sulfate 50 mg/L | 5.83±0.41[a] | 3.15±1.32 |
| F-test | * | ns |
| C.V. (%) | 12.53 | 30.06 |

ns = non-significant ($p \leq 0.05$); [1/] Means in each column of each parameter followed by the same letter were not significantly different ($p \leq 0.05$) according to DMRT.

## สรุป

การทดลองใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0-12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อ สักพบว่า การใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วง 1.0 - 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้น โดย *BA* ที่ความเข้มข้น 6.0มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีการเกิดยอดสูงที่สุด แต่การเกิดยอดกลับลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงคือ 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการใช้อาหารที่เติม BA เข้มข้น 0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 – 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดน้อยกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว และการเกิดยอดมีความแปรปรวนสูง ยอดส่วนใหญ่มีขนาดเล็กและฉ่ำน้ำ สีเขียวอมเหลือง รวมทั้งพบการเกิดแคลลัสจากด้านล่างของข้อที่สัมผัสอาหารเพาะเลี้ยงด้วย สำหรับการใช้ silver nitrate ร่วมกับ BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้ silver nitrate แต่ยอดที่ได้มีลักษณะสั้นเป็นกระจุกแต่ไม่พบการฉ่ำน้ำ สำหรับการใช้ adenine sulfate ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น พบว่าการใช้ adenine sulfate ที่ความเข้มข้นต่ำ (10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับที่ไม่เติม แต่ที่ความเข้มข้นสูงทำให้ยอดใหม่ที่ได้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ และยังพบลักษณะฉ่ำน้ำเกิดขึ้นด้วย

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนข้อของสัก คืออาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่แสดงลักษณะฉ่ำน้ำ

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจากศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

## เอกสารอ้างอิง

สมคิด สิริพัฒนดิลก. 2517. การเจริญเปลี่ยนแปลงของดอกสัก. รายงานวนศาสตร์วิจัย เล่มที่ 31. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Akram, M. and F. Aftab. 2008. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. Propagat. Ornament. Plant. 8: 72-75.

Bonga, J.M. 1982. Tissue culture techniques, pp. 4 – 35. *In* J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.

Gupta, P.K., A.L. Nadgir, A.F. Mascarenhas and V. Jaganathan. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. Plant Sci. Lett. 17: 259–268.

Gyves, E.M. and E. Rugini. 2009. Teak. pp. 321-340. *In* C. Kole and T. C. Hall Jr., eds. Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species. Blackwell Publishing Ltd.

Malabadi, R.B., G.S. Mulgund and K. Nataraja. 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 76: 289-293.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Naaz, A., A. Shahzad and A. Mohammad. 2014. Effect of adenine sulfate interaction on growth and development of shoot regeneration and inhibition of shoot tip necrosis under *in vitro* condition in adult *Syzygium cumini* L. - a multipurpose tree. Appl. Bioch. Biotech. 173: 90–102.

Nielsen, J.M., J. Hansen and K. Brandt. 1995. Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus x ogiformis* 'Giganteus'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 41: 165-170.

Saunders J. W. and E. T. Bingham. 1975. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. Amer. J. Bot. 62: 850-855.

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

Sridevi, V., P. Giridhar, P.S. Simmi and G.A. Ravishankar. 2010. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants with collar region from in vitro seedlings of *Coffe acanephora* Pierre ex. Frohner cv. C3R and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 101: 339–347.

Tiwari, S.K., K.P. Tiwari and E.A. Siril. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 71: 1–6.

Vardja, R. and T. Vardja. 2001. The effect of cytokinin type and concentration and the number of subculture on the multiplication rate of some decorative plants. Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Eco. 50: 22-32.

White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York. 239 p.