

การอนุรักษ์ และการขยายพันธุ์มะคังขาว และผักหวานบ้านด้วยเทคนิค
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ภพเกา พุทธิรักษ์ และ วารุต อยู่คง*

Conservation and propagation *Taminadia uliginosa* Retz. and *Sauropus androgynus* (L.) Merr. by technique of *in vitro* culture
Phopgao Buddharaksa and Warut U-Kong*

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Department of Biology, Faculty of Science, University of Phayao, Phayao 56000

*Corresponding Author. E-mail address: nu48330105@hotmail.com

Received 23 August 2011; accepted 2 February 2012

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากยอดอ่อนของมะคังขาว (*Taminadia uliginosa* Retz.) และผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* L. Merr.) โดยการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนมะคังขาวบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด 4.2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น และการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนมะคังขาวบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด 11.4 รากต่อยอดหลัก ส่วนการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนผักหวานบ้านบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด 3.8 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น ขณะที่สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดราก 2.6 รากต่อยอดหลัก

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มะคังขาว ผักหวานบ้าน NAA BA

Abstract

The appropriate medium for shoot induction from shoot tip of *Taminadia uliginosa* Retz. and *Sauropus androgynus* (L.) Merr.. Shoot tip of *T. uliginosa* were cultured for 6 weeks on MS medium supplemented 1, 2 and 3 mg/l BA. The results showed shoot indicated that the highest number of shoots 4.20 shoots per explants when cultured on modification MS medium supplemented 2 mg/l BA. The root indicated from shoots was culture on MS medium supplemented 0.1 0.3 and 0.5 mg/l NAA for 6 weeks. The results showed highest root induction number 11.40 roots per shoot when cultured on modification MS medium supplemented 0.3 mg/l NAA. Shoot tip of *S. androgynus* were cultured for 6 weeks on MS medium supplemented 1, 3 and 5 mg/l BA singly or in combination 0.1 mg/l NAA. The results showed shoot proliferation of *S. androgynus* was observed on MS medium supplemented 1.5 mg/L BA combination 0.1 mg/l NAA with 3.80 shoot per explants. Whilst MS medium without added growth regulators induction 2.6 roots per explants.

Keywords: *In vitro* cultures, *Taminadia uliginosa*, *Sauropus androgynus*, NAA, BA

บทนำ

ป่าไม้เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญอย่างหนึ่งของสังคมมนุษย์ แต่เนื่องจากได้มีการพัฒนาชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์อย่างรวดเร็วและผู้คนส่วนใหญ่มีขาดความตระหนักถึงการใช้อย่างเหมาะสมจากทรัพยากรธรรมชาติบนพื้นฐานของการอนุรักษ์ โดยมีการใช้ทรัพยากรอย่างฟุ่มเฟือยจึงส่งผลทำให้ทรัพยากรป่าไม้ถูกทำลายลงอย่างมากและรวดเร็วกว่าที่ควรจะเป็น ผลที่ติดตามมากก็คือ เกิดการขาดแคลนไม่สำหรับการใช้สอยต่างๆ และเกิดความเสื่อมโทรมของทรัพยากรอื่นๆ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความแปรปรวนของลมฟ้าอากาศ และปริมาณของฝน จนก่อให้เกิด

เกิดปัญหาอื่นๆ ติดตามมาอีกมากมาย เช่น อุทกภัย ความแห้งแล้ง เป็นต้น ในปัจจุบันประชาชนทุกกลุ่มอาชีพกำลังสนใจเกี่ยวกับการอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้กันมาก ดังนั้นในการอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้นั้นจึงต้องมีการร่วมมือกันระหว่างฝ่ายต่างๆ จึงจะสามารถทำให้บรรลุตามเป้าหมายได้ โดยสอดคล้องกับโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เป็นโครงการที่จัดตั้งขึ้นเมื่อปี พ.ศ.2536 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างความเข้าใจ และทำให้ตระหนักถึงความสำคัญของพันธุกรรมพืชต่างๆ ที่มีอยู่ในประเทศไทย ก่อให้เกิดกิจกรรมเพื่อให้มีการร่วมคิด ร่วมปฏิบัติที่นำผลประโยชน์มาถึงประชาชนชาวไทย ตลอดจนให้มีการจัดทำ

ระบบข้อมูลพันธุ์กรรมพืชให้แพร่หลายสามารถสื่อถึงกันได้ทั่วประเทศ

มะคังขาว (*Taminadia uliginosa* Retz.) อยู่ในวงศ์ Rubiaceae พบทั่วไปในป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณใกล้ น้ำ สูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 100 ถึง 800 เมตร ถือได้ว่าเป็นพืชหายาก มีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า รวมทั้งทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 5 ถึง 10 เมตร ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเป็นคู่ๆ รูปไข่กลับ ดอกออกเดี่ยวๆ ตามซอกใบ กลีบดอกสีขาวมีกลิ่นหอม 6 กลีบ ออกดอกช่วงกรกฎาคมถึงสิงหาคม มะคังขาวมีความสำคัญในด้านสรรพคุณทางสมุนไพรของแพทย์แผนไทย โดยการใช้ส่วนต่างๆ ของลำต้นมาประกอบเป็นเครื่องปรุงทางยาสมุนไพร ราก และผลใช้รักษาโรคบิดมูกเลือด อากาศท้องเสีย แก่นไม้ต้มรวมกับมะคังแดง บำรุงกำลัง (สมพร, 2546)

ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นผักพื้นบ้านที่เป็นพืชท้องถิ่นของไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศไทยสามารถพบได้ทุกภาคพบมากที่สุด คือ ภาคใต้ แถบจังหวัดสุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช (Benjapak et al., 2008) ผักหวานบ้านเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 1.5 ถึง 2.0 เมตร ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปไข่ ปลายใบแหลมขอบเรียบ ออกดอกเป็นช่อตามง่ามใบ มีดอกเพศเมีย 1 ถึง 3 ดอก มีดอกเพศผู้เป็นจำนวนมาก ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม ผลกลมฉ่ำ ผิวเป็นพู่เล็กน้อย มีสีเขียวถึงขาวนวล (สายันต์ และคณะ, 2547) ผักหวานบ้านมีรสหวาน เย็น มีประโยชน์ทางยา เช่น ใช้น้ำจากใบ และต้น หยอดตาแก้อักเสบ ราก มีสรรพคุณ ระบายความร้อน ถอนพิษไข้ไข้ ใบถูกใช้ปรุงเป็นยาเขียว แก้ไข้ ส่วนประโยชน์ทางด้านอาหาร ผู้บริโภคสามารถนำส่วนที่เป็นผล ยอด และใบอ่อนมาประกอบอาหารได้ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารอาหาร และแร่ธาตุที่มีประโยชน์ และมีสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) สามารถยับยั้งหรือต้านการทำลายเซลล์ที่เกิดจากผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ดังนั้น ผักหวานบ้านจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภคที่หันมาใส่ใจทางด้านสุขภาพ (เพ็ญญา และกัญญา, 2547) ปัจจุบันจึงมีการเพาะปลูกผักหวานบ้านในเชิงการค้าแพร่หลายเป็นจำนวนมากโดยเพิ่มขึ้นตามความต้องการของตลาดผู้บริโภค ปัจจุบันมีพื้นที่ในการเพาะปลูกผักหวานบ้านเพิ่มขึ้น (ทวีศักดิ์, 2548) ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมา คือ ขาดแคลนต้นพันธุ์ ปัจจุบันงานด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชได้รับความสนใจอย่างสูงเพื่อการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์คุณภาพดี รวมถึงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชหายาก พืชประจำถิ่น รวมทั้งพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจด้านต่างๆ นอกจากนี้ ยังมีความพยายามในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชมาใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิซึ่งจะสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณการผลิตได้ตามที่ต้องการ (วราพร, 2549)

การเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในเวลาที่สามารถนำเทคโนโลยีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว ในการขยายพันธุ์มะคังขาว และผักหวานบ้านในสภาพปลอดเชื้อ มีรายงานการศึกษาของ จูติภาส (2530) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนตาข้างของขิง (*Zingiber officinale* Rosc) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ย 3.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น และใช้ BA และ NAA อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นยอดและรากได้ (เบญจพร, 2536) นอกจากนี้ อภิชาติ และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาผลของ BA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายดำในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอด 4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดของมะคังขาวและผักหวานบ้านในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ BA และ NAA

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

การฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืชที่ได้จากธรรมชาติด้วยสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) หรือ clorox

นำเมล็ดของมะคังขาวในสภาพธรรมชาติมาทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และเติม Tween - 20 2-3 หยด ลงด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง (พีระวุฒิ, 2534) หลังจากนั้นนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์เพื่อใช้เป็นตัวอย่างพืชในการทดลองต่อไป

เลือกชิ้นส่วนยอดอ่อนผักหวานบ้านในสภาพธรรมชาติ มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหล หลังจากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และสารละลาย clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยสารละลาย clorox ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที พร้อมทั้งหยด Tween 20 1-2 หยด ลงด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดตกแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ชนิดของจุลินทรีย์ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ โดยทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์จากจำนวนซ้ำที่เกิดขึ้นการปนเปื้อนจุลินทรีย์ การตาย และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนยอดอ่อนของมะคังขาว และผักหวานบ้าน

นำชิ้นส่วนยอดอ่อนที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อของมะคังขาวมาชักนำให้เกิดยอดตัดให้ได้นาน 1 เซนติเมตร โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA (N6 – benzyladenine) ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการชักนำให้เกิดยอดของผักหวานบ้านนำชิ้นส่วนยอดอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าแล้วตัดให้ได้นาน 1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียว หรือรวมกับ NAA (Naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนมะคังขาว และผักหวานบ้าน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด, จำนวนยอด ความสูงยอด และจำนวนใบ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

การศึกษาผลของ NAA ในการชักนำให้เกิดรากของมะคังขาว

ตัดแยกยอดมะคังขาวให้มีขนาดความยาวประมาณ 2–2.5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม

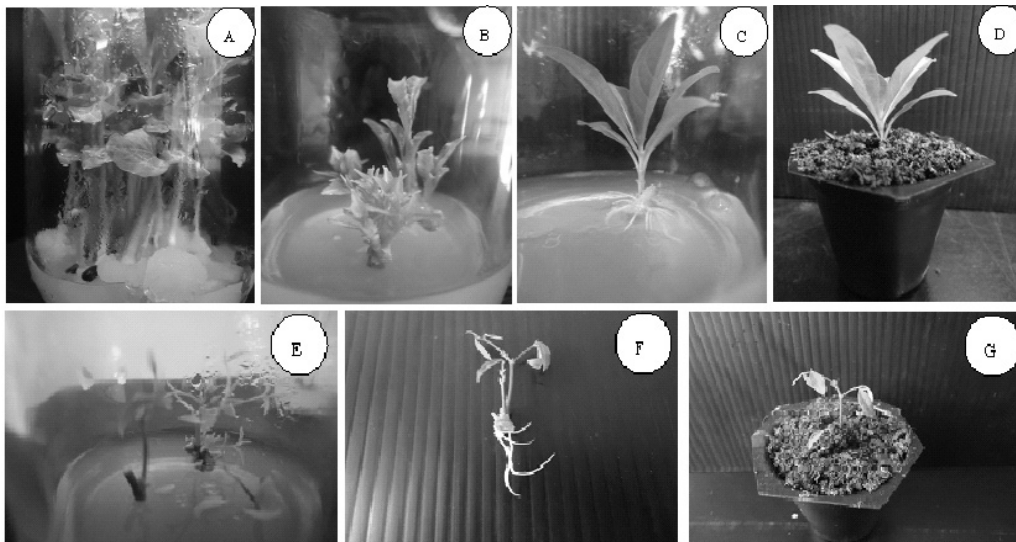
สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิด NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนราก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

จากการนำต้นมะคังขาว และผักหวานบ้านที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แข็งแรง และเกิดราก ปลูกลงดินร่วนทราย และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 ในสภาพโรงเรือน รดน้ำให้ชุ่มแล้วเอาใส่ในถุงพลาสติกใส มัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ แล้วค่อยเจาะถุงให้เป็นรูขนาด 1.5 นิ้ว ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จากนั้นเปิดปากถุงไว้ 1 สัปดาห์ก่อนการบันทึกข้อมูล

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืชที่ได้จากธรรมชาติด้วยสารละลาย Sodium hypochlorite (NaOCl) หรือ Clorox

จากการชักนำเมล็ดของมะคังขาวให้เกิดต้นอ่อน โดยนำเมล็ดของมะคังขาวมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดมะคังขาวเกิดต้นอ่อน ที่มีลักษณะลำต้น ใบ และราก สมบูรณ์ (รูปที่ 1 A)



รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะคังขาว และผักหวานบ้านในสภาพปลอดเชื้อ A: ต้นมะคังขาวที่เกิดจากเมล็ดบนสูตรอาหาร MS หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ B: การชักนำให้เกิดยอดของมะคังขาวบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร C: การชักนำให้เกิดรากจากยอดของมะคังขาวบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร D: การนำต้นมะคังขาวออกปลูกลงโรงเรือน E: การชักนำให้เกิดยอดของผักหวานบ้านบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร F: รากของผักหวานบ้านที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต G: การนำต้นผักหวานบ้านออกปลูกลงโรงเรือน

การศึกษาความเข้มข้นความเข้มข้นของ clorox ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อยดอ่อนผักหวานบ้านโดยพบว่า สารละลาย clorox 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นส่วนปลายยอดผักหวานบ้านมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่สารละลาย clorox 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 87.5 และ 40 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย clorox มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น ที่สารละลาย clorox 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที พบว่าชิ้นส่วนยอดอ่อนผักหวานบ้านถูก

ทำลายทำให้ชืดและช้ำตาย ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นมากเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ นฤพร (2541) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออร์กานในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า สารละลาย clorox ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปจะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายในที่สุด ดังนั้น ในการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดผักหวานบ้าน ควรใช้สารละลาย clorox ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และตามด้วยสารละลาย clorox 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จึงจะให้ผลดีที่สุด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การฟอกฆ่าเชื้อยดอ่อนผักหวานบ้านด้วยสารละลาย clorox

ความเข้มข้นของสารละลาย clorox (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน		เปอร์เซ็นต์การตาย	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
		แบคทีเรีย	เชื้อรา		
5	15	33.33	66.67	0	0
10	15	18.75	68.75	0	12.5
15	15	13.33	26.67	0	60
20	15	0	0	100	0
10 and 5	10 and 5	0	20	0	80

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยดจากชิ้นส่วนยอดอ่อนของมะคังขาว และผักหวานบ้าน

จากการนำชิ้นส่วนยอดอ่อนมะคังขาวมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด BA ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยดได้เร็วที่สุด หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยมีปริมาณยดเฉลี่ย 4.20 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 1 รูปที่ 1 B) สอดคล้องกับงานวิจัยของฐิติภาส (2530) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนตาข้างของขิง (*Zingiber officinale* Rosc) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ย 3.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น นอกจากนี้ อภิชาติ และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาผลของ BA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกระชายดำในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยด 4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น สำหรับสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถ

สร้างยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของกาญจนา และคณะ (2542) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อผสมเกิดยดได้ 4.5 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และกระตุ้นการเกิดยดจากตาข้าง และสามารถเพิ่มปริมาณยดในพืชได้หลายชนิด เช่น พืชประยงค์ (วินิจ, 2546) และกล้วย (วรรัตน์, 2549) ส่วนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น ซึ่งพบว่าหากปริมาณของ BA ที่ความเข้มข้นสูงๆ จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยด และการเกิดยดใหม่ได้ (Gianfagna, 1995) เนื่องจากในเนื้อเยื่อมีไซโตไคนินอยู่แล้ว การเพิ่มจากภายนอกเข้าไปจะทำให้ปริมาณไซโตไคนินภายในสูงเกินไปจึงมีผลกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์บางชนิดมากเกินไปจนเกิดอันตรายต่อชิ้นส่วนพืชและส่งผลกระทบต่อความยาวของยดและจำนวนยอดลดลง (Mok & Mok, 1994)

ตารางที่ 1 การชักนำให้เกิดยดจากชิ้นส่วนยอดอ่อนของมะคังขาวที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

BA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยด	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น	จำนวนใบต่อยอด	ความยาวยด (เซนติเมตร)
0	100%	1.0±0.0 ^a	6.6±0.4 ^{bc}	3.3±0.4 ^b
1	100%	3.0±0.0 ^b	5.8±0.2 ^{ab}	1.8±0.1 ^a
2	100%	4.2±0.3 ^c	5.4±0.4 ^a	2.1±0.2 ^a
3	100%	2.6±0.2 ^b	7.4±0.4 ^c	2.9±0.1 ^b

Values represent means ±SE means followed by the same letter within columns are not significantly different ($p \leq 0.05$) using Duncan's multiple test.

การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนยอดอ่อนผักหวานบ้าน เมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น และยังชักนำให้เกิดรากเฉลี่ย 2.6 รากต่อยอด (รูปที่ 1 F) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kongbangkerd & Kamol (2006) พบว่าอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำการเกิดรากของกระเจียวขาวได้จำนวนเฉลี่ย 4.44 รากต่อยอด เนื่องด้วยในเนื้อเยื่อของกระเจียวขาวมีระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเพียงพอต่อการกระตุ้นการเกิดราก และงานวิจัยของ Anupama et al. (1995) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดรากของ *Cocculus pendulus* Forst. เฉลี่ย 4.3 รากต่อยอด ส่วนยอดอ่อนผักหวานบ้านถูกชักนำให้เกิดยอดได้ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว เฉลี่ย 2.20, 2.40 และ 2.40 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sanjeev et al. (2003) ที่ใช้ BA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัม

ต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ก็สามารถเพิ่มจำนวนยอดชักนำเฉลี่ย 4.3 และ 3.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้สูง 3.80 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 4 รูปที่ 1 E) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ruot et al. (2008) ที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA สำหรับการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของ *Nyctanthes arbor-tristis* Linn. โดยใช้ BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.78 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น และงานวิจัยของ Bhattacharya et al. (1997) ใช้ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดยอดจากตาข้างของ *Jasminum officinale* L. เฉลี่ย 2.5 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น จากรายงานการทดลองของ Branca et al. (1991) ยืนยันได้ว่าไซโตไคนินเพียงชนิดเดียวมีผลทำให้เซลล์ยืดยาวขึ้นได้แต่ควรใช้ออกซินร่วมด้วยเนื่องจากการทำงานของออกซินจะส่งเสริมการเกิดยอดและรากของเนื้อเยื่อได้

ตารางที่ 4 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนยอดอ่อนของผักหวานบ้านที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA และ NAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดยอด	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน พืชเริ่มต้น	จำนวนใบต่อยอด	จำนวนรากต่อยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)
0	0	100	1.40±0.24 ^a	3.80±0.48 ^{ab}	2.60±0.24 ^b	2.30±0.12 ^a
1	0	100	2.20±0.20 ^{bc}	4.20±0.48 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	2.40±0.18 ^a
3	0	100	2.40±0.24 ^{bc}	4.00±0.44 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	2.50±0.15 ^a
5	0	100	2.40±0.24 ^{bc}	3.60±0.24 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	2.30±0.20 ^a
1	0.1	100	3.80±0.20 ^c	4.40±0.40 ^b	0.00±0.00 ^a	2.20±0.12 ^a
3	0.1	100	2.40±0.24 ^{bc}	3.60±0.24 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	2.70±0.20 ^a
5	0.1	100	1.80±0.20 ^{ab}	3.00±0.54 ^a	0.00±0.00 ^a	2.20±0.12 ^a

Values represent means ± SE means followed by the same letter within columns are not significantly different ($p \leq 0.05$) using Duncan's multiple test.

การศึกษาผลของ NAA ในการชักนำให้เกิดรากของมะคังขาว

จากการนำยอดมะคังขาวความยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิด NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด คือ 11.40 รากต่อยอด (ตารางที่ 2 รูปที่ 1 C) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dragoljub et al. (2004) รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดของ *Carlina acaulis* L. บนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี เนื่องจากมี

ฤทธิ์ของออกซินสูง เคลื่อนย้ายภายในต้นได้ดี และสลายตัวช้ากว่าจึงสามารถชักนำการเกิดรากได้ดี และ NAA สามารถชักนำให้เกิดการแตกรากใหม่เพิ่มขึ้น ในขณะที่อาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีผลชักนำให้การสร้างรากเกิดขึ้นได้ค่อนข้างต่ำ (Wawrosch et al., 2001) ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้จำนวนรากลดลง มีจำนวนเฉลี่ย 2.8 รากต่อยอด Graves et al. (1978) รายงานว่าจำนวนรากลดลง เมื่อ NAA มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นนั้น เนื่องจากความเข้มข้นของออกซินที่สูงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อราก มีรายงานการวิจัยของ Norton & Skiruin (2001) พบว่าความเข้มข้นของ NAA ที่มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รากขององุ่น Norton เกิดรากย้วยสั้น เพราะหักง่ายเมื่อย้ายปลูกลงดิน อีกทั้ง NAA เป็นออกซิน

ที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถเคลื่อนย้ายภายในพืชได้ดีและสลายตัวช้าจึงทำให้เป็นพืชต่อชิ้นส่วนพืช (Zaerr & Mapes, 1982)

จากการนำต้นมะคังขาวที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแข็งแรง และเกิดราก ปลูกลงดินร่วม

ทราย และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 ในสภาพโรงเรือนเมื่อย้ายปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ต้นมะคังขาวเจริญเติบโตได้ดี มีการรอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1 D) และผักหวานบ้านมีการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1 G)

ตารางที่ 2 ผลของ NAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของยอดมะคังขาว หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากต่อยอด
0	100	2.8±0.2 ^a
0.1	100	7.2±1.1 ^b
0.3	100	11.4±1.3 ^c
0.5	70	2.7±0.2 ^a

Values represent means ± SE means followed by the same letter within columns are not significantly different ($p \leq 0.05$) using Duncan's multiple test.

สรุปผลการศึกษา

สูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของมะคังขาวได้มากที่สุดคือสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดเฉลี่ย 4.20 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นและสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากของมะคังขาวได้ดีที่สุดคือสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากเฉลี่ย 11.40 รากต่อยอด จากนั้นนำต้นอ่อนมะคังขาวออกปลูกสู่โรงเรือน มีการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดของผักหวานบ้านจากชิ้นส่วนยอดอ่อน คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดเฉลี่ย 3.80 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น จากนั้นทำการย้ายออกปลูกสู่โรงเรือน มีการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะคังขาวและผักหวานบ้านเป็นงานวิจัยแรกที่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา นพรัตน์ พัฒนาพงษ์ และวิจารณ์ ทองมีเอียด. (2542). การขยายพันธุ์หมอมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2542. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จิตติภาสิ ชิตโชติ. (2530). การผลิตต้นพันธุ์ซึ่งปลอดโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทวีศักดิ์ ชัยเรืองยศ. (2548). กลุ่มผักหวานบ้านปลอดสารพิษบ้านโคกล่าดอน. เทคโนโลยีชาวบ้าน, 17(364), 14-16.

นฤพร หรรษคุณาณย์. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เบญจพร เสี่ยงเพราะ. (2536). การขยายพันธุ์ซึ่งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. โครงการงานชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์. (2534). การชักนำให้เกิดอวัยวะและต้นใหม่ของลำไย (*Euphoria longana* Lamk.) ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 15 หน้า.

เพ็ญญา ทรัพย์เจริญ และกัญญา ตีพิเศษ. (2547). ผักพื้นบ้านภาคเหนือ (พิมพ์ครั้งที่ 2). มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์แผนไทย จำกัด. กรุงเทพฯ.

วราพร วีระพลกร. (2549). เทคโนโลยีการเก็บรักษาพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.

วรรัตน์ บุญสนองสุภา. (2549). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุล *Uvaria* บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วินิจ พลศักดิ์. (2546). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประยงค์ (*Aglacia adorata* Lour.) และการเปรียบเทียบสารทุติยภูมิที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับต้นที่พบในสภาพธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมพร ภูติยานันต์. (2546). การตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพร: พฤษกษอนุกรมวิธาน. หจก. ตูลย์สตูดิโอกราฟฟิค 120, เชียงใหม่.

สายันต์ ตันพานิช ปริญญา วิไลรัตน์ ทักษิณ อาชาวาคม ชลธิชา ควรคำนวณ ประยุทธ์ กาวิละเวส เรวัตร์จินดาเจีย สุรสิทธิ์ วงศ์สัจจานนท์ และวิเชน ดวงสา. (2547). *ผักหวานบ้านและผักหวานป่า*. สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชไร่, โครงการทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (PROSEA), สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ ชิตบุรี พิทักษ์ พุทธวรชัย และพงษ์ยุทธ นวลบุญเรือง. (2543). ผลของระดับความเข้มข้น BA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนต้นกระชายดำในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารเกษตร*, 17(2), 100-105.

Benjapak, N., Swatsitang, P., Senawong T. & Tanpanich, S. (2008). Antioxidant capacity of Pak-Wanban (*Sauropus androgynus* L. Merr.) in human embryonic kidney 293 cells (HEK-293 cells). *Agricultural Science Journal*, 39(3), 197-200.

Branca, C., Bucci, G., Domiano, P., Ricci, A., Torelli, A., & Bassi, M. (1991). Auxin structure and activity on tomato morphogenesis. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 24(2), 105-114.

Bhattacharya S. & Bhattacharya, S. (1997). Rapid multiplication of *Jasminum officinale* L. by *in vitro* culture of nodal explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 57-60.

Dragoljub, G., Fodulovic, K. S., Misic, D., Zlatko, G. & Radomir, K. (2004). *In vitro* stem elongation of stemless carline thistle. *Plant Growth Regulation Journal*, 44, 65-69.

Gianfagna, T. (1995). *Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops*. pp.751-733. In P. J. Davies (ed.). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Graves, C.J., Adam, P. & Winsor G. (1978). Some effects of micronutrients and liming on the yield, quality and micronutrients status of tomato grown in peat. *Plant Soil*, 50, 343-354.

Kongbangkerd, A. & Kamol, P. (2006). Effect of cytokinins and auxins on development of *Curcuma parviflora* Wall. culture *in vitro*. *Naresuan Science Journal Faculty of Science*, 2(2), 183-201.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Mok, D. W. S. & Mok, M. C.. (1994). *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Inc., Florida. pp.129-137.

Norton, M. A. & Skirvin, R.M. (2001). Micropropagation 'Norton' wine grape Hort. *Tech*. 11206-208.

Rout, G.R., Mahato, A. & Senapati, S.K. (2008). *In vitro* clonal propagation of *Nyctanthes arbut-tristis*. *Biologia plantarum*, 52(3), 521-524.

Wawrosch, C., Malla, P.R. & Kopp, B. (2001). Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Reports*, 20, 285-288.

Sanjeev K., Alka Narula, M Sharma, P. & Srivastava, P. S. (2003). Effect of copper and zinc on growth, secondary metabolite content and micropropagation of *Tinospora cordifolia*: a medicinal plant. *Phytomorphology*, 53(1), p.79-91.

Zaerr, J.B. & Maper, M.O. (1982). *Action of growth regulators*, pp. 231-255. In J.M. Bonga & D.J. Durza (eds.). *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff/DR.W.Junk Publishers, The Hague.