

ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหาร ระยะเวลากการเติม
และไซโตไคนินต่อการพัฒนาของตายอดใหม่
การสร้างใบสีม่วงแดงและแคลลัส

Effect of Culture Medium Concentration
Times of Overlay and Cytokinins on Development of
New Shoot Buds Purplish Red Leaf and Callus Formation

เรียมอรุณ รักเผือก^๑ และสมปอง เตชะโต^๒
Rermarun Rakphurk^๑ and Sompong Te-Chato^๒

Abstract : In order to study development of mangosteen leaves for callus formation subsequently a high frequency of plantlet regeneration, preparation of the leaves was carried out using two-phase culture media. Lower phase medium was woody plant (WPM) medium supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l polyvinylpyrrolidone (PVP) and 0.1 mg/l benzyladenine (BA). Upper phase medium or overlay medium was liquid Murashige and Skoog (MS) reduced the components to various concentrations and overlayed at various periods of culture. Moreover, we also study the effect of kinds of cytokinins on development of new shoots, shoot length, purplish red leaf and callus formation. It is found that liquid 1/2MSNB (MS which was reduced the components to a half strength of origin and supplemented with 3% sucrose, 0.06 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.03 mg/l BA) gave the best results in increment of new shoot buds and purplish red leaf formation. Period of culture shoot clump on WPM for 2 weeks followed by overlay the liquid medium gave the best results in increment of new shoot buds, shoot length and purplish red leaf formation. Between cytokinin tested 1/2MSNB (both BA and thidiazuron, TDZ at the same concentration of 0.03 mg/l) provided the best formation of both purplish red leaves and callus.

^๑ ภาควิชาพืชสวน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90110

^๒ Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkhla University, Hat-Yai Campus, Songkhla 90112, Thailand.

บทคัดย่อ : การศึกษาเกี่ยวกับพัฒนาการของใบที่ให้การสร้างแคลลัส และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์มังคุด ได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมใบอ่อน โดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มตาช่อรวมมังคุดในอาหารสองชั้น ชั้นล่างเป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (Woody Plant Medium, WPM) เติมนูโครส 3% โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP) 500 มก./ล. และเบนซิลอะดีนีน (BA) 0.1 มก./ล. ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรมูราชิเกะและสกุค (MS) ที่ระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบที่แตกต่างกันเติลงบนอาหารชั้นล่างเป็นระยะเวลาต่างกัน และยังศึกษาถึงผลของชนิดไซโตไคนินที่มีต่อการพัฒนาของช่อใหม่ ความยาวของช่อ การสร้างใบสีแดง พื้นที่ใบ และการสร้างแคลลัส จากการศึกษาพบว่า อาหารเหลวสูตร 1/2MSNB (MS ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ (1/2MS) เติมกรดแนปธาซีนอะซิติก (NAA) เข้มข้น 0.06 มก./ล. และ BA เข้มข้น 0.03 มก./ล.) ให้การเพิ่มช่อใหม่และการสร้างใบอ่อนสีแดงได้ดีที่สุดระยะเวลาการเดิมอาหารนี้ลงบนอาหาร WPM หลังการเพาะเลี้ยงกลุ่มตาช่อรวมไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้ผลดีที่สุดทั้งการเพิ่มปริมาณช่อใหม่ ความยาวช่อ และการสร้างใบอ่อนสีม่วงแดง สำหรับชนิดของไซโตไคนินนั้นพบว่า 1/2MSNB (การเติม ทั้ง BA และไทอะอะซูรอน (TDZ) ความเข้มข้น 0.03 มก./ล. เท่ากัน) ให้ใบอ่อนสีม่วงแดงและการสร้างแคลลัสจากใบดังกล่าวได้สูงที่สุด

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุดเพื่อการขยายพันธุ์นั้น ทำได้ 3 วิธีด้วยกัน คือ การเพาะเลี้ยงเมล็ด (Goh *et al.*, 1988; สมปอง และวันทนา 2531; Normah *et al.*, 1955) การเพาะเลี้ยงใบอ่อนแล้วชักนำการสร้างตาช่อโดยตรง (Goh *et al.*, 1990; Goh *et al.*, 1994; สมปอง และคณะ, 2535) และการเพาะเลี้ยงแคลลัส (Te-chato *et al.*, 1955a) เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 วิธีการข้างต้นแล้วพบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นวิธีการที่มีความเหมาะสมที่สุดเพราะสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากอย่างต่อเนื่อง และทำได้ตลอดทั้งปี ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแคลลัสจากใบอ่อนนั้นมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาในขั้นต้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างแคลลัส หากมีการเตรียมใบที่ดีช่วยให้การสร้างแคลลัสเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว และมีจำนวนมากด้วย การขยายพันธุ์ด้วยแคลลัสในระยะเวลาต่อมาก็จะเป็นไปได้ดี ดังนั้นในการ

ศึกษานี้จึงได้รายงานวิธีการเตรียมใบโดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มตาช่อในอาหารสองชั้น ดัดแปลงอาหารชั้นบน โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหาร และศึกษาระยะเวลาในการเดิมอาหารชั้นบน ตลอดจนการศึกษาของไซโตไคนินที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณตาช่อใหม่ การสร้างใบอ่อนสีม่วงแดงที่นำมาใช้ชักนำแคลลัสและการสร้างแคลลัสจากใบดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ใช้กลุ่มตาช่อซึ่งชักนำจากใบอ่อนสีม่วงแดงที่วางเลี้ยงในอาหารชักนำตาช่อ (Shoot Primordia Induction Medium, SPIM) ตามวิธีการที่รายงานโดย Te-chato and Lim (1996) เป็นเวลา 1 ปี ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 6-8 สัปดาห์

อาหารเพาะเลี้ยง

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษามี 2 สูตรด้วยกัน คือ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (Woody Plant Medium, WPM) และสูตรอาหารมูราชิเกะและสโกก (Murashige and Skoog, MS) ดัดแปลงโดยการปรับลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงตามสัดส่วน และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ในกรณีที่เป็นอาหารแข็งเติมวุ้นไฟต้าเจลเข้มข้น 0.15% (สำหรับสูตรอาหาร MS) และเข้มข้น 0.3% (สำหรับสูตร WPM)

สภาพแวดล้อมการเลี้ยง

ทำการวางเลี้ยงในสภาพที่มีการควบคุมความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22-30°C

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาความสามารถในการสร้างใบสีม่วงแดง การสร้างแคลลัส การเจริญเติบโต ตลอดจนค่าตัวแปรอื่นๆ ทำการศึกษาแยกกันในแต่ละค่าตัวแปร และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

วิธีการศึกษา

1. ผลของระดับความเข้มข้นของอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนายอดและใบสีม่วงแดง

นำกลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงบนอาหารชักนำตายอดเป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ มาแยกเป็นกลุ่มย่อยๆ แต่ละกลุ่ม ประกอบด้วยตายอด 5 ตา ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ สูตรเดิม ปริมาณ 20 มล. ซึ่งบรรจุ

อยู่ในขวดขนาด 50x100 มม. วางเลี้ยงภายใต้สภาพการเลี้ยงข้างต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารครบ (MS) สูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง 1/4(3/4MS) สูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง 1/2(1/2MS) สูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง 3/4(1/4MS) แต่ละระดับความเข้มข้นของสูตรอาหารเติมกรดแนปทาไลน์อะซิติก (NAA) 0.06 มก./ล. ปริมาตรอาหารเหลวที่ใช้เดิม 10 มล. สำหรับหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ไม่มีการเติมอาหารเหลวหลังวางเลี้ยงภายใต้สภาพการเลี้ยงข้างต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนตายอดเฉลี่ย และการสร้างใบสีม่วงแดงเปรียบเทียบกัน

2. ผลของระยะเวลาการเติมอาหารเหลวต่อการพัฒนาของยอดและใบสีม่วงแดง

ใช้กลุ่มตารวมในลักษณะเดียวกับที่อธิบายในการศึกษาที่ 1 นำกลุ่มตารวมไปเลี้ยงเป็นเวลา 0 (เดิมทันทีที่ย้ายเลี้ยง), 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวสูตร 1/2MS ซึ่งมี NAA เข้มข้น 0.06 มก./ล. BA เข้มข้น 0.03 มก./ล. ปริมาตร 10 มล. ลงไป หลังจากเติมอาหารลงไปแล้ววางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนตายอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น ความยาวยอดเฉลี่ยและการสร้างใบสีม่วงแดง เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาการเติมอาหารเหลว

3. ผลของไซโตไคนินต่อการพัฒนายอดและการสร้างใบสีม่วงแดง

นำกลุ่มตารวมมาตัดแบ่งเป็นกลุ่มเล็กๆ ประกอบด้วยตายอด 5 ยอด ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำตายอดหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงเติมอาหารสูตรเหลวสูตร 1/2MS ซึ่งมี

NAA เพิ่มขึ้น 0.06 มก./ล. ร่วมกับ BA (1/2MSNB) หรือ ไซโคอะซุรอน (TDZ) (1/2MSNT) หรือ BA ร่วมกับ TDZ (1/2MSNBT) เพิ่มขึ้นอย่างละ 0.03 มก./ล. หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบจำนวนและความยาวชอด พื้นที่ใบ และการสร้างใบสีม่วงแดงเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของไซโตไคนิน หน่วยทดลองเปรียบเทียบคือการเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว (WPM)

4. ผลของสูตรอาหารที่เตรียมเลี้ยงกลุ่มตาชอดต่อการสร้างแคลลัสจากใบอ่อนสีแดง

ใช้ใบอ่อนสีม่วงแดงอายุ 1-2 สัปดาห์จากชอดที่เตรียมเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ WPM, 1/2MSNB, 1/2MSNT และ 1/2MSNBT นำมาวางเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัส (Te-chato and Lim, 1996) ซึ่งปัจจุบันอยู่ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกฆ่าเชื้อขนาด 15x90 มม. จานละ 50 ใบในการวางเลี้ยงนั้นให้ด้านหลังใบสัมผัสอาหาร ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์มนำไปเลี้ยงในสภาพการเลี้ยงข้างต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงตรวจสอบการสร้างแคลลัสเปรียบเทียบกันจากใบสีม่วงแดง ซึ่ง เตรียมเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของระดับความเข้มข้นของอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนายอดและใบสีม่วงแดง

ผลจากการเติมอาหารเหลวสูตร MS ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติม NAA เพิ่มขึ้น 0.06 มก./ล. BA เพิ่มขึ้น 0.03 มก./ล. ลงไปบนอาหารสูตรชักนำตาชอด พบว่า อาหารเหลวสูตร 1/2MS ให้จำนวนตาชอดที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด 7.2 ชอดต่อกลุ่มตารางรวม รองลงมาคือ สูตร 1/4MS แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเติมอาหารเหลวสูตร 3/4MS และสูตรอาหารชักนำตาชอดที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว (ภาพที่ 1) ในทำนองเดียวกันกับความยาวชอดเฉลี่ยและการสร้างใบสีม่วงแดง พบว่า สูตรอาหาร 1/2MS ให้ความยาวชอดสูงสุด 3.88 มม. และการสร้างใบสีม่วงแดง 40% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 1)

2. ผลของระยะเวลาการเติมอาหารเหลวต่อการพัฒนายอดและใบสีม่วง

ผลการเติมอาหารเหลวสูตร 1/2MSNB ลงบนอาหารชักนำตาชอดที่เพิ่มโดยเฉลี่ยสูงสุดที่ 7.5 ชอดต่อกลุ่มตารางรวม และที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ให้จำนวนชอดที่เพิ่มขึ้น 7.4 ชอด การเติมอาหารเหลวเร็วหรือช้ากว่านี้ ส่งผลให้จำนวนชอดที่เพิ่มขึ้นลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2) ในทำนองเดียวกันกับความยาวชอด และการสร้างใบสีม่วงแดงพบว่าที่ระยะเวลาการเติมอาหารเหลว 2 สัปดาห์ หลังการเลี้ยงให้ความยาวชอด และการสร้างใบสีม่วงแดงสูงสุดที่ 4 มม. และ 37% ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

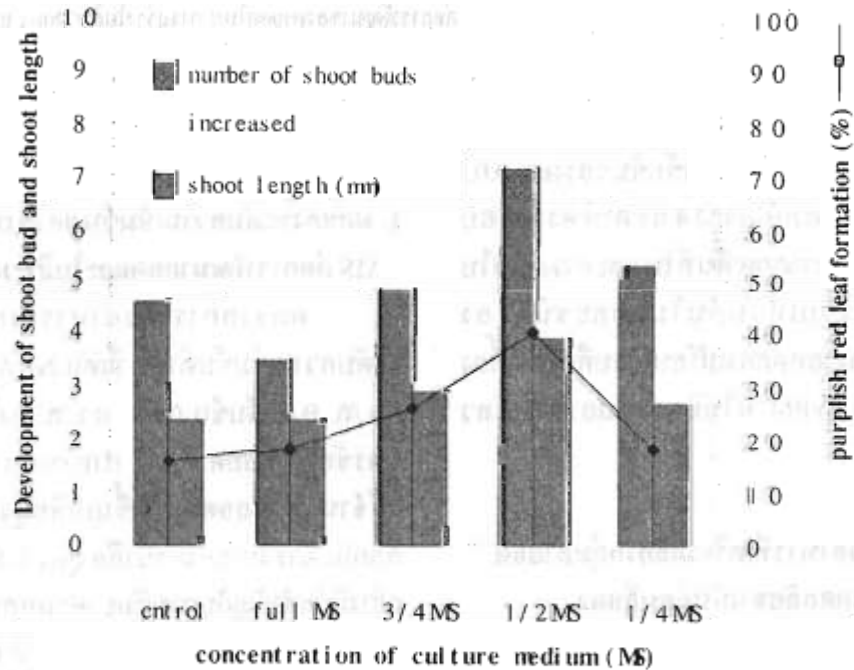


Figure 1 Effect of concentrations of MS medium on development of shoot buds, shoot length and purplish red leaf formation.

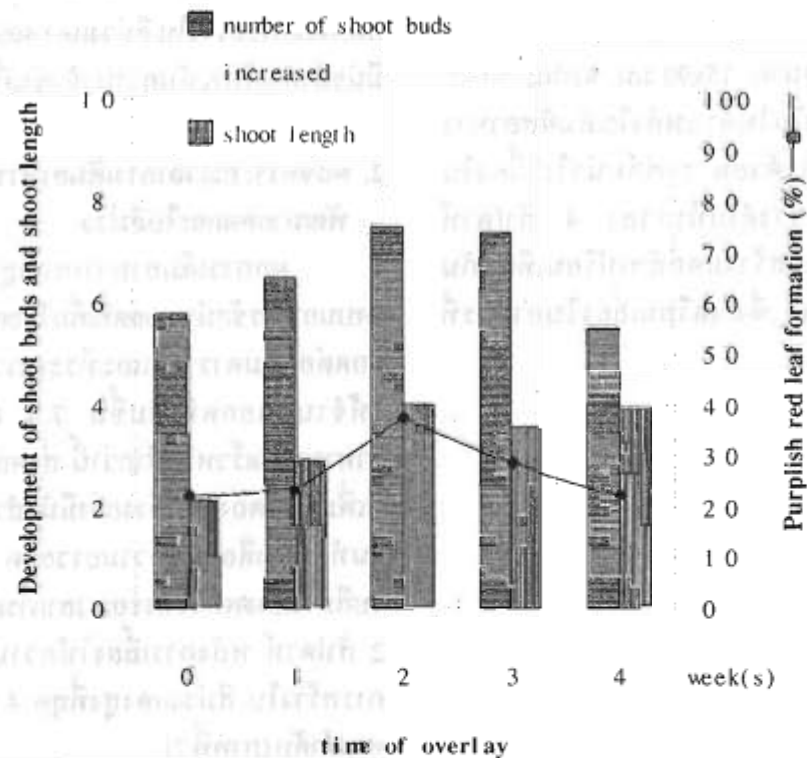


Figure 2 Effect of various times of overlay with half strength liquid MS medium containing 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA on development of shoot buds, shoot length and purplish red leaf formation.

3. ผลของไซโตไคนินต่อการพัฒนายอดและ การสร้างใบสีม่วงแดง

จากการเติมอาหารเหลวที่มีไซโตไคนินชนิด
ต่างๆ เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกันในระดับความ
เข้มข้นเดียวกับอาหารเหลวที่ใช้เดิมในอาหาร
ชักนำตายอด พบว่า BA ร่วมกับ TDZ ส่งผลให้การ
เพิ่มจำนวนตายอดเฉลี่ยสูงสุด 7.3 ยอด รองลงมา

คือ TDZ ซึ่งให้การเพิ่มตายอด 5.9 ยอด แตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ BA และอาหารชุด
ควบคุมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว (ตารางที่ 1)
แม้ว่า BA ให้ผลการเพิ่มตายอดโดยเฉลี่ยต่ำ แต่
ส่งเสริมการยืดยาวของยอดเฉลี่ยได้ดีที่สุด 3.9 มม.
นอกจากนี้ยังให้พื้นที่ใบสูงสุดด้วย แตกต่างกับ
TDZ, TDZ ร่วมกับ BA และอาหารชุดควบคุม
(ภาพที่ 3)

Table 1 Effect of various kinds of cytokinins containing in 1/2MSN overlay on SPIM on shoot
bud formation and elongation of the shoots.

Cytokinin	Number of shoot buds	Length of the shoots
	increased	
control	4.6 b	2.1 b
BA	4.8 b	3.9 a
TDZ	5.9 ab	2.1 b
BA+TDZ	7.3 a	2.4 b

Means in each column was separated by DMRT.

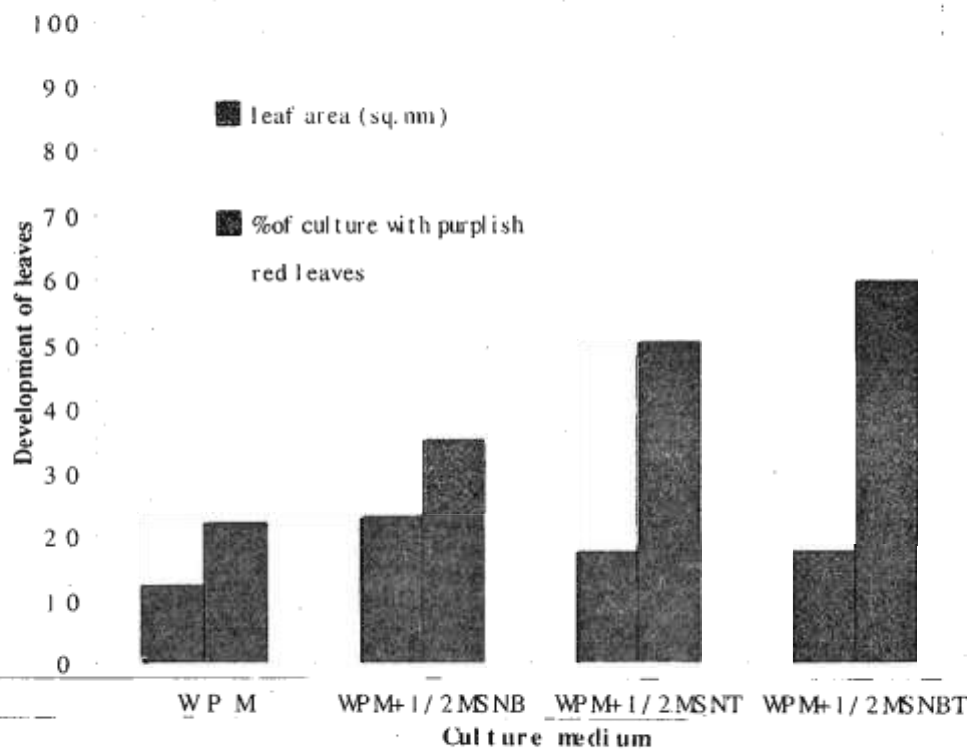


Figure 3 Effect of cytokinins on development of mangosteen leaves.

ในการศึกษาสร้างใบสีม่วงแดงนั้น พบว่าอาหารทุกสูตรซึ่งเติมไซโตไคนินที่แตกต่างกันให้การสร้างใบสีม่วงแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ BA ร่วมกับ TDZ ให้การสร้างใบสีม่วงแดงสูงที่สุด 59.4 % รองลงมาคือ TDZ และ BA ซึ่งให้การสร้างใบสีม่วงแดง 50 และ 35% ตามลำดับ ในขณะที่อาหารชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลวให้การสร้างต่ำที่สุด 21.8% (ภาพที่ 3) เมื่อนำใบสีม่วงแดงจากกลุ่มโดยรวมที่เลี้ยงในอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว

มีผิวใบเรียบ เส้นกลางใบขนาดใหญ่ เส้นใบย่อยมองเห็นไม่ชัดเจน (ภาพที่ 4a) ใบที่พัฒนาในอาหาร 1/2MSNB มีลักษณะอวบหนา เส้นกลางใบขนาดใหญ่และมองเห็นชัดเจนแผ่นใบมีสีเหลืองอมเขียว บริเวณขอบใบมีสีม่วงแดง (ภาพที่ 4b) ในขณะที่ใบในอาหาร 1/2MSNT มีสีม่วงแดงเข้มกระจายทั่วทั้งแผ่นใบ (ภาพที่ 4c) ส่วนใบในอาหาร 1/2MSNBT มีปลายใบและขอบใบสีม่วงแดง ส่วนโคนใบมีสีเขียว (ภาพที่ 4d)

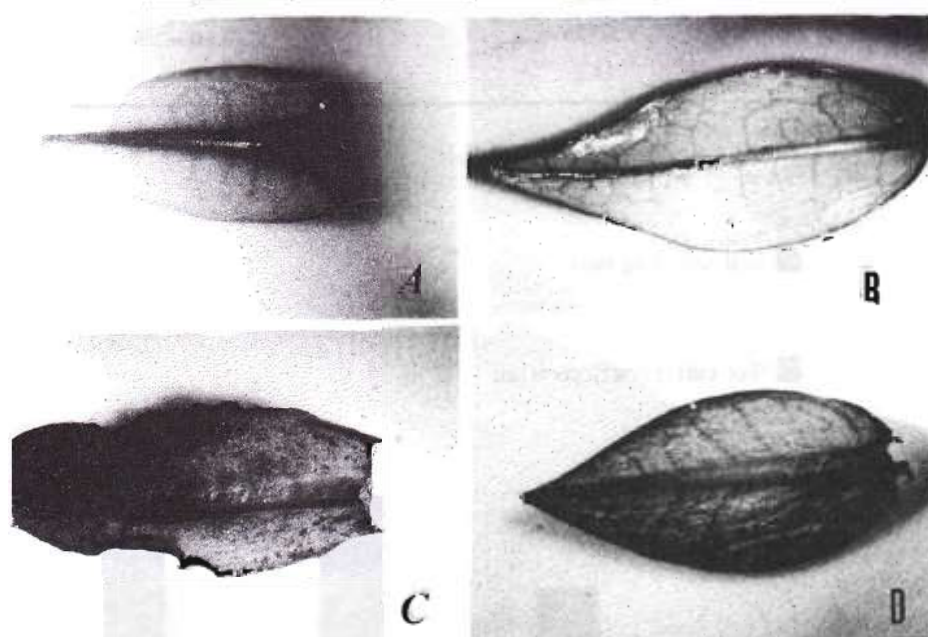


Figure 4 Anthocyanin formation patterns in young leaves of mangosteen cultured in two-phase medium overlay with 1/2MS containing different cytokinin

(A: WPM without overlay, B: 1/2MSNB, C: 1/2MSNT and D: 1/2 MSNBT).

Table 2 Effect of preculture medium on callus formation from purplish red leaves.

Leaf position	Callus formation (%)			
	Not overlay	1/2MSNB	1/2MSNT	1/2MSNBT
proximal (P)	75	57.2	38.5	42.5
midrib (M)	4	3.5	26	14.5
distal (D)	0	0.8	0	0.5
laminal (L)	0	0.4	0.5	0
P+M	0	16.4	15	32
P+D	1	6	1	3
P+L	1.5	3.2	1.5	1
P+M+D	0	1.6	1	3.5
P+M+D+L	0	0.4	0	0
Total	81.5 b	89.6 ab	83.5 b	97 a

Means within row was separated by DMRT

4. ผลของสูตรอาหารที่เตรียมเลี้ยงกลุ่มตาขอดต่อการสร้างแคลลัสจากใบอ่อนสีแดง

จากการชักนำแคลลัสของใบมั่งคุดจากกลุ่มตาขอดที่เตรียมเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร พบว่าใบจากกลุ่มตาขอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MSNB ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 97% รองลงมา คือ สูตร 1/2MSNB และ 1/2MSNBT ซึ่งให้การสร้างแคลลัส 89.6 และ 83.5% ตามลำดับ ส่วนใบจากอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลวให้การสร้างแคลลัสต่ำสุด 81.5% (ตารางที่ 2)

ใบจากอาหารทุกสูตรให้การสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดบริเวณโคนใบเป็นไปในทำนองเดียวกัน อย่างไรก็ตามบางใบมีการสร้างแคลลัสได้มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง โดยเกิดทั้งบริเวณโคนใบ และเส้นกลางใบหรือโคนใบกับปลายใบ นอกจากนี้ อาจพบการสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบอีกด้วย แคลลัสที่สร้างจากโคนใบ เส้นกลางใบและแผ่นใบ

จากใบที่เตรียมเลี้ยงกลุ่มตาขอดรวมในอาหาร 1/2MSNT และ 1/2MSNBT มีสีเขียวอมเหลือง เกาะตัวกันแน่น (compact) สามารถพัฒนาให้โนดูลาแคลลัสที่พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไปได้ ในขณะที่ใบสีม่วงแดงในอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลวให้แคลลัสสีน้ำตาล โครงสร้างเกาะกันหลวมๆ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณและพัฒนาให้โนดูลาแคลลัสได้และตายในที่สุด

Te-chato and Lim (1996) รายงานการส่งเสริมการยึดยาวของตาขอดมั่งคุดในอาหารชักนำการยึดยอด ซึ่งเป็นสูตรอาหาร 1/2MSNB สูตรดังกล่าวมีประสิทธิภาพทำให้ยอดมีการยึดยาวได้รวดเร็ว ยอดที่ยึดยาวมีขนาดเหมาะสมที่จะนำไปชักนำรากเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมที่จะปลูกได้ เช่นเดียวกับรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ผลบางชนิด เช่น hazel nut (Diaz-Sala *et al.*, 1990) chestnut (Chauvin and Salesses, 1988) สาลี่ พันธุ์ Abate Fetel (Rodriguez *et al.*, 1991) แอปเปิ้ลพันธุ์ Gala (Lopes *et al.*, 1992) ส้ม satsuma

cv. Aoshima Unshiu และ tangor cv. Kiyomi (Omura and Hidaka, 1992) และไม้ดอกบางชนิดและพืชยืนต้น (de Riek *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1992; Bach and Cecot, 1988, 1989) ที่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณจำนวนยอดและการยืดยาวของยอดโดยเฉพาะสารอนินทรีย์ที่เป็นเกลือแร่ต่ำกว่าสูตรปกติที่ใช้ในการชักนำยอดในช่วงแรก ในทำนองเดียวกับการศึกษานี้พบว่า การยืดยาวของตา ยอด และพื้นที่ใบในการศึกษานี้เป็นไปได้ดีในอาหารสูตร 1/2MSNG การเติมอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงมากกว่าครึ่งหนึ่งก็มีธาตุอาหารต่ำเกินไปไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณตา ยอด นอกจากนี้ การใช้สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารครบ อาจมีไนโตรเจนสูงเกินไป โดยเฉพาะไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย ในขณะที่สูตรอาหาร WPM มีองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจนต่ำเกินไปไม่เพียงพอต่อการชักนำยอดเช่นเดียวกับที่รายงานโดย Normah *et al.* (1995) Gavidia and Perez-Bermudez (1997) รายงานผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก และแหล่งของไนโตรเจนว่ามีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสร้างสารคาร์ดิโนไลด์ (cardenolide) ในการเพาะเลี้ยง *Digitalis obscura* พันธุ์ T4 และสารตัวนี้มีผลส่งเสริมการเพิ่ม จำนวนยอดรวม de Fiek *et al.* (1996) ศึกษาการดูดน้ำตาลและกระบวนการเมตาโบลิซึมจากการเพาะเลี้ยงกุหลาบในอาหารสองชั้นและพบว่า น้ำตาลซูโครสเป็นปัจจัยหลักที่มีการดูดซับและส่งเสริมการเพิ่มปริมาณยอด ในกรณีที่ซูโครสไม่เพียงพอก็มีการดูดน้ำตาลเฮกโซสเข้ามาแล้วเปลี่ยนเป็นน้ำตาลซูโครสต่อไป ดังนั้น ในอาหารชักนำตา ยอดที่ไม่มีการเติมอาหารเหลวจึงให้อัตราการเพิ่มจำนวนยอดต่ำกว่าการเติมอาหารเหลว Vinterhalter and Neskovic (1992)

รายงานว่า การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารชั้นบนที่เป็นอาหารเหลวซึ่งใช้เลี้ยงลง ส่งผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการเพาะเลี้ยงชั้นส่วนปลายยอดคินซ์ (*Cydonia oblonga* Mill) ลดลง นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการสร้างรากด้วยสำหรับการเพาะเลี้ยงใบหรือแคลลัสมิ่งกูด ในอาหารแข็งในการศึกษานี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ และส่งเสริมการยืดยาวของยอดได้ไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS หรือ WPM เพียงลำพัง การใช้สูตรอาหารทั้งสองร่วมกัน แต่สภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นการเลี้ยงสองชั้นชั้นล่างเป็น WPM และชั้นบนเป็นอาหารเหลว 1/2MSNB ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณยอดได้อย่างดี

เวลาการเติมอาหารเหลวลงบนอาหารชักนำตา ยอดมีความสำคัญ และมีผลส่งเสริมการสร้างยอด และการยืดยาวของตา ยอดเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าไม่มีการศึกษาในลักษณะเช่นนี้ในพืชอื่นมาก่อนก็ตาม การศึกษานี้เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าการเติมอาหารเหลวลงไปพร้อมกับการย้ายเลี้ยงแคลลัส/กลุ่มตา ยอดหรือเดิมหลังการเลี้ยงนานกว่า 2 สัปดาห์ ให้ผลน้อยกว่าการเติมที่อายุ 2 สัปดาห์หลังการเลี้ยง ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะการเจริญและพัฒนาการของตา ยอด/จุดกำเนิดตา ยอดในช่วงแรกต้องการธาตุอาหารเพียงน้อยๆ และค่อยเป็นค่อยไป นอกจากนี้ในช่วงแรกอาจมีแผลที่เกิดจากการตัดเมื่อเติมอาหารเหลวที่มี NAA ลงไปอาจส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอลทำให้ทั้งกลุ่มตา ยอดที่เลี้ยงและอาหารเกิดสีน้ำตาล (browning) เมื่อพัฒนาการเต็มทีในช่วง 2 สัปดาห์ต่อมาต้องการธาตุอาหารมากขึ้น โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์แสง สะสมสารสังเคราะห์นำไปใช้

เพื่อการพัฒนาของยอดใหม่ การยืดยาวของยอด และการพัฒนาการของใบ (แสดงในรูปของพื้นที่ใบ) หากเลยระยะนี้แล้วยังไม่ได้รับธาตุอาหารทำให้ยอดและตาของที่พัฒนาจะงักการเจริญเติบโต แม้ว่าจะให้อาหารในระยะต่อมา อัตราการคุดนำไปใช้ประโยชน์ลดลงหรือเป็นไปอย่างช้า

ไซโตไคนินที่ใช้เติมลงในอาหารมีผลส่งเสริม การสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินในใบ ได้แตกต่างกัน Te-chato *et al.* (1995b) รายงานว่า TDZ เป็นไซโตไคนิน ที่มีผลส่งเสริมการสร้างรงควัตถุดังกล่าวได้ดี เซลล์ผิวใบ และเซลล์มัดท่อน้ำ ท่ออาหารที่เลี้ยงในอาหารเหลวเติม TDZ มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ BA อย่างไรก็ดีตามในการศึกษานี้พบว่า TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.03 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างใบสีแดง และกิจกรรมการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่า BA หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว แม้ว่ามีรายงานจำนวนมากถึงการใช้ TDZ ชักนำการสร้างแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คลอดจนพืชต้นใหม่ โดยกระบวนการออกาโนเจนิซิส (Huetteman and Preece, 1993) แต่ในรายงานดังกล่าวไม่ได้กล่าวถึงผลของ TDZ ต่อการสร้างแอนโทไซยานินเลย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่พืชในรายงานข้างต้นไม่มีการสร้างและสะสมสารนี้เป็นจำนวนมากในขณะที่ยังอ่อนอยู่ Komamine (1992) รายงานว่าการสร้างและสะสมสารนี้ มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในระยะต่อมา Pawlicki and Welandar (1994) รายงานว่าการเตรียมต้นแม่ในที่เย็น และมีดร่วมกับการใช้ธาตุอาหารหลักของสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 22 μ M NAA เข้มข้น 0.1 μ M ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำพืชต้นใหม่

จากการเพาะเลี้ยงใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอด ในหลอดทดลองของแอปเปิ้ล พันธุ์ Jork 9 ในการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาการเตรียมยอดมั่งคุด ด้วยวิธีการที่กล่าวข้างต้น การเตรียมเลี้ยงกลุ่มตาของในอาหารสองชั้นชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% และ PVP 500 มก./ล. อาหารชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2MSNT หรือ 1/2MSBNT ก็เป็นการเพียงพอต่อการเตรียมใบที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจำนวนมากและเป็นแคลลัสที่สามารถเพิ่มปริมาณเหมาะต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จำนวนมากต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สมปอง เดชะโต และวันทนาเอียงย่อง. 2531. การขยายพันธุ์ มั่งคุดจำนวนมาก โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. สงขลานครินทร์ 10 : 7-11.
- สมปอง เดชะโต, มงคล แซ่หลิม และอรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อน มั่งคุดในหลอดทดลองเพื่อการขยายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ 14 : 353-359.
- Bach, A. and A. Cecot. 1988. Micropropagation of *Hyacinthus orientalis* cv. Carnegie in double-phase culture medium. I Effect of cytokinins on growth and development. *Acta-Horticulturae* 226 : 607-610.
- Chauvin, J.E. and G. Salesses. 1988. Some aspects of the *in vitro* culture of chestnuts (*Castanea* sp.). Septieme Colloque sur les Recherches Fruitiere, 2-3 december 1987, Bordeaux.
- de Riek, J., A. Piqueras and P.C. Debergh. 1996. Sucrose uptake and metabolism in double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47:269-278.

- Diaz-Sala, C., M. Rey and R. Rodriguez. 1990. *In vitro* establishment of cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23 : 151-157.
- Gavidia, I. and P. Perez-Bermudez. 1997. *Digitalis obscura* cardenolides. Effect of macronutrient concentration and N source on growth and productivity of shoot-tip cultures. Phytochemistry 46 : 273-278.
- Goh, C.J., P. Lakshmanan and C.S. Loh. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Plant Science 101 : 173-180.
- Goh, H.K.L., A.N. Rao and C.S. Loh. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Ann. Bot. 62 : 87-93.
- Goh, H.K.L., A.N. Rao and C.S. Loh. 1990. Direct shoot bud formation from leaf explants of seedlings and mature mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) trees. Plant Science 68 : 113-121.
- Huetteman, C.A. and J.E. Preece. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 105-119.
- Komamine, A., R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, A. Fujiwara, M. Tsukahara, J. Smith, M. Ito, H. Fukuda, K. Nomura and T. Fujimura. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures : physiology, biochemistry and molecular biology. *In vitro* Cell Dev. Biol. 28:11-14.
- Lopes, L., F. Ribas and F. Zanette. 1992. Propagation of apple cv. Gala by meristem culture. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 4:39-43.
- Normah, M.N., 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.
- Omura, M. and T. Hidaka. 1992. Shoot tip culture of citrus. I. Culture conditions. Bulletin of the Fruit Tree Research Station 22 : 23-26.
- Pawlicki, N. and M. Welander. 1994. Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of apple rootstock Jork 9. Journal of Horticultural Science 69 : 687-696.
- Rodriguez, R., C. Diaz-Sala, L. Coluozzo and G. Ancora. 1991. Pear *in vitro* propagation using double-phase culture system. Hort Science 26 : 62-64.
- Romano, A., C. Noronha and M.A. Martins-Loucao. 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. Ann. Bot. 70 : 531-536.
- Te-chato, S. and M. Lim. 1996. Micropropagation of mangosteen through young leaf culture. Proceeding of the 13th Conference on Methodological Techniques in Biological Sciences. Central Laboratory and Greenhouse Comple. pp. 55-64.
- Te-chato, S., M. Lim and P. Suranilpong. 1995a. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 129-136.
- Te-chato, S., M. Lim and P. Suranilpong. 1995b. Type of medium and cytokinins in relation with purple leaf and callus formation of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 121-127.
- Vinterhalter, B. and M. Neskovic. 1992. Factors affecting *in vitro* propagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill). J. Hort. Sci. 67 : 39-43.