*วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 9 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มิถุนายน): 9-14, 2565*
*Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 9, No. 1 (January-June): 9-14, 2022*

*Research article-ISSN: 2351-0846*

# ผลของสูตรอาหารและชนิดของชิ้นส่วนพืชต่อการพัฒนาของต้นจิกนา (*Barringtonia acutangular* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ

# Effect of Culture Media and Explant Types on Development of Indian Oak (*Barringtonia acutangula* L.) *In Vitro*

**ยุพาภรณ์ วิริยะนานนท์[1*] และ ภารดี แซ่อึ้ง[1]**
**Wiriyananont, Y.[1*] and Sae - Ung, P.[1]**

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา อ. พระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา 13000
[1] Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000

** Corresponding author: sirisomy@gmail.com*

*Received 02 July 2021; Revised 07 January 2022; Accepted 25 May 2022*

**บทคัดย่อ**

จิกนา เป็นพืชท้องถิ่นซึ่งมีอยู่ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศไทย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ และมีสรรพคุณทางยา ปัจจุบัน จิกนาในสภาพธรรมชาติถูกทำลายลงเนื่องจากการปลูกพืชเศรษฐกิจอื่นแทน ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์ต้นจิกนาไว้ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของจิกนามาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ 2,4-D (2,4-dichorophenoxyacetic acid) และ BA (6-Benzyladenine) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนพืชมีการพัฒนาที่แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนคัพภะ และใบอ่อน ให้การพัฒนาเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus) มีสีเหลืองอ่อน ในขณะที่ชิ้นส่วนกลีบดอกพัฒนาเป็นแคลลัสแบบร่วน (friable callus) สีเหลืองอ่อน ส่วนชิ้นส่วนปลายยอด และอับละอองเกสร ชิ้นส่วนพืชไม่มีการพัฒนา เมื่อตัดแยกยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะในหลอดทดลอง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0–2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารเติม BA ทุกความเข้มข้นให้การเกิดยอดรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสแบบร่วน ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกอ่อน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือ WPM (Woody Plant Medium) ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้บนอาหารทั้ง 2 สูตรอย่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แคลลัสที่ได้เจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดี เหมาะสำหรับนำไปเป็นเซลล์ตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และส่งเสริมให้เซลล์พืชผลิตสารชีวเคมีทุติยภูมิ อีกทั้งยังเป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมต้นจิกนาไว้ในหลอดทดลองเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป
**คำสำคัญ**: *Barringtonia acutangula* L., การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การอนุรักษ์พันธุกรรมพืช

**Abstract**

Indian Oak (*Barringtonia acutangula* L.) is a local plant that is found in Thailand, commonly grown as an ornamental plant, and has medicinal properties. They will be destroyed by the cultivation of other crops instead. Therefore, this study aimed to propagate the Indian Oak under a sterile condition. The explants were collected through the sterilization process and cultured on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) combined with 2 mg/l 2,4-D (2,4-dichorophenoxyacetic acid) and BA (6-Benzyladenine). After 8 weeks of culture, the explants began to develop. The embryo and young leaves develop into compact a callus, pale yellow in color and petal explant develop into a pale-yellow friable callus, while anther and shoot tip was not developed. When the shoot obtained from *in vitro* culture was cut and cultured on MS with 0-2.5 mg/l BA. The result showed that the total number of shoots at all concentrations of BA was not statistically different ($P \geq 0.05$). After culturing friable callus derived from young petals on MS or WPM (Woody Plant Medium) with 2 mg/l 2,4-D, there was no statistically significant difference in callus proliferation on both media ($P \geq 0.05$). These calluses can grow well and can be used as an initial cell to induce suspension cells for further producing secondary metabolites. From the results of this study, Indian Oak was conserved *in vitro* for further utilization.
**Keywords:** *Barringtonia acutangula* L., micropropagation, conservation


*Published by Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.*
*For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.*

**บทนำ**

จิกนา หรือจิกน้ำ (*Barringtonia acutangula* L.) อยู่ในวงศ์ Lecythidaceae เป็นพันธุ์ไม้อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในท้องถิ่น ซึ่งมีอยู่ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศไทย มีสรรพคุณทางยารักษาโรค ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นจิกนา ไม่ว่าจะเป็น ใบ ราก เนื้อไม้ ผล และเมล็ด สามารถนำมาสกัดสารหรือบดเป็นผงเพื่อใช้ในการรักษาโรคได้ มีคุณสมบัติต้านอาการอักเสบ ใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ การบาดเจ็บของข้อต่อ โรคทางตา และโรคผิวหนัง เป็นต้น (Kaur *et al*., 2013) ปัจจุบันสามารถพัฒนาไปเป็นพืชเศรษฐกิจ ที่ก่อให้เกิดรายได้ให้กับเกษตรกรและชุมชน โดยทั่วไปต้นจิกนาสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ด นิยมปลูกตกแต่งสวนหย่อมในบ้าน หรือในสถานที่ราชการต่าง ๆ และกำลังได้รับความนิยมของนักสะสมพันธุ์ไม้ อีกทั้ง ต้นจิกนามีแนวโน้มในการสูญพันธุ์หากไม่ได้รับการอนุรักษ์และส่งเสริมให้เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย (Community Forest Study and Development Center 12, 2010) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคโนโลยีชีวภาพหนึ่งมีเข้ามามีส่วนช่วยในการขยายพันธุ์ รวมทั้งช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์พืชไว้ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งบนอาหารแข็งและอาหารเหลว ขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืช รวมทั้งวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นจิกนานั้นยังมีรายงานค่อนข้างน้อย แต่พบการรายงานในพืชตระกูลเดียวกัน ดังรายงานของ Behbahani และคณะ (2011) ได้ชักนำแคลลัสและเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของต้นจิกสวน (*Barringtonia racemosa*) เพื่อชักนำให้เซลล์พืชมีการผลิตสาร ไลโคปีนได้ในสภาพปลอดเชื้อ จากการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารสูตร WPM เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสประเภท friable callus ได้ดีที่สุดหลังจากการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ และเมื่อนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยมาวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนด้วย HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบการสร้างสารดังกล่าวในทั้งสองตัวอย่าง นอกจากนี้ Dalila และคณะ (2013) ศึกษาผลของ 2,4-D และ kinetin ร่วมกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน ต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและเอ็นโดสเปิร์มของต้นจิกสวน พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาได้ดีจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และยังมีรายงานของ Osman และคณะ (2016) ศึกษาผลของ 2,4-D และ kinetin ต่อการชักนำแคลลัสของต้นจิกสวนจากการศึกษาพบว่า อาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4 - D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้ชิ้นส่วนเอ็นโดสเปิร์มสามารถพัฒนาแคลลัสได้ดีที่สุด

สำหรับจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ต้นจิกนาถูกพบอยู่ทั่วไปบริเวณริมคลองหรือริมนา โดยเฉพาะที่ตำบลคลองจิก อำเภอบางปะอิน ปัจจุบัน พบว่า ต้นจิกนาถูกทำลายลงไปมาก และปลูกแทนที่ด้วยพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ จึงเกรงว่าหากยังไม่ได้รับการอนุรักษ์ไว้ ก็จะสูญเสียความเป็นเอกลักษณ์ของชุมชนตำบลคลองจิกไป ดังนั้น ทางกลุ่มรัฐวิสาหกิจชุมชนตำบลคลองจิกจึงมีแนวคิดที่จะอนุรักษ์และขยายพันธุ์ต้นจิกนาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเมล็ดของต้นจิกนาค่อนข้างงอกยากในพื้นที่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ต้นจิกนาในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และยังเป็นแนวทางให้กลุ่มรัฐวิสาหกิจชุมชนตำบลคลองจิกได้นำไปปลูกเพื่อขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมต้นจิกนาต่อไป

**วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ**

***1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช***

เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนพืชของต้นจิกนา ได้แก่ ปลายยอด ใบอ่อน ดอกอ่อน และผล จากต้นจิกนาอายุประมาณ 10 ปี ในชุมชน ตำบลคลองจิก อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา มาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ โดยการล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น จุ่มแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจุ่มแช่ต่อในสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 20% เติมสารละลาย ทวีน-20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายคลอร็อกซ์ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วนำชิ้นส่วนพืชมาซับด้วยกระดาษชำระนึ่งฆ่าเชื้อให้แห้ง และตัดแยกชิ้นส่วนต่างๆ ดังนี้ ชิ้นส่วนใบอ่อน ตัดเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร ดอกอ่อน ให้ตัดแยกนำส่วนของกลีบดอก และอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยง และผลอ่อน ให้ตัดแยกเฉพาะส่วนของคัพภะมาเพาะเลี้ยง

***2. ศึกษาชนิดของชิ้นส่วนพืชต่อการพัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ***

นำชิ้นส่วนพืชที่เตรียมไว้ข้างต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส (MS ร่วมกับการเติมสารละลาย 2,4-D และ BA (6-Benzyladenine) ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3% และผงวุ้น 0.75%) ซึ่งดัดแปลงจากสูตรชักนำแคลลัสจากกลีบดอก และใบอ่อนกุหลาบหนูโดย Jiropasphanuwong และ Srisuay (2017) เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของชิ้นส่วนพืชและลักษณะของแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's new multiple range test) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้นส่วน

***3. ศึกษาผลของ BA ต่อการเพิ่มยอดรวมของต้นจิกนา***

ตัดแยกยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร (ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3% ผงถ่าน 0.2% และผงวุ้น 0.75%) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณยอดรวม คือ สูตร MS เติม BA ที่ความเข้มข้น 0-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3% ผงถ่าน 0.2% และผงวุ้น 0.75% เพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงเฉลี่ย 3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน และลักษณะยอดรวม วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี

DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้นส่วน

***4. ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณของ friable callus***

นำแคลลัสประเภท friable callus ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกอ่อน โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้น 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือ WPM ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดัดแปลงจากสูตรของ Behbahani *et al*., 2011) น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75% เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัส และลักษณะของแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Paired Sample t-test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

***1. ผลของชนิดของชิ้นส่วนพืชของต้นจิกนาต่อการพัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ***

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด ใบอ่อน กลีบดอกอ่อน อับละอองเกสร และคัพภะของต้นจิกนาบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ยังไม่พบการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง ต่อมาย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ บนอาหารสูตรเดิมต่ออีก 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนพืชเริ่มมีพัฒนาการที่แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนคัพภะ และใบอ่อน ให้การพัฒนาเป็น compact callus มีสีเหลือง ในขณะที่ชิ้นส่วนกลีบดอก มีการพัฒนาเป็น friable callus สีเหลืองอ่อน ส่วนชิ้นส่วนปลายยอด และอับละอองเกสร ไม่มีการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช (Table 1; Figure 1) พบเพียงการเปลี่ยนสีของชิ้นส่วนพืช โดยที่ยอดอ่อน ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีน้ำตาล เช่นเดียวกับอับละอองเกสร ที่ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาล และไม่มีการพัฒนา

จากการพัฒนาที่แตกต่างกันของชิ้นส่วนพืชบนอาหารสูตรเดียวกันนั้น อาจเนื่องมาจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อสูตรอาหารที่แตกต่างกัน จากรายงานที่พบโดยส่วนใหญ่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในตระกูล Lecythidaceae ใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด สามารถชักนำให้ใบอ่อนเกิดเป็นแคลลัส มีสีเหลือง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มีแสง แคลลัสที่ได้มีสีเขียว (Behbahani *et al*., 2011) ในขณะที่การศึกษานี้ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นจิกนา ในที่มืด แคลลัสที่ได้มีสีเหลือง เมื่อตัดแยกแคลลัสดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงบนอาหารสูตรเดิม พบว่า ชิ้นส่วนพืชชะงักการเจริญเติบโต เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ซึ่งการเปลี่ยนสีของแคลลัสจากสีเหลืองอ่อน เป็นสีน้ำตาล จนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโต อาจเนื่องมาจาก พืชในตระกูล Lecythidaceae ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกค่อนข้างมาก และหลายชนิด เช่น กรด trihydroxy triterpene monocarboxylic และกรดอินทรีย์อื่น ๆ เช่น กรด barringtogenic กรด tangulic และกรด oleanolic เป็นต้น (Kaur, 2013) ซึ่งสารชนิดนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงและส่งเสริมให้เกิดการสร้างในปริมาณมากและสะสมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งสังเกตได้จากสีของอาหาร ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่นหรือสีน้ำตาล ในการเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิด ต้องมีการเติมสารบางชนิดลงไปเพื่อยับยั้งการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมาจากชิ้นส่วนพืช ได้แก่ การเติมผงถ่านลงในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า (Wiriyananont *et al*., 2019) การเติมผงถ่านลงในสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปักษาสวรรค์ (North1, 2012) นอกจากนี้ ยังมีการเติมสารแอนติออกซิแดนซ์บางชนิดลงในอาหาร เช่น การเติมวิตามินซีลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน ก็สามารถช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงได้ (Thongpae *et al*., 2015; Nukoolrat *et al*., 2016)

เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช เห็นได้ว่า ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นจิกนาที่นำมาเพาะเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นคัพภะ ใบอ่อน กลีบดอกอ่อน และอับละอองเกสร จะมีการพัฒนาที่ค่อนข้างช้า ในการศึกษานี้ ใช้ระยะเวลาประมาณ 5 สัปดาห์ ชิ้นส่วนพืชจึงเริ่มมีการพัฒนา หลังจากนั้น friable callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกอ่อน มีการพัฒนาที่ค่อนข้างรวดเร็ว จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 8 จึงทำการย้ายเลี้ยง การพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่ค่อนข้างช้าสำหรับพืชตระกูล Lecythidaceae สอดคล้องกับรายงานของ Behbahari และคณะ (2011) ที่ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อน *Barringtonia racemosa* บนอาหารสูตร WPM เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนเริ่มมีการพัฒนาเป็น friable callus หลังจากการเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ ในขณะที่การศึกษาของผู้วิจัย พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนพัฒนาให้ compact callus ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้า แต่ชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนให้การพัฒนาเป็น friable callus ที่มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างรวดเร็ว ซึ่งจากรายงาน ส่วนใหญ่พืชในตระกูล Lecythidaceae นิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ TDZ หรือ KN เติมลงในอาหารสูตร WPM หรือสูตร MS เพื่อชักนำแคลลัส ชิ้นส่วนพืชที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงคือ ใบอ่อน และยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็นโดสเปิร์ม บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสประเภท friable callusได้ (Dalila *et al*., 2013) ส่วนแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกอ่อนในพืชตระกูล Lecythidaceae นั้นยังไม่พบรายงานการศึกษา

***2. ผลของ BA ต่อการเพิ่มยอดรวมของต้นจิกนา***

จากการตัดแยกยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะในหลอดทดลอง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0–2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารเติม BA ทุกความเข้มข้นให้การเกิดยอดรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) (Table 2) ลักษณะยอดรวมในอาหารเติม BA เข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดมีสีเขียวเข้มส่วนใบมีสีเขียวอ่อน ยอดในอาหารเติม BA เข้มข้น 1.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดและใบมีสีเขียวอ่อน (Figure 2)

ในการชักนำยอดรวมต้นจิกนา ผู้วิจัยเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เติมลงในอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดยอดรวม ซึ่ง BA เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน มีคุณสมบัติชักนำยอดรวมในพืชหลายชนิด ในไม้ยืนต้น เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มฟรีมองต์ และส้มโชกุน (Hansuek *et al*., 2018) การชักนำยอดรวมในต้นกุหลาบไฮบริดทีในหลอดทดลอง (Hansuek *et al*., 2019) เป็นต้น สำหรับการศึกษานี้พบว่า ความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้นนั้น ไม่ได้ส่งผลต่อการเกิดยอดรวมของต้นจิกนา เช่นเดียวกับการศึกษาของ

Mello และคณะ (2020) ได้เพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดและข้อของต้น *Lecythis Pisonis* (ตระกูล Lecythidaceae) ผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นเพียง 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้สูงสุดเฉลี่ย 2.57 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ความเข้มข้นของ BA สูงสุดกลับส่งผลให้การสร้างยอดรวมลดลง นอกจากนี้ การเติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมต้น *Couroupita guianensis* (Lecythidaceae) ได้สูงถึง 11 ยอดต่อชิ้นส่วน (Pushparaj *et al*., 2019) ซึ่งผู้วิจัยอาจต้องนำอาหารสูตรนี้ไปประยุกต์ใช้ในต้นจิกนาต่อไป สำหรับพืชตระกูล Lecythidaceae หลายชนิดมักตอบสนองต่ออาหารสูตร WPM ได้ดีกว่าสูตร MS อาจเนื่องมาจาก สูตร WPM ถูกคิดค้นมาเพื่อเพาะเลี้ยงไม้ยืนต้น สัดส่วนของธาตุอาหารมีความเหมาะสมมากกว่าสูตร MS ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย จากรายงานของ Aragão และคณะ (2017) ได้เพาะเลี้ยงคัพภะของต้น *Cariniana legalis* (Lecythidaceae) พบว่า อาหารสูตร WPM ให้อัตราการงอกของคัพภะ 66% ในขณะที่สูตร MS ให้อัตราการงอกของคัพภะเพียง 25% อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ ต้นจิกนาให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของชิ้นส่วนพืชไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งยอดรวมที่ได้ยังคงมีจำนวนน้อย อาจต้องเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ ด้วย เพื่อช่วยกระตุ้นการพัฒนาของตายอดหรือตาข้าง

***3. ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มปริมาณของ friable callus***

จากการเพาะเลี้ยง friable callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกอ่อน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือ WPM ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้บนอาหารทั้ง 2 สูตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) (Table 3) แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น friable callus สีเหลืองอ่อนเช่นเดียวกับแคลลัสเริ่มต้น (Figure 3) สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่ Behbahani และคณะ (2011) รายงานไว้ว่า friable callus ของต้น *Barringtonia racemose* (Lecythidaceae) สามารถเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร WPM ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีกว่าสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าจะเป็นพืชตระกูลเดียวกับจิกนาแต่คนละชนิด การตอบสนองต่ออาหารที่เพาะเลี้ยงมีอาจมีความแตกต่างกัน สำหรับการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ซึ่งพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เนื่องจาก ในตัวของพืชเองนั้น มีฮอร์โมนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติอยู่บางส่วน เพราะฉะนั้น หากได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่มเข้าไป ส่งผลให้สมดุลของฮอร์โมนนั้นเปลี่ยนแปลงได้ โดยชิ้นส่วนพืชที่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสนั้น สัดส่วนของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต้องสมดุลกัน

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูล Lecythidaceae นิยมเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หรือร่วมกับ TDZ หรือ KN ลงในอาหารสูตร MS หรือ WPM เพื่อชักนำแคลลัส โดยชิ้นส่วนพืชที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงคือใบอ่อน และยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงเอ็นโดสเปิร์มบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด friable callus ได้ (Dalila *et al*., 2013) ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนจากพืชในตระกูล Lecythidaceae ซึ่งผู้วิจัยสามารถชักนำแคลลัสประเภท friable callus ได้บนอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้ เจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดี เหมาะสำหรับนำไปเป็นเซลล์ตั้งต้นเพื่อชักนำเซลล์แขวนลอย เพื่อเพิ่มปริมาณ และอาจส่งเสริมให้เซลล์พืชผลิตสารชีวเคมีทุติยภูมิต่อไป

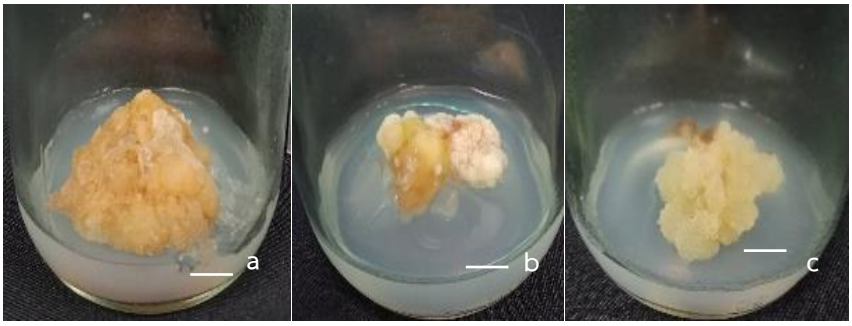


**Figure 1** Callus formation from different explants of Indian oak on callus induction medium (MS medium with 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l BA, 3% sucrose and 0.75%agar) after culturing for 8 weeks. (a): light yellow compact calluses from embryo culture; (b): light yellow compact calluses from young leaves culture and (c): light yellow friable calluses from young petal culture. Bar = 0.5 cm

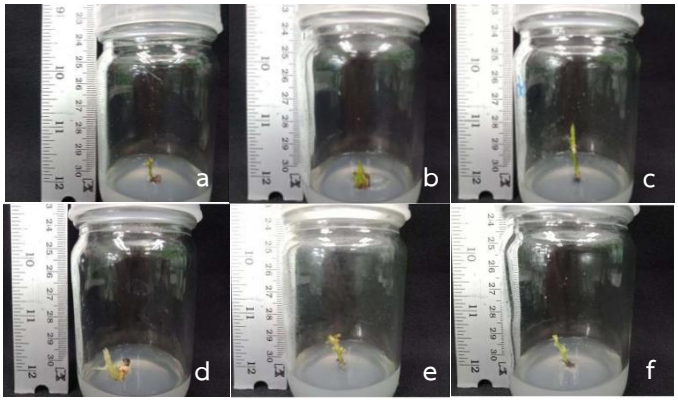


**Figure 2** Shoots formation from Indian Oak shoot tip explants cultured on MS medium with different concentration of BA after culturing for 8 weeks. (a): MS medium without BA; (b): 0.5 mg/l BA; (c): 1 mg/l BA; (d): 1.5 mg/l BA; (e): 2 mg/l BA and (f): 2.5 mg/l BA.

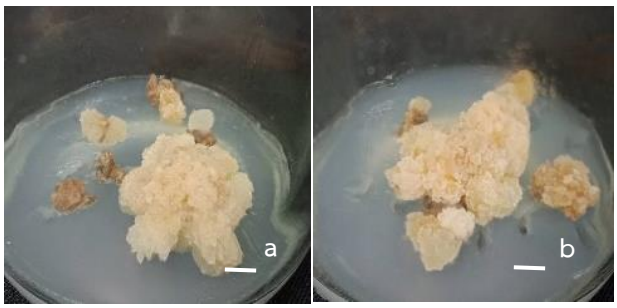


**Figure 3** Callus proliferation of Indian oak on different media after culturing for 4 weeks. (a): friable callus on MS medium with 2 mg/l 2,4-D and (b): friable callus on WPM medium with 2 mg/l 2,4-D. Bar = 0.5 cm

**Table 1** Effect of Indian Oak explants on development after culturing on MS medium supplemented with BA and 2,4-D at 2 mg/l for 8 weeks

| Explants | Explants development (%) | Callus morphology |
|---|---|---|
| Embryo | 100.00[1/]a | Pale yellow compact callus |
| Young petal | 58.33b | Pale yellow friable callus |
| Young leave | 50.00b | Pale yellow compact callus |
| Shoot tip | 0.00c | not developed |
| Anther | 0.00c | not developed |
| F-test | * | |
| C.V. (%) | 2.73 | |

* = Significant difference at $P \geq 0.05$ level.

[1/] = Value followed by different letters are significantly different according to DMRT.

**Table 2** Effect of BA on multiple shoot induction from Indian Oak shoot tip explants cultured on MS medium with different concentrations of BA for 8 weeks.

| BA (mg/l) | Shoots formation (%) | Number of shoots (shoots/explant) | Shoot morphology |
|---|---|---|---|
| 0 | 80 | 0.8±0.42 | Dark green shoot with light green leaves |
| 0.5 | 100 | 1.2±0.42 | Dark green shoot with light green leaves |
| 1.0 | 100 | 1.5±0.70 | Dark green shoot with light green leaves |
| 1.5 | 100 | 1.4±0.52 | Light green shoot and leaves |
| 2.0 | 100 | 1.1±0.32 | Light green shoot and leaves |
| 2.5 | 100 | 1.3±0.48 | Light green shoot and leaves |
| F-test | ns | ns | |
| C.V. (%) | 0 | 0.24 | |

ns = Not significant difference at $P \geq 0.05$ level.

**Table 3** Effect of culture media with 2 mg/l 2,4-D on callus proliferation after culturing for 4 weeks

| Media | Calluses fresh weight (g) | Callus morphology |
|---|---|---|
| MS with 2 mg/l 2,4-D | 3.83±0.57 | Light yellow friable calluses |
| WPM with 2 mg/l 2,4-D | 3.62±0.32 | Light yellow friable calluses |
| T-test | ns | |
| C.V. (%) | 0.21 | |

ns = Not significant difference at $P \geq 0.05$ level.

**สรุป**

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นจิกที่เก็บจากสภาพธรรมชาติบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส (MS ร่วมกับการเติม 2,4-D และ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75%) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า คัพภะให้การพัฒนาของชิ้นส่วนพืชสูงสุด 100% โดยพัฒนาเป็น compact callus สีเหลืองอ่อนเช่นเดียวกับการพัฒนาจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ส่วนกลีบดอกอ่อน พัฒนาเป็น friable callus สีเหลืองอ่อน ในขณะที่ปลายยอดและอับละอองเกสรไม่มีการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม BA ที่ความเข้มข้น 0-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่เติม BA ทุกความเข้มข้นให้จำนวนยอดได้ ส่วนการเพาะเลี้ยง friable callus บนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า friable callus สามารถเพิ่มปริมาณได้บนอาหารสูตร MS หรือ WPM เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ประจำปี 2562 (ครั้งที่ 2) ที่สนับสนุนทุนสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

**เอกสารอ้างอิง**

Aragão, V. P. M., Navarro, B. V., Silva A. Tardin da, Silveira, V., Santa-Catarina, C. 2017. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest 13: 41-50.

Behbahani, M., Shanehsazzadeh, M. and Hessami, M.J. 2011. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil) 68: 69-76.

Community Forest Study and Development Center 12. 2010. Study on the species of plants "Indian Oak". Nakhon Si Thammarat: Community Forest Management Section Forest Resources Office 12. Royal Forest Department.

Dalila, Z.D., Jaafar, H. and Manaf, A.A. 2013. Effect of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media. Asian Journal of Plant Sciences 12: 21-27.

Hansuek, S., Chaisirikul, J., Kitbuncha, M. and Liamnimitr, N. 2018. Effects of BA and NAA on plant regeneration of fremont and shogun oranges. Songklanakarin Journal of Plant Science 5: 32-38.

Hansuek, S., Petkaew, A., Trairabiap, C., Thongmeesuk, N. and Liamnimitr, N. 2019. Effects of culture media and explant types on shoot induction and *in vitro* flowering of hybrid tea. Songklanakarin Journal of Plant Science 6: 1-9.

Jiropasphanuwong, Y. and Srisuay, W. 2017. Comparison of total anthocyanin contents in callus, petal and young leaves of Fairy Rose (*Rosa chinesis* Jacq. var.minima Voss). Princess of Naradhiwas University Journal 9: 143-150. (In Thai)

Kaur, M., Singh, G. and Mohan, C. 2013. *Barringtonia acutangula*: a traditional medicinal plant. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 23: 168-171.

Mello, T., Goncalves, E.O., Alexandre, R.S., Schmildt, E.R. and Otoni, W.C. 2020. Establishment and *in vitro* morphogenesis of sapucaia explants (Lecythidaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 56: 882-893.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiologia Plantarum 15: 45-47.

Nukoolrat, A., Yenchon, S. and Te-chato, S. 2016. Effects of ascorbic acid, auxins and sugars on somatic embryo induction of oil palm SUP-PSU. Songklanakarin Journal of Plant Science 3: 1-7.

Osman, N.I., Sidik, N.J. and Awal, A. 2016. Effect of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explants of *Barringtonia racemosa* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6: 143- 147.

Pushparaj, S. A., Alphonse, V. and Ramalingam, R. 2019. *In vitro* regeneration system of *Couroupita guianensis* using cotyledonary nodes. Asian Journal of Biological Sciences 12: 412-422.

Thongpae, T., Khawniam, T. and Te-chato, S. 2015. Effects of culture media and conditions on embryogenic callus induction from immature zygotic embryo of oil palm Pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Pisifera). Songklanakarin Journal of Plant Science 2: 41-45.

Wiriyananont, Y., Vangmul, P. and Ramasoot, S. 2019. Effect of culture media and bud splitting on development of banana (*Musa sp*. cv. Namwa (ABB)) from *in vitro* shoot bud culture. Wichcha joirnal Nakhon Si THammarat Rajabhat University 38: 16-17.