

ผลของอายุผลและสารควบคุมการเจริญเติบโต
ต่อการสร้างแคลลัสในพืชสกุล *Garcinia*

Effect of Fruit Ages and Plant Growth Regulators on
Callus Formation of *Garcinia*

สมปอง เตชะโต¹ และชวนพิศ นิยะกิจ²

Sompong Te-chato¹ and Chuanpis Niyagij²

Abstract : Callus formation from seed segments of three species of *Garcinia*, mangosteen, Phawa and somkaeg excised from fruits at 2, 4 and 6 weeks after blooming was investigated. Callus induction was carried out on MS medium supplemented with various concentrations of BA (benzyladenine) or TDZ (thidiazuron) and 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid). The results showed that seed of mangosteen at 2 weeks of blooming which provided percentage of callus formation of 74.9. In the case of somkaeg, callus formation was not obtained in all ages of fruits. Callus formation on the medium supplemented with 2,4-D in combination with BA or TDZ was not different. Callus feature obtained from 2,4-D and BA-containing medium was friable while 2,4-D and TDZ-containing medium gave compact one. Maintenance of mangosteen callus by subculturing to various kinds and concentrations of plant growth regulators in comparison with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ-containing medium revealed that BA and TDZ-containing medium gave the best proliferation of the calli. Among various ages of mangosteen fruits 4 weeks after blooming gave the best results in maintenance and proliferation of the calli. For phenolic compound production in culture, BA produced a large amount of the compound from seed segment at 2 weeks after blooming whereas TDZ gave contrary result.

¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112

² Faculty of Natural Resource, Songklanakarin University, Had yai, Songkla 90112, Thailand.

บทคัดย่อ : การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในสกุล *Garcinia* 3 ชนิด คือ มังคุด พะวา และส้มแขก ที่แยกจากผล 2,4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เติม BA (6-benzyladenine) หรือ TDZ (thidiazuron) ร่วมกับ 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเนื้อเยื่อจากผลอายุ 2 สัปดาห์หลังดอกบาน ให้การสร้างแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 96.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เนื้อเยื่อจากผลอายุ 4 สัปดาห์หลังดอกบาน ให้การสร้างแคลลัสเฉลี่ย 74.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนส้มแขกไม่มีการสร้างแคลลัสทุกอายุผล การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากผลอายุ 4 สัปดาห์หลังดอกบาน บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสไม่ต่างกัน แคลลัสที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA มีลักษณะเป็นแบบ friable ส่วนอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ให้แคลลัสเป็นแบบ compact การย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ และสูตรควบคุม (MS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าเนื้อเยื่อจากผลอายุ 4 สัปดาห์หลังดอกบาน ให้การสร้างแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 50.9 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการสร้างสารฟีนอลจากการเพาะเลี้ยงพบว่าอาหารเติม BA ส่งเสริมการสร้างสารดังกล่าวจำนวนมากจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากผลอายุ 2 สัปดาห์หลังจากดอกบานในขณะที่ TDZ ให้ผลในทางตรงข้าม

Index words : Plant growth regulator, callus formation, *Garcinia*

บทนำ

พืชในสกุล *Garcinia* ในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกันประมาณ 23 ชนิด ตามที่บันทึกไว้โดยเดิม (2523) แต่จากการสำรวจในภาคใต้พบว่ามีเพียง 8 ชนิด ในจำนวนนี้มี 7 ชนิด ที่จำแนกได้และอีกหนึ่งชนิดไม่สามารถจำแนกได้ (Lim *et al.*, 1986) ในจำนวนนี้พบว่าที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และนำมาใช้ในชีวิตประจำวันมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิดเรียงตามลำดับความสำคัญดังต่อไปนี้ คือ มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn) และส้มแขก (*G. atroviridis* Griff) ชะมวง (*G. cowa* Roxb) มะพุด (*G. dulcis* Kurz) และพะวา (*G. speciosa* Wall) ที่ชนิดหลังมักขึ้นตามป่าหรือแหล่งที่เป็นธรรมชาติดั้งเดิม หรือปลูกเป็นพืชหลังบ้านไว้ใช้ผล และใบนำมาประกอบอาหาร การปลูกไม่จำเป็นต้องดูแลมาก ทนทานต่อความแห้งแล้ง และมีอัตราการ

เจริญเติบโตดีเมื่อเปรียบเทียบกับมังคุด ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีแนวความคิดที่ใช้พืชดังกล่าวเป็นต้นตอกับมังคุด แต่เนื่องจากปัญหาความไม่สามารถประสานตัวกันได้ระหว่างต้นตอกับกิ่งเลี้ยง (มีอนุภาคยางสีเหลืองจำนวนมาก) ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้ แม้ว่าจะมีการดัดแปลงการต่อกิ่งในหลอดทดลองก็ตาม (สมปอง, และคณะ, 2535) แต่ผลสำเร็จจากการต่อกิ่งยังคงต่ำเนื่องจากปัญหาของพืชในสกุลนี้ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วทำให้การศึกษาทางด้านเทคโนโลยีเซลล์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในสกุลนี้ไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร

ปัจจุบันมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุลนี้กันมากขึ้นแต่ยังคงมีจำกัดอยู่เพียงมังคุดเท่านั้น ขึ้นส่วนต่างๆ ที่ประสบความสำเร็จจากการเลี้ยง เช่น เนื้อเยื่อ (Normah, 1992,1995; สมปอง และวันทนา, 2531) ใบ (Goh *et al.*, 1994;

สมปอง เตชะโต และคณะ, 2535) และแคลลัส (Te-chato *et al.*, 1995a) การเพาะเลี้ยงที่กล่าวข้างต้น มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์เป็นส่วนใหญ่สำหรับชนิดอื่นๆ ของพืชในสกุลนี้มีการศึกษากันน้อยมาก สมปอง เตชะโต (2540) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงใบพืชในสกุลนี้ 3 ชนิด คือ มังคุด พะวา และส้มแขก พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน แคลลัสที่ชักนำได้แบ่งเป็นสองประเภท คือ เป็นก้อนแข็งสามารถชักนำการสร้างยอดได้ โดยชักนำจากใบมังคุด และพะวา ส่วนแคลลัสที่มีลักษณะร่วนเปราะชักนำจากใบส้มแขก แต่เนื่องจากการเพิ่มปริมาณได้ช้าไม่สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชัน (cell suspension) ได้ทำให้การใช้เทคโนโลยีเซลล์ในขั้นสูงต่อไปมีข้อจำกัดเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวในรายงานฉบับนี้ จึงทดลองใช้ชิ้นส่วนอื่นๆ คือ นิวเคลลาเซลล์ (nucellar cell) ที่กำลังพัฒนาให้เมล็ดซึ่งมีอายุต่างๆ หลังจากดอกบานมาชักนำแคลลัสในอาหารที่ดัดแปลงโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ในอันที่จะส่งเสริมการสร้างแคลลัสที่มีความเหมาะสมใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืชในสกุลนี้ต่อไป และได้ศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบฟีนอลอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสูตรพื้นฐาน MS ดัดแปลงโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ สำหรับสูตรอาหารชุดควบคุมที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสูตรพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog) เดิม BA

(benzyladenine : Fluka, Cat. No. 13151) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมด้วย TDZ (thidiazuron : Wako, Cat. No.200-12191) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น Phytagel (Sigma : Cat. No. P-8169) เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์ PVP (polyvinylpyrrolidone : Fluka, Cat. No. 81440) เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ที่ 5.7 จากนั้นหลอมวุ้นให้เข้ากันดีแบ่งใส่หลอดฝาเกลียว (18 x 18 มม) ปิดฝาให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมวัสดุพืช

เก็บผลมังคุดอายุต่างๆ คือ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน มาทำความสะอาดผิวนอกด้วยผงซักฟอกล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด นำเข้าตู้ยาล้าง แช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที แล้วฉีกไฟ ใช้มีดคัดเตอร์ผ่าผลตามขวาง ใช้ปากคีบแกะและคีบเมล็ดตัดแบ่งให้มีขนาดเท่าๆ กัน 0.3 - 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมไว้จำนวน 4 - 5 ชิ้น ต่อหลอดฝาเกลียว ส่วนพะวาและส้มแขกเตรียมเช่นเดียวกับผลมังคุด

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาผลของอายุผลมังคุดพะวา และส้มแขกต่อการสร้างแคลลัส

นำเมล็ดมังคุด พะวา และส้มแขกอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบานมาแยกเมล็ดหรือเนื้อเยื่อนิวเคลลาออกมาตัดแบ่งตามขวางให้มีความหนา 2-3 มม. ส่วนความกว้างขึ้นกับขนาด

ของเมล็ด วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1-5 ชั้นต่อหลอด ภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ ช่วงแสง 14 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน ตรวจนับจำนวนและลักษณะแคลลัส ทุกๆ 1 เดือน บันทึกผลเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแคลลัสในแต่ละอายุและพันธุ์ แล้วย้ายเลี้ยง ทุกๆ 1 เดือน บนอาหารใหม่สูตรเดิม

ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและอายุผลของมังคุดต่อการสร้างแคลลัส

เก็บผลมังคุดอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน มาแกะเมล็ด หรือเนื้อเยื่อนิวเคลลาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยง 1 - 5 ชั้นส่วนต่อหลอด ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจนับจำนวน และลักษณะแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละอายุ ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ผลของอายุผลมังคุดต่อการสร้างสารประกอบฟีนอลในอาหารที่วางเลี้ยง

หลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดหรือเนื้อเยื่อนิวเคลลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม 2 ครั้ง (ย้ายเลี้ยง 4 สัปดาห์/ครั้ง) หลังจากย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 แล้วนำหลอดอาหารในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของ

สารควบคุมการเจริญเติบโตมาตัดก้านหนา 0.5 เซนติเมตร จากผิวบนไปละลายกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นนำสารละลายตอนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น Ultospec 3,000 บันทึกผลและนำไปเขียนกราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณสารฟีนอล ที่สร้างเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ผลของสูตรอาหารต่อการย้ายเลี้ยงและการดูแลแคลลัสของมังคุด

ย้ายแคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดหรือเนื้อเยื่อนิวเคลลาของผลมังคุดอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบานและเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ไปยังอาหารสูตรใหม่ 3 สูตร คือ : อาหารสูตรควบคุมสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใช้กับแคลลัสมังคุดอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน), อาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใช้กับแคลลัสมังคุดอายุ 2 สัปดาห์หลังดอกบาน), อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใช้กับแคลลัสมังคุดอายุ 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน)

นับจำนวนแคลลัส และบันทึกผลการเพิ่มปริมาณแคลลัสเปรียบเทียบกันในอาหารทั้ง 3 สูตร

ผลการทดลอง

ผลของอายุผลมังคุด พะวา และส้มแขก ต่อการ สร้างแคลลัส

จากการวางเลี้ยงเมล็ดของพืชในสกุล *Garcinia* 3 ชนิด คือ มังคุด พะวา และส้มแขก บนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D ร่วมกับ BA

ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ามังคุดอายุ 2 สัปดาห์ หลังดอกบานให้การชักนำการสร้างแคลลัสสูง ที่สุด 96.7 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ พะวาอายุ 4 สัปดาห์ หลังดอกบาน 74.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนส้มแขก ไม่มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโต ในการชักนำการสร้างแคลลัส (ตารางที่ 1)

Table 1 Effect of fruit ages and cultivars of *Garcinia* on callus induction.

cultivars	callus induction percentage		
	2 week	4 week	6 week
mangosteen	96.7	92.7	95.0
phawa	23.2	74.9	50.0
somkaeg	0	0	0

ในการศึกษาถึงความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการสร้างแคลลัส พืชสกุล *Garcinia* 3 ชนิด คือ มังคุด พะวา และ ส้มแขก อายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน พบว่า มังคุดอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน ตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์บนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D ความเข้มข้นที่สูงขึ้น 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2, 3 และ 4) ส่วนในพะวาพบว่าอายุ 2 สัปดาห์หลังดอกบานตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสได้ 18-60 เปอร์เซ็นต์บนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 1

มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) พะวาอายุ 4 สัปดาห์หลังดอกบานตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสได้ 58-100 เปอร์เซ็นต์บนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) พะวาอายุ 6 สัปดาห์หลังดอกบานตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสได้ 50 เปอร์เซ็นต์บนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) ในขณะที่ส้มแขกไม่ตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสในทุกอายุและทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 2, 3 และ 4)

Table 2 Effect of plant growth regulators and cultivars of *Garcinia* on callus formation from young seed or integument at 2 weeks after blooming.

plant growth regulators	cultivars		
	mangosteen	phawa	somkaeg
0.5DB	100	18.8	0
0.5D1B	92.3	10.0	0
0.5D2.5B	100	45.5	0
0.5D5B	100	21.3	0
1D0.5B	93.3	60.0	0
1DB	75	54.5	0
1D2.5B	100	18.2	0
1D5B	100	33.3	0
2D0.5B	100	54.5	0
2D1B	100	16.7	0
2D2.5B	100	0.0	0
2D5B	100	0.0	0
3D0.5B	100	0.0	0
3D1B	100	9.09	0
3D2.5B	92.9	0.0	0
3D5B	92.9	0.0	0
average	96.7	23.2	0

Table 3 Effect of plant growth regulators and cultivars of *Garcinia* on callus formation from seed or integument at 4 weeks after blooming.

plant growth regulators	cultivars		
	mangosteen	phawa	somkaeg
0.5DB	88.9	72.7	0
0.5D1B	100	100	0
0.5D2.5B	90.0	90.9	0
0.5D5B	100	58.3	0
1D0.5B	75	100	0
1DB	90	72.7	0
1D2.5B	100	90.9	0
1D5B	90	90.9	0
2D0.5B	62.5	72.0	0
2D1B	82.5	87.5	0
2D2.5B	100	83.3	0
2D5B	100	90.9	0
3D0.5B	100	36.4	0
3D1B	100	66.7	0
3D2.5B	100	38.5	0
3D5B	100	46.7	0
average	92.7	74.9	0

Table 4 Effect of plant growth regulators and cultivars of *Garcinia* on callus formation from seed or integument at 6 weeks after blooming.

plant growth regulators	cultivars		
	mangosteen	phawa	somkaeg
0.5DB	100	50	0
0.5D1B	90.9	50	0
0.5D2.5B	90	50	0
0.5D5B	100	50	0
1D0.5B	100	50	0
1DB	100	50	0
1D2.5B	88.9	50	0
1D5B	87.5	50	0
2D0.5B	75	50	0
2D1B	100	50	0
2D2.5B	100	50	0
2D5B	87.5	50	0
3D0.5B	100	50	0
3D1B	100	50	0
3D2.5B	100	50	0
3D5B	100	50	0
average	95.0	50	0

ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและอายุผลของมังคุดต่อการสร้างแคลลัส

การวางเลี้ยงเมล็ด มังคุด อายุต่างๆ บนอาหารสูตร MS เต็ม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า มังคุดอายุ 2 สัปดาห์ หลังดอกบานสามารถชักนำการสร้างแคลลัสเฉลี่ย 96.7 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถชักนำได้ 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เต็ม 2,4-D เข้มข้น 1 - 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ มังคุดอายุ 6 และ 4 สัปดาห์ดอกบานสามารถชักนำการสร้างแคลลัส

เฉลี่ย 95 เปอร์เซ็นต์ และ 92.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยสามารถชักนำได้ 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เต็ม 2, 4-D ร่วมกับ BA เข้มข้นที่กล่าวข้างต้น (ตารางที่ 5) สำหรับการสร้างแคลลัสในอาหารเต็ม 2,4-D ร่วมกับ TDZ นั้น พบว่า อายุผลมากขึ้นส่งผลให้การสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้น อายุผล 6 สัปดาห์ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 96.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 4 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 96 และ 93.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมในช่วง 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาถึงลักษณะ และจำนวนของ แคลลัสจากเมล็ดมั่งคุดในอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์ หลังดอกบานซึ่งวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกัน พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D ร่วมกับ BA ความเข้ม

ขึ้นต่างๆ ให้การสร้างแคลลัสมีลักษณะร่วนเปราะ สีเหลือง (friable yellow callus) ในขณะที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ให้การสร้างแคลลัสมีลักษณะแข็ง สีเหลือง (compact yellow callus) ส่วนความถี่ในการสร้างแคลลัสในแต่ละอายุไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6, 7)

Table 5 Effect of plant growth regulators and ages of fruit on callus formation on MS medium supplemented with various concentration of 2, 4-D and BA.

plant growth regulators	2 week			4 week			6 week			average
	number of		%	number		%	number		%	
	exp	callus	callus	exp	callus	callus	exp	callus	callus	
0.5DB	11	11	100	9	8	88.87	12	12	100	96.3
0.5D1B	13	12	92.31	9	9	100	11	10	90.91	94.4
0.5D2.5B	12	12	100	10	9	90	10	9	90	93.3
0.5D5B	11	11	100	9	9	100	10	10	100	100
1D0.5B	15	14	93.33	8	6	75	11	11	100	89.4
1DB	8	6	75	10	9	90	7	7	100	88.3
1D2.5B	12	12	100	9	9	100	9	8	88.89	96.3
1D5B	7	7	100	10	9	90	8	7	87.5	92.5
2D0.5B	13	13	100	8	5	62.5	12	9	75	79.2
2D1B	13	13	100	8	7	82.5	8	8	100	94.2
2D2.5B	12	12	100	10	10	100	9	9	100	100
2D5B	13	13	100	9	9	100	8	7	87.5	95.8
3D0.5B	12	12	100	9	9	100	8	8	100	100
3D1B	14	14	100	8	8	100	7	7	100	100
3D2.5B	14	13	92.9	9	9	100	7	7	100	97.6
3D5B	14	13	92.9	11	11	100	7	7	100	97.6
average			96.7			92.4			95.0	

exp = explant

Table 6 Effect of plant growth regulators and ages of fruit of mangosteen on callus formation.

plant growth regulators	2 week			4 week			6 week			average
	number of		%	number		%	number		%	
	exp	callus		callus	exp		callus	callus		
0.5D0.1T	12	11	91.7	8	8	100	10	9	90	93.9
1D0.01T	12	11	91.7	10	9	90	11	11	100	93.9
1D0.05T	12	11	91.7	10	10	100	11	11	100	97.2
1D0.1T	12	12	100	10	8	80	12	12	100	93.3
1D0.5T	12	11	91.7	10	8	80	9	9	100	90.6
2D0.01T	12	12	100	7	6	85.7	10	9	90	91.9
2D0.05T	13	12	92.2	8	8	100	7	7	100	97.4
2D0.1T	12	11	91.7	11	11	100	10	10	100	97.2
2D0.5T	12	12	100	10	10	100	9	8	88.9	96.3
3D0.01T	12	11	91.7	10	10	100	8	7	87.5	93.1
3D0.05T	12	12	100	9	9	100	11	9	81.8	93.9
3D0.1T	12	12	100	9	9	100	12	12	100	100
3D0.5T	12	12	100	10	10	100	10	10	100	100
average			93.8			96.0			96.1	

exp = explant

การศึกษาผลของอายุผลมังคุดต่อการสร้าง สารประกอบฟีนอลในอาหารที่วางเลี้ยง

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดมังคุดบนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงสร้างสารประกอบฟีนอลแล้วปลดปล่อยสู่อาหาร ทำให้อาหารที่วางเลี้ยงมีสีน้ำตาลเมื่อนำอาหารที่วางเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรพบว่าชิ้นส่วนเมล็ดที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด 0.65 ในมังคุดอายุ 6 สัปดาห์หลังดอกบาน แสดงว่ามีการสร้างสารฟีนอลแล้วปลดปล่อยสู่อาหารในปริมาณน้อยทำให้อาหารมีสีน้ำตาลอ่อน

(ภาพที่ 1A) เช่นเดียวกับชิ้นส่วนเมล็ดที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามังคุดอายุ 2 สัปดาห์หลังดอกบานให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด 0.64 เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งเสริมการสร้างสารฟีนอล พบว่า TDZ ส่งเสริมการสร้างสารฟีนอลสู่อาหารในปริมาณสูงกว่ามังคุดอายุ 4 สัปดาห์หลังดอกบานให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 1.69 ในอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าสูตรอาหารดังกล่าวไม่เหมาะที่ใช้ในการชักนำการสร้างแคลลัสเนื่องจากสารฟีนอลมีผลในการชะลอการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชได้ (ภาพที่ 1B)

Table 7 Effect of plant growth regulators and ages of fruit of mangosteen on callus formation.

plant growth regulators	2 week		4 week		6 week	
	character	frequency	character	frequency	character	frequency
0.5DB	f	++	f	+++	f,cf	+++
0.5D1B	f	++	f	+++	f,cf	+++
0.5D2.5B	f	+++	f	++	f,cf	++
0.5D5B	f,cf	++	f,cf	+++	f,cf	++
1D0.5B	f,cf	++	f,cf	+++	f	++
1DB	cf	+++	f	++	f,cf	++
1D2.5B	f,cf	+++	f,cf	++++	f	+++
1D5B	f,cf	++++	cf	++	f	+++
2D0.5B	f	+++	f,cf	+	f	+++
2D1B	f	++++	f	+++	f	+++
2D2.5B	f	+++	f	++	f	+++
2D5B	f	+++	f	++	f	++
3D0.5B	f	+++	f	+++	f	+++
3D1B	f,cf	+++	f	+++	f	+++
3D2.5B	f,cf	++	f	++++	f	+++
3D5B	f	+++	f	+++	f	++

f : friable callus	+	0-25%
c : compact callus	++	26-50%
cf : compact + friable callus	+++	51-75%
	++++	76-100%

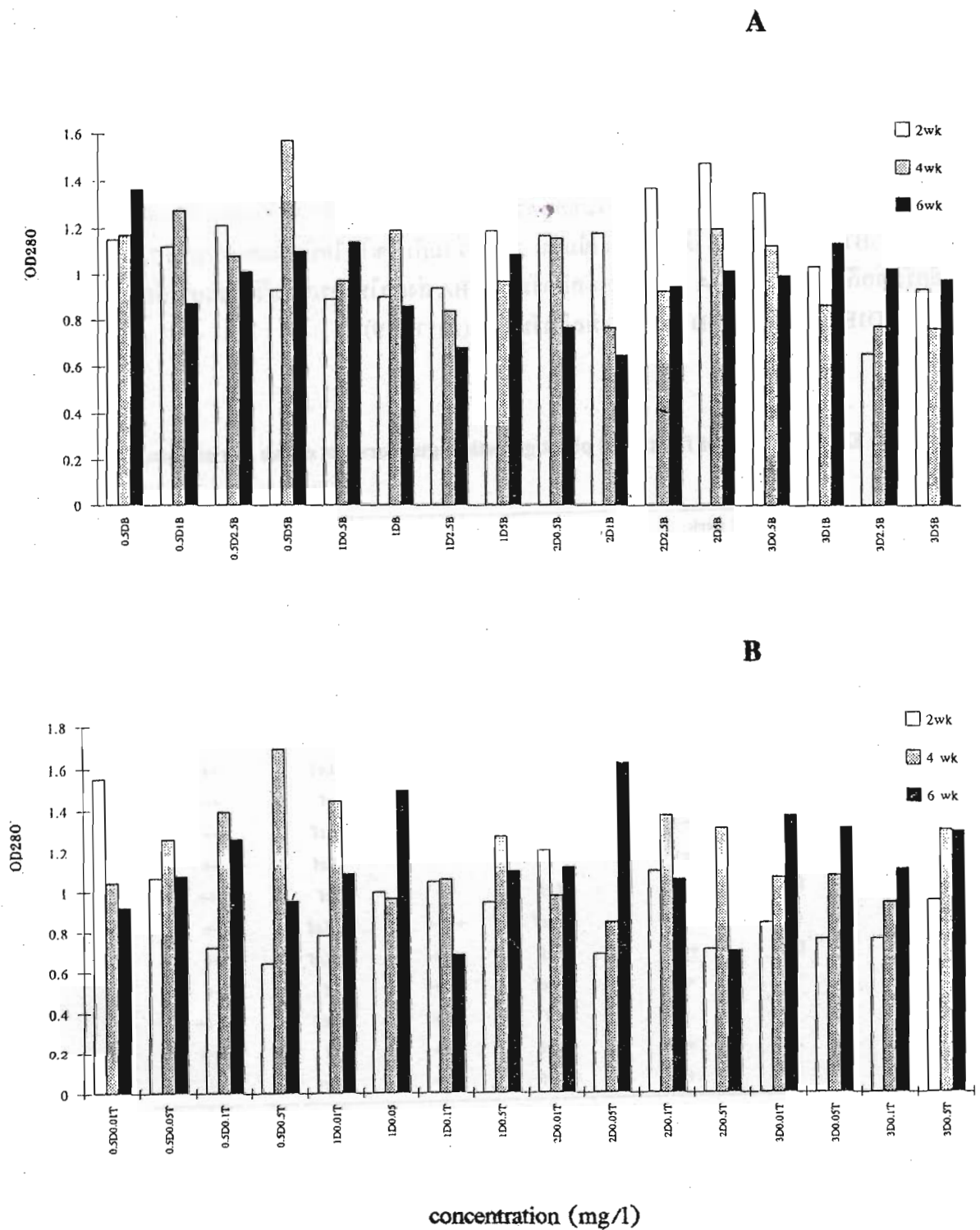


Figure 1 Effect of various concentrations of the two cytokinins, BA (A) and TDZ (B) on phenolic compound production.

การศึกษาผลของสูตรอาหารที่ย้ายเลี้ยงต่อการดูแลและการเพิ่มปริมาณแคลลัสของมังคุด

การวางเลี้ยงมังคุด คมึงคุ ดออายุ ต่างๆ บนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปยังสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน (0.5BT) และสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2D1B) หรือ เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (2D0.1T) พบว่า ชิ้นส่วนเมล็ดจากผลมังคุดอายุ 4 สัปดาห์หลังคอกบานให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 50.9 เปอร์เซ็นต์ ในสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน ในกรณีการเติมออกซินลงในอาหารเลี้ยง ร่วมกับไซโตไคนินที่แตกต่างกัน 2 ชนิดนั้นพบว่า BA ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่า TDZ (ตารางที่ 9)

Table 8 Effect of ages of fruit and plant growth regulators on callus formation.

plant growth regulators	2 week		4 week		6 week	
	character	frequency	character	frequency	character	frequency
0.5DB	f,cf	++	c,cf	++++	f,cf	+++
0.5D1B	cf	+++	c,f	+++	cf	+++
0.5D2.5B	f	+++	c,f	+++	f,cf	+++
0.5D5B	f,cf	+++	c,f,cf	+++	f	++
1D0.5B	c,f,cf	+++	c,f,cf	++	f,cf	++
1DB	f	++++	f,cf	++	f,cf	++
1D2.5B	f,cf	+++	c,f	++	f	++
1D5B	cf	+++	c,f	++	f,cf	++
2D0.5B	f,cf	+++	f	+	f,cf	++
2D1B	f,cf	+++	f,cf	++	cf	+++
2D2.5B	c,f	+++	c,f,cf	++++	c,f,cf	++
2D5B	f,cf	++++	f,cf	+++	c,f,cf	++
3D0.5B	f	+++	c,f,cf	+++	f	++
3D1B	f	++	c,f	+++	f,cf	++++
3D2.5B	f	+++	c,cf	+++	f	+++
3D5B	f	+++	c,cf	+++	f,cf	++

f : friable callus + 0-25%
 c : compact callus ++ 26-50%
 cf : compact + friable callus +++ 51-75%
 ++++ 76-100%

Table 9 Effect of kinds and concentrations of plant growth regulators on multiplication and maintenance of callus.

2, 4-D	BA	TDZ	0.5BT			2D1B	2D0.1T	
	mg/l		2 wk	4 wk	6 wk	2wk	4 wk	6 wk
0.5	0.5	0.01	18.8	80.0	87.5	57.8	62.5	53.3
0.5	1	0.05	56.3	70.0	67.8	59.4	25.0	17.0
0.5	2.5	0.1	43.8	62.5	38.8	44.5	60.0	61.7
0.5	5	0.5	50.0	50.0	45.0	46.4	30.0	42.5
1	0.5	0.01	35.7	73.8	30.0	21.8	41.7	23.3
1	1	0.05	50.0	25.0	25.0	25.0	12.5	26.2
1	2.5	0.1	12.5	100	20.8	37.5	50.0	26.7
1	5	0.5	43.8	70.8	12.5	43.7	25.0	30.0
2	0.5	0.01	37.5	16.7	41.7	17.6	0.0	4.2
2	1	0.05	43.8	35.4	50.0	40.9	12.5	25.0
2	2.5	0.1	57.0	34.5	22.3	37.5	27.9	18.3
2	5	0.5	22.5	35.0	12.5	43.8	42.5	35.0
3	0.5	0.01	6.25	17.5	0.0	37.5	30.0	18.8
3	1	0.05	16.7	12.5	0.0	46.9	5.0	17.1
3	2.5	0.1	0.0	17.5	16.7	21.9	10.0	55.0
3	5	0.5	0.0	52.5	10.0	18.8	54.2	10.0
average			32.0	50.9	30.0	39.3	27.2	31.9

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเปรียบเทียบการสร้างแคลลัสของพืชตระกูล *Garcinia* ทั้ง 3 ชนิด คือ มังคุด พะวา และส้มแขก โดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารสูตร MS เต็ม BA ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 2) พบว่ามังคุดอายุ 2 สัปดาห์หลังคอกบาน สามารถตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสได้ 96.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ พะวา อายุ 4 สัปดาห์หลังคอกบาน สร้างแคลลัสได้สูงสุด 74.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนส้มแขก ไม่ตอบสนองต่อการสร้างแคลลัส ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้าง

แคลลัสของมังคุด 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังคอกบาน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เต็ม 2, 4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 4, 5) หลังเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่ามังคุดสามารถสร้างแคลลัสได้ใกล้เคียงกันในทุกอายุและทุกความเข้มข้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารสูตร MS เต็ม 2, 4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ ลักษณะแคลลัสเป็นแบบร่วนเปราะ และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารสูตร MS เต็ม 2, 4-D ร่วมกับ TDZ ลักษณะเป็นแบบ compact แสดงว่าชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อลักษณะแคลลัสที่สร้างจากเมล็ดมังคุด นอกจากนี้ยังขึ้นกับความเข้มข้นของสารควบคุม

การเจริญเติบโตที่เดิมในอาหารและที่มีในพืชเอง ทำให้มีการตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสได้ ลักษณะที่แตกต่างกัน

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดบนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการปลดปล่อยสารฟีนอลทำให้อาหารมีสีน้ำตาล เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ชิ้นส่วนเมล็ดจากมังคุดอายุ 6 สัปดาห์หลังดอกบานซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เดิม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด 0.65 เช่นเดียวกับผลมังคุด อายุ 2 สัปดาห์หลังดอกบานที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เดิม 2, 4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด 0.64 แสดงว่าอาหารทั้งสองสูตรเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดเนื่องจากการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลสู่อาหารในปริมาณน้อย จากการทดลองพบว่าในอาหารที่มีการปลดปล่อยของสารฟีนอลในปริมาณสูง คือ อาหารสูตร MS เดิม 2,4-D เข้มข้นสูง 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ TDZ ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงซึ่งมีผลต่อการสร้างแคลลัสทำให้ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด โดยทั่วไปเมื่อเมล็ดกำลังพัฒนามีการสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูปของออกซินในปริมาณสูงเพื่อการพัฒนาของผล ดังนั้นการเติม BA ความเข้มข้นค่อนข้างสูง (5 มก/ล) ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นการปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองให้มีความเหมาะสมต่อการสร้างแคลลัส โดยเฉพาะชิ้นส่วนเมล็ดที่มาจาก

จากผลที่มีอายุมาก (6 สัปดาห์) อย่างไรก็ตามในกรณีของการใช้ TDZ พบว่าการเติมออกซินลงในอาหารเลี้ยงในระดับความเข้มข้นสูงส่งผลให้มีการสร้างสารประกอบฟีนอลจำนวนมาก ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าใน TDZ มีส่วนผสมของออกซินอยู่ด้วยจำนวนหนึ่ง ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้การใช้ TDZ เพื่อเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดที่มีอายุมากและมีความเข้มข้นของออกซินสูงอยู่แล้วร่วมกับการเติมออกซินลงไปด้วยก่อให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลจำนวนมาก (ภาพที่ 1) ด้วยเหตุผลดังกล่าว การเพิ่มปริมาณและการดูแลแคลลัสมังคุดในอาหารเติมออกซินมักไม่ประสบผลสำเร็จ ดังรายงานของ Normah (1992) การชักนำแคลลัสเริ่มต้นในอาหารเติมออกซิน หรือปราศจากออกซินแต่มี TDZ ร่วมกับแล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม BA ร่วมกับ TDZ ให้ผลดีทั้งการเพิ่มปริมาณและลดการสร้างสารประกอบฟีนอล (Te-chato *et al.*, 1995a) นอกจาก TDZ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และชักนำแคลลัสแล้วยังมีรายงานว่าส่งเสริมการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินในใบมังคุด ซึ่งรงควัตถุดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์ (Te-chato *et al.*, 1995b) เช่นเดียวกับการศึกษานี้พบว่า การย้ายเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนเมล็ดไปดูแลรักษาในอาหารสูตร MS เดิม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากันให้ผลดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร MS เดิม 2, 4-D ร่วมกับ BA หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 9) สำหรับระยะพัฒนาการของผลนั้นพบว่าผลมังคุดอายุ 4 สัปดาห์หลังดอกบานให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงสุด 50.9 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสดังกล่าวสามารถดูแลรักษาจนมีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

เอกสารอ้างอิง

- เต็ม สมิตินันท์ 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.
กรุงเทพฯ: กรมป่าไม้.
- สมปอง เตชะโต. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด
(*Garcinia mangostana* L.) พะวา (*Garcinia
speciosa* all.) และส้มแขก (*Garcinia atroviridis*
Griff.) ว. สงขลานครินทร์. 19 : 147 - 156.
- สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และมณฑา จำเริญรักษ์.
2538. การต่อกิ่งมังคุดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
บนดินตอพะวานอกหลอดทดลอง. ว. สงขลา-
นครินทร์. 17 : 245 - 250.
- สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และอรุณี ม่วงแก้วงาม.
2535. การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการเพาะเลี้ยง
ใบอ่อนมังคุดในหลอดทดลองเพื่อการขยายพันธุ์.
ว. สงขลานครินทร์ 14 : 1 - 7.
- สมปอง เตชะโต และนันทนา เอ็งย่อง. 2531. การขยาย
พันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว.
สงขลานครินทร์ 10 : 7 - 11.
- Goh, C. J., Lakshmanan, P and Loh, C.S. 1994. High
frequency direct shoot bud regeneration from
excised leaves of mangosteen (*Garcinia
mangostana* L.). Plant Science 101 : 173 - 180.
- Lim, M., T. Hemapat, W. Wanachit and P. Suwankiri
1986. Survey and collection of *Lansium* and
Garcinia in Southern Thailand. IBPGR Newsletter
10 : 10 - 12.
- Normah, N.M. 1992. Micropropagation of mangosteen
(*Garcinia mangostana* L.) through callus and
multiple shoot formation. In Biotechnology for
Forest Tree Improvement. (eds R.C. Ummaly, S.S.
Tjitrosomo and N.M. Normah) pp. 81 - 86, Borgor
: Seameo Biotrop.
- Normah, N. M., A.B. Nor - Azza and R. Aliudin. 1995.
Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and
ex vitro establishment of mangosteen. Plant Cell,
Tissue and Organ Culture 43 : 291 - 294.
- Te-chato, S., M. Lim and P. Suranilpong. 1995a.
Embryogenic callus induction in mangosteen
(*Garcinia mangostana* L.) Songklanakarin J. Sci.
Technol. 17 : 115 - 120.
- Te-chato, S., Lim, M. and P. Suranilpong. 1995b. Types
of medium and cytokinins in relation with purple
leaf and callus formation of mangosteen.
Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 121 - 127.