

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อชิ้นส่วนยอดมะคัง (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) ในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Plant Growth Regulators on *in vitro* Shoot Tip of Maa-kang (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer)

วราพร วีระพลการ¹



บทคัดย่อ

ชิ้นส่วนยอดของมะคัง (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 2, 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด มีการเกิดยอด 60 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.4 ยอด ความยาวเฉลี่ย 1.29 เซนติเมตร ในทุกสูตรอาหารไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น เมื่อนำส่วนยอดของมะคังมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี sodium sulfate (Na_2SO_4) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารทุกสูตรที่มี 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยสูตรที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะแข็ง เกาะตัวกันแน่น สีขาวปนเขียว และมีแคลลัสเกาะตัวกันหลวมๆ สีเหลือง ขนาดเล็กๆ อยู่ด้านบน

คำสำคัญ: สารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพปลอดเชื้อ มะคัง

ABSTRACT

The *in vitro* shoots of Maa-kang (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); 0, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/l in combination with Benzyladenine (BA); 0, 2, 4, and 6 mg/l, for 4 weeks. BA at 2 mg/l was the most effective in shoots induction (60 %) and gave the highest average shoot number of 2.4 with 1.29 cm. in length. There was no callus in every treatment. According to callus induction, shoots of Maa-kang were cultured on modified MS medium, added with 100 mg/l sodium sulfate (Na_2SO_4) and 5% sucrose, supplemented with 0, 0.1, 0.3, 0.5 and 1.0 mg/l 2,4-D, for 6 weeks. Callus was induced on all of the media added with 2,4-D. Significant differences were observed between the treatments. The highest volume of callus was found on the medium added with 1 mg/l 2,4-D. The physical characteristics were white and green compact with a few yellow friable calli on the top of callus surface.

Keywords: growth regulators, *in vitro*, *Vitex scabra*

¹ อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

บทนำ

มะคัง (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) จัดอยู่ในวงศ์ Verbenaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้มีประมาณ 100 สกุล 2,600 ชนิด และมีจำนวนมากที่มีความสำคัญในด้านสรรพคุณทางสมุนไพร (Chandramu, 2003; Sahoo and Chand, 1998) มะคังเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง เป็นพืชประจำถิ่น (endemic species) ที่พบในป่าเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีอัตราการเจริญเติบโตช้า เปลือกลำต้นมีกลิ่นหอม มีรายงานการศึกษาสารประกอบฟลาโวนอยด์ในมะคัง 13 ชนิด และพบใหม่อีก 2 ชนิดรวมเป็น 15 ชนิด (เสาวนีย์, 2544; Suksamrarn, 2002)

ในปัจจุบันงานด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชได้รับความสนใจอย่างสูงเพื่อการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์คุณภาพดี การอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชหายากและพืชประจำถิ่นรวมทั้งพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชมาใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิซึ่งจะสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณการผลิตได้ตามที่ต้องการ (วรพร, 2549) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้เกิดแคลลัสของมะคัง เพื่อบริหารจัดการพันธุ์มะคังที่จัดเป็นพืชหายาก รวมทั้งพัฒนาแนวทางการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโอกาสต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Vitex*

ในปัจจุบันถึงแม้งานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะเจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วแต่ก็ยังมีข้อจำกัดอีกมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาที่เกิดจากลักษณะพันธุกรรมของพืช ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มพืชมีเนื้อไม้ (woody plant) มักพบปัญหาเกี่ยวกับการสะสมสารประกอบหลายชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Erica, 1999) นอกจากนี้ยังมีตอบสนองต่อการควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไปเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนเริ่มต้น (explant) แต่ละชนิด เช่น เนื้อเยื่อส่วนปลายยอดหรือข้อเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ให้ผลดี เป็นต้น

(Razdan, 2003) เนื่องจากไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะคัง (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) โดยตรงจึงอ้างถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชที่มีลักษณะคล้ายกันได้แก่ พืชในสกุล *Vitex* ดังนี้

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง *Vitex negundo* L. ได้แก่ Chandramu และคณะ (2003) นำส่วนยอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และ Na_2SO_4 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 17.8 ไมโครโมลต่อลิตร (4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA 2.15 ไมโครโมลต่อลิตร (0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่ามีการเพิ่มปริมาณยอดสูงที่สุด 97.78 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 20.68 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น Handique (2007) เพิ่มปริมาณยอดโดยการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดสูง 80 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณยอดสูงที่สุดคือ 11 ยอด Sahoo and Chand (1998) ทำการเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดโดยทำลายการพักตัวของตาข้างได้ 92 เปอร์เซ็นต์ และชักนำยอดให้มีความยาวเพิ่มขึ้นได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี GA3 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Usha et al. (2007) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS ที่มี BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 8.87 ไมโครโมลต่อลิตร (1.99 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลต่อลิตร (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้ยอดมีการเพิ่มปริมาณสูงที่สุดคือ 6.3 ยอด สำหรับการเพาะเลี้ยงพืชสกุล *Vitex* ชนิดอื่นที่พบคือ รายงานของ Hiregoudar et al. (2006) ทำการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของ *Vitex trifolia* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินชนิดต่าง ๆ พบว่ามีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้นโดยปราศจากแคลลัส ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีปริมาณยอดสูงสุด 9 ยอดต่อข้อ จากอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลต่อลิตร (1.13 มิลลิกรัมต่อลิตร)

การชักนำให้เกิดแคลลัสของกลุ่มพืชที่มีเนื้อไม้บางชนิด

Das et al. (2005) ศึกษาอิทธิพลของ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณยอดของ *Vitex negundo* L. พบว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้โดยตรงและมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด

ประมาณ (2528) ชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อคัพภะของทุเรียนนก (*Durio lowianus* Scott. Exking) ขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0-3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม NAA ความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สุภาวดี (2542) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของทุเรียนพบว่าบนอาหารสูตร WPM ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี นอกจากนี้ Rao et al. (1981) พบว่าเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของทุเรียนนกมีการพัฒนาเป็นแคลลัสและรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Kearney et al. (1994) ทำการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบของสะเดาเกิดแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ IBA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพืชทดลอง

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของมะคังบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม Na_2SO_4 ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลองผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่มีต่อเนื้อเยื่อส่วนยอดของมะคัง

นำส่วนปลายยอดของมะคังขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบ

Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) โดย factor A คือ ความเข้มข้นของ 2,4-D มี 4 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ factor B คือ ความเข้มข้นของ BA มี 4 ระดับ คือ 0, 2, 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละสิ่งทดลองมี 20 ซ้ำ เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส รับแสงความเข้ม 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ทำการทดลองนาน 4 สัปดาห์ โดยบันทึกข้อมูล จำนวนข้อ จำนวนยอด ความยาวยอด และลักษณะทั่วไปของชิ้นส่วนพืช

การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำส่วนปลายยอดของมะคังขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่มี Na_2SO_4 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 ระดับได้แก่ 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสิ่งทดลองมี 15 ซ้ำ เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ทำการทดลองนาน 6 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลจำนวนข้อ จำนวนยอด ความยาวยอด การเกิดแคลลัส และลักษณะทั่วไปของชิ้นส่วนพืช

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่มีต่อเนื้อเยื่อส่วนยอดของมะคัง

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของมะคังมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ระดับความเข้มข้น 0 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาถึงผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ในแต่ละระดับความเข้มข้นพบว่าชิ้นส่วนมีการเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ

2,4-D ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่มี 2,4-D เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละสูตรมีจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ได้แก่ 3.2, 3.2 และ 3.4 ยอดตามลำดับ (ตารางที่ 1; รูปที่ 1E, 1F และ 1C) เมื่อพิจารณาถึงผลของ BA เพียงอย่างเดียวพบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดสูงสุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 2.4 ยอด แต่ยอดที่ได้มีขนาดเล็กและมีความยาวน้อยที่สุดเฉลี่ย 1.29 เซนติเมตร มีจำนวนข้อเฉลี่ย 3.1 ข้อ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของ Sahoo และ Chand (1998) ที่เพาะเลี้ยงส่วนตาข้างของ *Vitex negundo* L. พบว่าบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดโดยทำลายการพักตัวของตาข้างได้ 92 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ยังพบว่ามีรายงานการเพิ่มปริมาณยอดของพืชในสกุล *Vitex* ที่ใช้ BA ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกันนี้คือ รายงานของ Usha et al. (2007) พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Vitex negundo* L. เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 8.87 ไมโครโมลต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีการเพิ่มปริมาณสูงที่สุดคือ 6.3 ยอด เนื่องจากอิทธิพลของ BA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโทไคนินที่มีประสิทธิภาพดีในการกระตุ้นการเกิดยอดของพืช และปริมาณยอดเพิ่มมากขึ้นมักพบว่ายอดจะมีความยาวเฉลี่ยลดลง (Bhojwani and Razdan, 1996) สำหรับลักษณะทั่วไปของชิ้นส่วนยอดมะคังที่พบในทุกสูตรอาหาร ใบจะมีสีเขียวและหลุดร่วงไปเกือบหมดเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น ยกเว้นในสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (รูปที่ 1A) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่พืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมจึงเกิดสภาวะเครียดส่งผลให้พืชมีการสร้างสารเอธิลีนและปลดปล่อยออกมาจึงทำให้เกิดอาการใบร่วง (Bhojwani and Razdan, 1996) นอกจากนี้อาจจะเป็นผลมาจากระดับของสารที่ประกอบในสูตรอาหารที่พืชได้รับไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืชจึงมีการสะสมสารบางอย่าง เช่น

โปรตีนหรือ ABA ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Chandler et al., 1987)

การชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อนำยอดของมะคังมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี Na₂SO₄ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อมีการเพิ่มจำนวนข้อและจำนวนยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ปราศจาก 2,4-D มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.67 ยอด ยอดมีขนาดเล็กสีเขียวอ่อน ปล้องสั้น ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น (ตารางที่ 1; รูปที่ 2A) โดยยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากสูตรที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D สูงขึ้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดมีจำนวนเฉลี่ยต่ำสุด 1.13 ยอด และมีความยาวเฉลี่ยน้อยที่สุด 1.8 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) นอกจากนี้พบว่ายอดของมะคังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีเนื้อไม้หลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อใบอ่อนของ *Thevetia peruviana* L. ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Sharma and Kuma, 1994) กากะของทุเรียนนกที่ความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประยงค์, 2528) อย่างไรก็ตามการเติม 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมแม้จะมีผลในทางส่งเสริมให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเป็นแคลลัสแต่หากอัตราที่ใช้สูงเกินไปอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับออกซินชนิดอื่นๆ ซึ่งจะก่อให้เกิดความเป็นพิษกับพืชได้ (Razdan, 2003) ดังนั้นจึงพบว่ายอดของมะคังในอาหารสูตรที่มี 2,4-D มีอัตราการเพิ่มจำนวนต่ำ สำหรับชิ้นส่วนมะคังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุดคือ 1.28 ลูกบาศก์เซนติเมตร แคลลัสมีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่น (compact callus) สีเขียวปน

ขาว และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจะเกิดแคลลัสสีเหลือง เกาะกันหลวมๆ (friable callus) เจริญอยู่ด้านบน (ตารางที่ 2; รูปที่ 2E) สำหรับสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ โดยขนาดของแคลลัสไม่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.86 และ 0.88 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ มีลักษณะของแคลลัสคล้ายกับที่พบในสูตรที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2; รูปที่ 2C, 2D) เนื่องจากการเกิดแคลลัสเป็นผลจากการที่พืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโทไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนพืชในระดับที่แตกต่างกัน จึงต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในสัดส่วนที่เหมาะสมแตกต่างกันไป (Debergh and Zimmerman, 1993; Trigiano and Gray, 1996; Razdan, 2003)

เมื่อพิจารณาเนื้อเยื่อส่วนยอดของมะคังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ตารางที่ 1; รูปที่ 1) เปรียบเทียบกับสูตร MS ดัดแปลงที่มี Na_2SO_4 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2; รูปที่ 2) ที่เติม 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลง สามารถชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าทั้งในด้านการเพิ่มปริมาณยอดและการเกิดแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chandramu (2003) ที่ศึกษาผลของ Na_2SO_4 และน้ำตาลซูโครส ที่มีต่อยอดของ *Vitex negundo* L. พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่มี Na_2SO_4 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้สูงกว่าปกติ 2 - 3 เท่า นอกจากนี้ยอดของมะคังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ทุกระดับความ

เข้มข้นไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลย ส่วนอาหารสูตร MS ดัดแปลง พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นในทุกสูตรอาหารที่มี 2,4-D ดังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัสที่กล่าวว่าการเติม Na_2SO_4 ในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยส่งเสริมการเติบโตของแคลลัสได้ดี (Chandler et al., 1987 (a); Chandler et al., 1987 (b) Pua and et al., 1985)

สรุปผลการวิจัย

1. เนื้อเยื่อปลายยอดของมะคังสามารถเกิดยอดได้ดีที่สุด 60 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดเฉลี่ย 2.4 ยอด ความยาวเฉลี่ย 1.29 เซนติเมตร

2. อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

3. การเพาะเลี้ยงยอดของมะคังบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี Na_2SO_4 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะแข็งเกาะตัวกันแน่น สีขาวปนเขียว และมีแคลลัสเกาะตัวกันหลวมๆ สีเหลืองขนาดเล็กๆ อยู่ด้านบน

4. อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี Na_2SO_4 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้ยอดมีการเพิ่มปริมาณได้ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.53 ยอด ยอดมีความยาวเฉลี่ย 1.96 เซนติเมตร

ตารางที่ 1 จำนวนข้อ จำนวนยอด และความยาวยอดของมะคังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร (mg/l)	ข้อมูลเชิงปริมาณ ^{XI}			
	จำนวนข้อ (ข้อ)	จำนวนยอด (cm)	ความยาวยอด (cm)	การเกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)
2,4-D 0 BA 0	2.8 ^{ab}	1.2 ^{ef}	1.46 ^{bc}	20
2,4-D 0 BA 2	3.2 ^{ab}	3.2 ^a	1.2 ^c	100
2,4-D 0 BA 4	3.2 ^{ab}	2.2 ^{bcd}	1.26 ^c	60
2,4-D 0 BA 6	3.4 ^a	1.2 ^{ef}	1.46 ^{bc}	20
2,4-D 0.1 BA 0	2.4 ^b	1.0 ^f	1.34 ^c	20
2,4-D 0.1 BA 2	3.2 ^{ab}	3.2 ^a	1.24 ^c	100
2,4-D 0.1 BA 4	3.6 ^a	1.2 ^{ef}	1.84 ^a	20
2,4-D 0.1 BA 6	3.2 ^{ab}	2.2 ^{bcd}	1.38 ^c	80
2,4-D 0.3 BA 0	3.4 ^a	3.4 ^a	1.75 ^{ab}	100
2,4-D 0.3 BA 2	3.0 ^{ab}	1.4 ^{ef}	1.32 ^c	20
2,4-D 0.3 BA 4	3.2 ^{ab}	1.2 ^{ef}	1.36 ^c	20
2,4-D 0.3 BA 6	3.4 ^a	2.4 ^{bc}	1.74 ^{ab}	40
2,4-D 0.5 BA 0	2.8 ^{ab}	2.8 ^{ab}	1.28 ^c	80
2,4-D 0.5 BA 2	3.0 ^{ab}	1.8 ^{cde}	1.40 ^{bc}	20
2,4-D 0.5 BA 4	3.6 ^a	1.2 ^{ef}	1.38 ^c	20
2,4-D 0.5 BA 6	2.4 ^b	1.6 ^{def}	1.30 ^c	40
LSD_{0.05} 2,4-Dx BA	0.85	0.77	0.34	-
CV (%)	38.58	5.6	34.49	-
Average 2,4-D 0	3.2 ^{ab}	2.0 ^a	1.34 ^c	50
Average 2,4-D 0.1	3.1 ^{ab}	1.9 ^b	1.45 ^b	55
Average 2,4-D 0.3	3.3 ^a	2.1 ^a	1.54 ^a	45
Average 2,4-D 0.5	3.0 ^b	1.9 ^b	1.34 ^c	40
LSD_{0.05} 2,4-D	0.21	0.19	0.08	-
Average BA 0	2.9 ^b	2.1 ^b	1.45 ^a	55
Average BA 2	3.1 ^b	2.4 ^a	1.29 ^b	60
Average BA 4	3.4 ^a	1.5 ^d	1.46 ^a	30
Average BA 6	3.1 ^b	1.9 ^c	1.46 ^a	45
LSD_{0.05} BA	0.21	0.19	0.08	-

หมายเหตุ ^{XI} ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดิ่งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

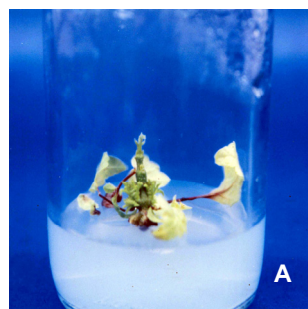


รูปที่ 1 ชิ้นส่วนปลายยอดของมะคังเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

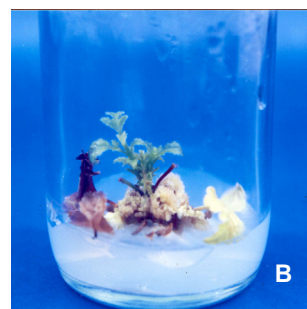
ตารางที่ 2 จำนวนข้อ จำนวนยอด ความยาวยอด การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสของมะคังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้น ของ 2,4-D (mg/l)	ข้อมูลเชิงปริมาณ ^{X/}				
	จำนวนข้อ	จำนวนยอด	ความยาวยอด	แคลลัส	
	(ข้อ)	(ยอด)	(cm)	การเกิด (%)	ขนาด (cm ³)
0	4.00 ^a	3.67 ^a	2.15 ^a	0.00	0.00 ^d
0.1	3.73 ^a	1.40 ^b	2.07 ^{ab}	60.00	0.50 ^c
0.3	3.47 ^{ab}	1.33 ^b	2.09 ^{ab}	86.68	0.86 ^b
0.5	3.20 ^{ab}	1.27 ^b	2.01 ^b	100.00	0.88 ^b
1	2.87 ^b	1.13 ^b	1.80 ^c	100.00	1.28 ^a
CV (%)	62.55	45.45	32.08	-	76.93
LSD _{0.05}	0.84	0.66	0.12	-	0.10

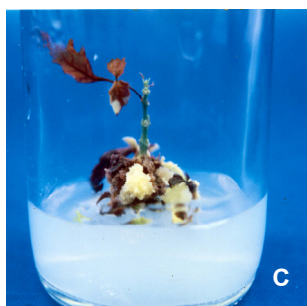
หมายเหตุ ^{X/} ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวดังแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



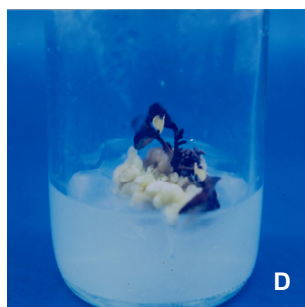
2,4-D 0 mg/l



2,4-D 0.1 mg/l



2,4-D 0.3 mg/l



2,4-D 0.5 mg/l



2,4-D 1 mg/l

รูปที่ 2 ชิ้นส่วนปลายยอดของมะคังเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มี Na₂SO₄ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซนต์ เดิม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารอ้างอิง

- ประยงค์ คงนคร. 2528. การเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดทุเรียนนกก (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วราพร วีระพลกร. 2549. เทคโนโลยีการเก็บรักษาพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.
- สุภาวดี น้ำหอมจันทร์. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทุเรียนนกกในสภาพปลอดเชื้อ. (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เสาวนีย์ คำพันธ์. (2544). เอคโตสเตียรอยด์จากเปลือกต้นมะคัง. (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition, Elsevier Science B. V. Amsterdam.
- Chandler, S. F., E. Ragolsky, E. Pua and T. A. Thorpe. 1987(a). Some morphogenic effects of sodium sulphate on tobacco callus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 11: 141-150.
- Chandler, S. F. and T. A. Thorpe. 1987(b). Proline accumulation and sodium sulphate tolerance in callus cultures of *Brassica napus* L. cv. Westar. Plant Cell Rep. 6: 176-179.
- Chandramu, C., D. M. Rao and V. D. Reddy. 2003. High frequency induction of multiple shoots from nodal explants of *Vitex negundo* L. using sodium sulphate. J. Plant Biotech. 5 (2): 107-113.
- Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman. 1993. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.
- Das, S., V. Kanungo, M. L. Naik, S. Sinha and S. Sinha. 2005. *In vitro* regeneration of *Vitex negundo* L., a medicinal shrub. Plant Cell Biotech. Mole. Bio. 6 (3/4): 143-146.
- Erica, E. B. 1999. Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis. London.
- Handique, P. J. 2007. Rapid *in vitro* propagation of *Vitex negundo* using nodal explants. J. of Biotech. [online], 1 (1): Abstract Item: 987149.
- Hiregoudar, L.V., H. N. Murthy, J. G. Bhat, A. Nayeem, B. P. Hema and E. J. Hahn. 2006. Rapid clonal propagation of *Vitex trifolia*. Bio. Plant. 50(2): 291-294.
- Kearney, M. L., J. Allan, J. E. Hooker and A. J. Mordue. 1994. Antifeedant effect of *in vitro* culture extracts of neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskal). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 31-39.
- Pua, E., E. Ragolsky, S. F. Chandler and T. A. Thorpe. 1985. Effect of sodium sulfate on *in vitro* organogenesis of tobacco callus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5: 55-62.
- Rao, A. N., Y. M., Sin, N. Kothagoda and J. H. Hutchinson. 1981. Cotyledon tissue culture of some tropical fruits. 124-137. In Rao, A. N. (ed). Tissue culture of Economically Important Plant. Costed, Singapore.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture, Second Edition. Science Publishers, Inc., Enfield, N. H., USA.
- Sahoo, Y. and P. K. Chand. 1998. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. Plant Cell Rep. 18: 301-307.

- Sharma, A. and A. Kumar. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf-derived cell suspension of a mature tree-Thevetia peruviana. Plant Cell Rep. 14: 171-174.
- Suksamrarn, A., S. Kumpun and B. Yingyong narongkul. 2002. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. J. Nat. Prod. 65: 1690-1692.
- Trigiano, R. N. and D. J. Gray. 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, Inc., USA.
- Usha, P. K., S. Benjamin, K. V. Mohanan and A. V. Raghu. 2007. An efficient micropropagation system for Vitex negundo L., an important woody aromatic medicinal plant, through shoot tip culture. Research J. of Bot. 2(2): 102-107.