บทที่ 5

สรุป วิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของชิ้นส่วนที่เลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเท้ายายม่อม สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1.1 การเลี้ยงก้านใบ ปลายราก แผ่นใบ และแคลลัส สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้

1.2 ตำแหน่งจากโคนก้านใบขึ้นมา 2 มม ของใบที่อยู่ถัดจากใบนอกสุดเข้ามา (ตำแหน่งที่ 3) ให้จำนวนต้นใหม่เฉลี่ยมากที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.05 มก/ล ต้นใหม่ที่เกิด เกิดจากด้านในของก้านใบใกล้กับท่อลำเลียง

1.3 ตำแหน่งจากปลายรากขึ้นมา 2 มม สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้โดยใช้เวลาน้อยที่สุด และเกิดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่ามีจุดกำเนิดอยู่ที่เยื่อเยื่อเจริญที่ปลายราก

1.4 แผ่นใบขนาด 5x5 มม และมีเส้นกลางใบติดมาด้วย สามารถชักนำให้เกิดยอดผ่านแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อใช้ BAP 0.5 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 0.05 มก/ล

1.5 การเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่ไม่เติมทั้ง BAP และ 2,4-D หรือ 2,4-D 0.05 มก/ล ร่วมกับ BAP 0-0.05 มก/ล ทำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แต่ BAP ที่ระดับ 0.5 มก/ล เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ทำให้จำนวนยอดลดลงอย่างเห็นได้ชัด

1.6 โดยภาพรวมแคลลัสสามารถเกิดรากได้โดยใช้ BAP ช่วง 0-0.05 มก/ล และ 2,4-D ช่วง 0-0.5 มก/ล ยกเว้นบางกรรมวิธี และเห็นชัดว่า รากไม่เกิดเมื่อใช้ BAP หรือ 2,4-D ที่ระดับ 0.5 และ 5.0 มก/ล ตามลำดับ

1.7 โคนก้านใบสามารถเกิดยอดได้ บนอาหารที่มี BAP 1 มก/ล (แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้) หรือการใช้ 2,4-D 0.05 มก/ล โดยเกิดผ่าน embryogenic callus และต้นเกิดรากได้

1.8 การเลี้ยงปลายราก บนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือมี 2,4-D 0.05 มก/ล ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อยกว่า เมื่อมี BAP ร่วมด้วย ต้นที่เกิดสร้างทั้งรากใหญ่และรากเล็ก

1.9 การเลี้ยงแคลลัสแบบเซลล์เกาะกันหลวมๆนั้น สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 0.025 หรือ 0.05 หรือ BAP 0.5 มก/ล ถ้าใช้ BAP 1 มก/ล เกิดต้นที่ไม่มีรากและต้นฉ่ำน้ำ

1.10 แคลลัสที่เกาะกันแน่น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เช่นกัน และ BAP 2 มก/ล ใช้ร่วมกับ 2,4-D 0.025-0.10 มก/ล ยับยั้งการเกิดยอดอย่างเห็นได้ชัด

1.11 ยอดกระจุกที่ผ่าสี่ส่วนตามยาว สามารถเกิดยอดใหม่ได้ เปอร์เซ็นต์สูงกว่าการผ่าครึ่งหรือไม่ผ่าแบ่ง

1.12 การผ่าสี่ส่วนตามยาวโคนก้านใบ เกิดยอดใหม่ได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุด

1.13 การเลี้ยงปลายรากตำแหน่งที่ 1 ขนาด 5 มม ของรากที่มีความยาว 10, 30 และ 40 มม สามารถเกิดยอดได้สูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์

2. วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาและทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนที่แตกต่างกันของต้นเท้ายายม่อมโดยทำการทดลองเกี่ยวกับ ชนิดชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด พบว่าการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในแน่ละการทดลองแตกต่างกันไป ซึ่งมีผลจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้

2.1 ปัจจัยที่เกิดจากชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง

2.1.1 <u>ชนิดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง</u>

เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบ ปลายราก แผ่นใบ หรือแคลลัสของต้นเท้ายายม่อมพบว่า สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้โดยเฉพาะการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายรากที่สามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่เลี้ยงทั้งหมด ในขณะที่ชิ้นส่วนชนิดอื่นสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้สูงที่สุดเพียง 80 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยหลักทั่วไป เซลล์พืชจะมีการแบ่งตัวได้ก็ต่อเมื่อเป็น meristematic cells ฉะนั้น การเลือกเนื้อเยื่อที่มีเซลล์แบบ meristematic cells มาเลี้ยงจะมีโอกาสสำเร็จได้มาก เพราะเซลล์สามารถที่จะแบ่งและเจริญเติบโตได้ทันที การใช้เซลล์ที่หยุดการแบ่งเซลล์แล้วได้เปลี่ยนไปทำหน้าเฉพาะแล้วนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเซลล์เหล่านี้จะต้องเปลี่ยนกลับมาเป็น meristematic cells ก่อน ซึ่งขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่

จะไปกระตุ้นเซลล์ ซึ่งในบางครั้งก็ไม่สำเร็จ หรือสำเร็จเป็นบางส่วน ดังนั้นจึงนิยมใช้ส่วนปลายยอดหรือปลายราก ซึ่งมี meristematic cells อยู่ จึงมีโอกาสที่จะสำเร็จกว่าการเลือกเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนไปทำหน้าเฉพาะเจาะจงแล้ว (ไพบูลย์,2524) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเลี้ยงปลายรากที่มีเนื้อเยื่อเจริญ และผลการเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบซึ่งก็สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ โดยในกรณีนี้ต้นใหม่ที่ได้จะเกิดผ่านโครงสร้างคล้ายคัพภะ (embryoid-like structure) จากเนื้อเยื่อแม่ก่อน ดังนั้นจึงใช้เวลาในการเกิดเป็นต้นใหม่มากกว่าการเลี้ยงปลายรากที่เป็นการเกิดตายอด (shoot bud) โดยตรงจากเยื่อเยื่อแม่ (direct organogenesis) จากบริเวณกลุ่มเซลล์ท่อลำเลียง (ภาพที่ 9 และ 10) Torres (1957) ได้กล่าวว่าระยะเวลาที่เกิดยอดของพืชต่างชนิดกันย่อมที่จะไม่เท่ากัน หรือแม้แต่พืชชนิดเดียวกันก็มีระยะเวลาการเกิดยอดไม่เท่ากัน อาจมีสาเหตุมาจาก การที่ชิ้นส่วนของพืชก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในขณะที่ยังอยู่บนต้นเดิมได้รับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความยาวของวัน ความเข้มของแสง และระดับของน้ำ ซึ่งจะมีผลต่อระดับของ คาร์โบไฮเดรท โปรตีน และสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตต่าง ๆ ในต้นพืช โดยมีผลต่อชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงได้ หรือแม้แต่พืชชนิดเดียวกัน แต่ต่างอวัยวะ ก็มีความยากง่ายในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน แม้ว่ามีโอกาสที่จะเจริญเป็นต้นพืชได้ (totipotency) แต่โอกาสจะไม่เท่าเทียมกัน (ประสาสตร์ , 2536) ดังผลการทดลองเกี่ยวกับปลายรากและโคนก้านใบนี้

การเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบนั้น สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้โดยตรง หรือผ่านแคลลัสโดยพบว่าการเกิดยอดโดยตรงนั้นเกิดบริเวณเส้นกลางใบเป็นยอดเล็กๆ สีเขียวเข้ม และการเกิดผ่านแคลลัสเกิดจากแคลลัสสีเหลืองที่เกิดบริเวณเส้นกลางใบเช่นเดียวกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะ เส้นใบเป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยไซเลมอยู่ทางด้านบน หรือด้านหลังใบ ส่วนโฟลเอมอยู่ทางด้านล่างหรือท้องใบ เส้นใบนี้จะต่อกับท่อลำเลียงของก้านใบ และกิ่งหรือลำต้น โดยมีกลุ่มเซลล์เรียกว่า bundle sheath ซึ่งประกอบด้วยพาเรนไคมา หรือสเกลอเรนไคมา 1-2 ชั้น ล้อมรอบไม่มีคลอโรพลาสต์ และเส้นใบที่ใหญ่ที่สุดคือเส้นกลางใบ (สมบุญ,2537) การเกิดการเจริญและพัฒนาในการทดลองนี้เป็นไปดัง ไพบูลย์ (2524) เคยกล่าวว่า การเจริญและพัฒนาเป็น ต้น ราก หรืออวัยวะอื่นโดยตรงนั้น เกิดจากเนื้อเยื่อเปลี่ยนจากเซลล์ธรรมดา เป็น meristematic cells และเกิดเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือรากโดยตรง ตัวอย่างเช่น การลอกเอาเนื้อเยื่อส่วนผิวของใบ (epidermal tissue) 1-2 ชั้น มาเลี้ยงบนอาหาร พบว่าเซลล์บางกลุ่มอาจจะเกิดการรวมตัว มีการสร้าง โปรตีน และ RNA เพิ่มขึ้น และมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงและกลายเป็น meristematic cells ในที่สุด ซึ่งจะเจริญเป็นยอดหรือรากต่อไป

การเกิดตายอดดังกล่าวเกิดจากกลุ่มเซลล์ใกล้ท่อลำเลียงที่เปลี่ยนเป็นกลุ่มเซลล์ที่ตื่นตัว (active cells) ก่อน แต่การเกิดตายอดจากราก เกิดจากรากที่มีกลุ่มเซลล์ตื่นตัวอยู่แล้ว ส่วนการที่เนื้อเยื่อจากใบสามารถเกิดแคลลัสก่อนได้ด้วย น่าจะเป็นเพราะระดับของสารกระตุ้นการเจริญในเนื้อเยื่อแม่จากทั้งสองส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัดส่วนของไซโตไคนินต่ออ๊อกซินแตกต่างกัน

ส่วนการเลี้ยงแคลลัสแบบเกาะกันหลวมๆนั้นสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดและต้นใหม่ได้แต่ลักษณะของต้นใหม่ที่เกิดมีอาการฉ่ำน้ำ และเกิดแต่รากเล็ก สำหรับแคลลัสที่เกาะกันแน่นนั้น ชิ้นส่วนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ และไม่มีอาการฉ่ำน้ำ และจำนวนต้นที่ได้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร ดังพรทิพย์และคณะ(2529) กล่าวว่า โดยทั่วไปแล้วอาหารที่มีอัตราส่วนของอ๊อกซินสูงกว่าไซโตไคนินมากมักจะกระตุ้นให้เกิดแคลลัสที่มีสีค่อนข้างขาว และเกิดรากขึ้นเป็นจำนวนมาก ส่วนอาหารที่มีระดับไซโตไคนินสูงเกินไป มักจะได้แคลลัสที่เป็นปุ่มก้อนแข็งสีเขียวจัด และกลายเป็นสีน้ำตาลหรือดำ ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยง ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมคือ อาหารที่มีระดับฮอร์โมนไม่สูงมากนัก และอัตราส่วนของไซโตไคนิน กับอ๊อกซิเจนค่อนข้างใกล้เคียงกัน

2.1.2 ตำแหน่งของชิ้นส่วนแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยง

การเลี้ยงชิ้นส่วนจากปลายรากขึ้นมา 5 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 2 มม พบว่ามีเพียงตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นตำแหน่งปลายราก และตำแหน่งที่ 2 เท่านั้น ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ แต่ตำแหน่งที่ 2 เกิดได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และต้นใหม่ที่ได้เกิดเป็นยอดกระจุก ในขณะที่การเลี้ยงปลายรากตำแหน่งที่ 1 สามารถเกิดต้นใหม่ได้โดยตรง 100 เปอร์เซ็นต์ จากเนื้อเยื่อแม่ส่วนตำแหน่งอื่นชิ้นส่วนกลายเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด (การทดลองที่ 1.2) จากการศึกษาปลายรากที่ตัดตามยาว พบว่ารากมีการเติบโตปฐมภูมิโดยส่วนปลายรากประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญซึ่งมีการแบ่งตัวควบคู่กับการขยายขนาดของเซลล์ มีผลทำให้รากยาวเพิ่มขึ้น และถูกดันลงสู่ดินเรื่อยๆ ในขณะที่เนื้อเยื่อเจริญจะเลื่อนลงสู่ปลายรากตลอดเวลา ส่วนคอนบนจะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อถาวรเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ ดังนั้นบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic zone) จึงเป็นบริเวณที่อยู่ถัดจากหมวกรากขึ้นมายาวประมาณ 1-2 มม ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งตัวแบบไม่โตซิสตลอดเวลา บริเวณถัดมาเป็นบริเวณเซลล์ยืดขยายตัวตามยาว (elongation zone) เซลล์บริเวณนี้เจริญมาจากเซลล์ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญและหยุดแบ่งตัวแล้วมีการขยายขนาดทางด้านยาวเพิ่มขึ้นก่อนจึงค่อยๆ ขยายตัวตามกว้างอีกเล็กน้อยทำให้รากยาวออกไป

(สมบุญ,2537) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ คือที่ตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นตำแหน่งปลายรากสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้โดยตรง ในขณะที่ตำแหน่งที่ 3 มีเพียงการยืดออกมาของชิ้นส่วนเท่านั้นแล้วก็แห้งตาย ยอดที่เกิดจากปลายรากพบว่าเกิดเป็นยอดกระจุกและเจริญเป็นยอดใหม่และต้นใหม่ได้ เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าสามารถเห็นส่วนที่เป็นตายอด (bud) เจริญอยู่ภายในรากตั้งแต่เลี้ยงได้เพียง 6 วัน ทั้งนี้เพราะชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงนั้นเคยเลี้ยงจากอาหารที่มี BAP อยู่ก่อนแล้ว จึงอาจชักนำจุดเริ่มต้นตายอดให้เกิดขึ้นก่อนแล้ว

การทดลองเลี้ยงก้านใบ 4 ตำแหน่ง นับจากใบจริงที่แก่ที่สุด และตำแหน่งจากโคนก้านใบขึ้นมา 5 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 2 มม พบว่ามีพียงตำแหน่งที่ 1 จากโคนก้านใบเท่านั้นที่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้นใหม่ได้ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะบริเวณโคนก้านใบมีชั้นเซลล์ mristematitic cell ติดอยู่ แต่ชั้นเซลล์ที่อยู่สูงขึ้นมาเป็นเซลล์ที่แก่กว่า (เนื้อเยื่อถาวร) ซึ่งต่างจากงานทดลองของ สอาด (2533) ที่เลี้ยงก้านช่อดอกอ่อนส่วนปลายช่อมีแนวโน้มที่จะเจริญ เติบโตสร้างแคลลัสและต้นแขนงได้ดีกว่าก้านช่อดอกส่วนโคนช่อ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากบริเวณส่วนปลายช่อมีเนื้อเยื่อเจริญ และสารควบคุมการเจริญเติบโตบางอย่างมากกว่าในเนื้อเยื่อพืชส่วนโคนช่อ ซึ่งเนื้อเยื่อบริเวณนี้ ส่วนใหญ่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อถาวรแล้ว สำหรับก้านใบ 4 ตำแหน่ง พบว่าการใช้ใบที่ 3 ซึ่งเป็นตำแหน่ง ใบกึ่งอ่อน ได้ผลดีที่สุด คือให้จำนวนต้นใหม่เฉลี่ยมากที่สุด และใช้เวลาในการเกิดน้อยที่สุด และยังเกิดได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการทดลองของ Alderson *et al.* (1983) และ Le Nard *et al.* (1987) รายงานการเกิดยอดใหม่จากก้านทิวลิปเป็น 46 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (อ้างจาก Hulscher *et al.*,1992) นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยง โคนก้านใบที่แก่ที่สุดไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้เลย ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าตำแหน่งใบที่ต่างกันก็จะมีสมดุลย์ของอ๊อกซินต่อไซโตไคนินที่แตกต่างกัน และตำแหน่งใบที่ 3 มีสัดส่วนของอ๊อกซินกับไซโตไคนินภายในเนื้อเยื่อเอง ซึ่งเมื่อรวมกับที่เติมลงไปในอาหารแล้วอยู่ในระดับพอเหมาะสำหรับการเกิดยอดได้ดีที่สุด แต่เมื่อใบอ่อนหรือแก่เกินไป แม้ว่าจะเติมสารทั้งสองลงไปในปริมาณที่เท่ากันแต่ก็ให้ผลที่แตกต่างกัน ขณะที่พบว่าโคนก้านใบของกล๊อกซีเนียขนาด 0.3 ซม นั้นก้านใบกึ่งอ่อนและกึ่งแก่ก็เหมาะที่จะนำมาชักนำให้เป็นต้นกล้าเช่นเดียวกัน นอกจากนี้งานทดลองนี้ก็ได้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Rice *et al.* (1983) ที่เลี้ยงชิ้นส่วนโคนและข้อแรกของก้านดอกทิวลิปพันธุ์ Merry Widow ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 20 - 25 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งดีกว่าการใช้ตำแหน่งที่สูงกว่าข้อแรก

ก้านใบของใบที่ 1 (นอกสุด) ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ อาจเป็นเพราะสัดส่วนของ อ๊อกซินต่อไซโตไคนินได้เปลี่ยนไปมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ว่า ใบที่ 1 ใช้เวลานานที่สุดในการสร้างยอด หรือเกิดยอดใหม่ ในขณะที่ใบที่ 3 ใช้เวลาน้อยที่สุด ในทำนองเดียวกันเหตุผลนี้น่าจะใช้อธิบายได้กับใบที่ 2 และ 3 เท่านั้น ที่ให้รากใหญ่ได้ ในขณะที่ใบที่ 3 และ 4 ก้านใบมีสีเหลืองซีดประมาณครึ่งหนึ่งของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นทั้งหมด นอกจากนี้ยังเกิดแคลลัสเกาะกันแน่นเป็นก้อนกลมผิวมันมีสีขาว ที่ดูเหมือนจะเป็นคัพภะเทียม

2.1.3 การตัดแบ่งชิ้นส่วน

การไม่ผ่า ผ่าครึ่ง หรือผ่าสี่ส่วนยอดจากยอดกระจุก ให้ผลเรื่องจำนวนยอดใหม่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ ใช้เวลาในการเกิดยอดหรือรากไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แต่พบว่าการผ่าสี่ส่วน เกิดยอดได้มากที่สุด คือ 87 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการไม่ผ่าและผ่าครึ่งสามารถเกิดยอดได้ 70 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่างจากผลการทดลองของ Mohamed-Yasseen (1994) ซึ่งทำการทดลองตัดแบ่งยอดของ กระเทียม และ หอมแบ่ง ตามยาว พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากกว่าการไม่ตัดแบ่ง 3-8 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากการลดการข่มของตายอด เมื่อเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดได้รับความเสียหาย หรือถูกตัดออกไป ในทำนองเดียวกันการไม่ผ่า ผ่าครึ่ง หรือผ่าสี่ส่วนก้านใบตามยาว โดยเฉพาะบริเวณโคนใบพบว่าได้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่การผ่าสี่ส่วนสามารถเกิดยอดได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การไม่ผ่า หรือผ่าครึ่งเกิดได้เพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ชิ้นส่วนที่ไม่เกิดยอดนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อาจเป็นเพราะการที่เนื้อเยื่อแม่ซึ่งแก่แล้วติดมามากให้ผลเสียหายต่อการเลี้ยง หรือการตัดแบ่งนี้บางชิ้นส่วนตายไปเนื่องจากเมื่อผ่าโดยใช้มีดผ่าตัด ซึ่งอาจจะยังร้อนอยู่ หลังจากลนไฟฆ่าเชื้อ มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณนั้นที่ถูกตัดแบ่ง

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจำนวนยอดที่เกิดต่อชิ้นส่วนยอดจากยอดกระจุก หรือก้านใบจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม แต่หากมองในแง่การขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากแล้วควรมีการผ่าแบ่งเพื่อการเพิ่มปริมาณยอดอย่างรวดเร็ว ในทำนองเดียวกันการทดลองการผ่าแบ่งตามยาวโดยใช้เฉพาะโคนก้านใบนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพผลของการทดลองที่ 1.1 ให้ดีขึ้นเช่นกัน

2.2 ปัจจัยที่เกิดจาก สารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง

2.2.1 การเลี้ยงชิ้นส่วนปลายราก

ชิ้นส่วนปลายราก สามารถเกิดเป็นยอดได้จำนวนเฉลี่ยไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือมีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D หรือ BAP หรือการใช้ทั้ง 2 อย่างรวมกัน แต่บนอาหารที่เติม BAP 1 มก/ล ลงไปด้วย สามารถเกิดยอดได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าอาหารอื่น และใช้เวลาในการเกิดยอดน้อยที่สุด จากการทดลองนี้ยังพบว่าบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต รากก็สามารถเกิดเป็นยอดใหม่ได้ เช่นกันแต่เกิด 40 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะว่าปลายรากที่นำมาทดลองมีสารควบคุมการเจริญเติบโต (endogenous hormones) คือออกซินต่อไซโตไคนินพอเพียงสำหรับกระตุ้นให้เกิดยอดได้อยู่แล้วซึ่งอาจมาจากทั้งตัวพืชเองได้สะสมไว้จากอาหารเลี้ยงที่มี BAP เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสก่อนหน้านั้นแล้ว และเมื่อเติม BAP 1 มก/ล ก็ช่วยให้ชิ้นส่วนที่เลี้ยงเกิดยอดเป็นเปอร์เซ็นต์สูงขึ้น เกี่ยวกับการเลี้ยงรากได้มีงานทดลองของ Laublin *et al.* (1991) ที่นำรากและใบของ rhizomatous Iris มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาพแสงต่ำ บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 22.5 μM หรือ NAA 5.4 μM และ kinetin 0.5 μM พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อย้ายแคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 9 หรือ 22 μM หรือ kinetin ความเข้มข้น 5 μM และ TIBA 2 μM หรือ BA และ TIBA 9 และ 4 μM พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็น somatic embryo และ พัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อนได้ แต่งานทดลอง Jehan *et al.* (1994) รายงานว่าแคลลัสเกิดจากการเลี้ยงไรโซมของไอริส บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP, NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 , 1.0 และ 10 มก/ล ตามลำดับ และ kinetin 0.1 หรือ 1 มก/ล ไม่พบการเกิดแคลลัสจากราก

2.2.2 การเลี้ยงชิ้นส่วนโคนก้านใบ

บนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนโคนก้านใบเกิดยอดหรือรากได้ ส่วนการเติม 2,4-D 0.05 มก/ล หรือ BAP 1 มก/ล ลงในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดได้จำนวนและเวลาที่ใช้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธีอย่างไรก็ตามบนอาหารที่มี BAP 1 มก/ล ชิ้นส่วนสามารถเกิดยอดได้ดีที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสนับสนุน สอาด (2533) ที่รายงานว่า BA มีผลต่อการเจริญเติบโต การสร้าง

ยอดและต้นแขนงของเนื้อเยื่อส่วนก้านช่อดอกอ่อนของแกลดิโอลัส กล่าวคือ BA ความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการเติบโตของต้นแขนง และ BA ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะส่งเสริมการเจริญเติบโต การเกิดตายอด และต้นแขนงของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้การใช้ไซโตไคนินอย่างเดียวจะให้ผลดี และควรหลีกเลี่ยงการใช้อ๊อกซิน เพื่อมิให้เนื้อเยื่อสร้าง แคลลัสขึ้น ซึ่งจะทำให้โอกาสกลายพันธุ์ลดลง นอกจากนี้เจริญ (2533) รายงานว่า อ๊อกซินและไซโตไคนินในอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสม เป็นไปตามความต้องการของแต่ละพืช สำหรับก้านใบของกล็อกซิเนียนั้น อัตราความเข้มข้นที่เหมาะสม ของอ๊อกซินต่อไซโตไคนินจะอยู่ในช่วง 1:5 มีผลต่อการพัฒนา เกิดเป็นต้นใหม่ได้จำนวนมาก แต่หากใช้อ๊อกซินเดี่ยวๆ ก็จะไปชักนำการสร้างจุดกำเนิดราก (root primodia) แต่ถ้าหากเพิ่มอัตราส่วนไซโตไคนิน ก็จะไปมีผลต่อการสร้างจุดกำเนิดยอด (shoot primodia) เพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งการทดลองนี้ก็เช่นเดียวกัน เมื่อเลี้ยงโคนก้านใบบนอาหารที่มีเฉพาะ 2,4-D เท่านั้น ที่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดรากได้ (การทดลองที่ 2.2) แต่ประศาสตร์ (2536) เลี้ยงก้านใบและแผ่นใบของต้นกล็อกซิเนียบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม BAP 3 สตล IAA 1 สตล และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือนจะเกิดต้นขึ้นจำนวนมากบนแผ่นใบและก้านใบ

2.2.3 การเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบ

เมื่อใช้ BAP 0.5 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D ทุกความเข้มข้นคือ 0-0.2 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแผ่นใบในส่วนที่ติดเส้นกลางใบได้ ส่วนอาหารที่เติม BAP 0.5 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D 0.05 มก/ล ทำให้เกิดยอดได้มากที่สุดแต่ถ้าลดหรือเพิ่ม 2,4-D ทำให้เกิดยอดน้อย แต่แคลลัสเกิดมากเมื่อสมดุลย์ของ BAP ต่อ 2,4-D เปลี่ยนไปคือ BAP 0.5-1.0 มก/ล ต่อ 2,4-D 0.025-0.2 มก/ล และแคลลัสที่ได้นี้ สามารถชักนำให้เกิดเป็นยอดใหม่ได้ถ้าปรับอัตราส่วน BAP ต่อ 2,4-D เป็น 5:1 แสดงให้เห็นว่าถ้าไม่มีการปรับอัตราส่วนของ BAP ต่อ 2,4-D ลง BAPจะมีอิทธิพลในการยับยั้งไม่ให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ เพราะมีปริมาณเข้มข้นเกินไป ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าจากการทดลองจะเห็นแผ่นใบผิดปกติ แต่แคลลัสที่เกิดผ่านใบนี้สามารถเกิดต้นปกติได้ อาจเป็นไปได้ว่า โดยปกติแล้วแผ่นใบของพืชจะไม่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) แต่เราสามารถกระตุ้นให้เซลล์ต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของใบเกิดการตื่นตัวขึ้นมาอีกครั้ง ให้มีการแบ่งตัว และพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (ประศาสตร์, 2536) ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญดังกล่าวที่เกิดขึ้นภายหลัง คงมีลักษณะปกติ จึงทำให้ได้ยอดที่มีสภาพทางสรีรวิทยาเป็นปกติ สำหรับการที่ใบกลายเป็นสีน้ำตาลในบางช้ำนั้นเกิด

จากแผ่นใบขยายขนาดและรอยตัดบางส่วนไม่สัมผัสกับอาหารจึงเกิดการตายขึ้น อัตราการสะสมของสารฟีโนลิคสูง ซึ่งเป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชเอง หากมีการสะสมของสารประกอบนี้มากกว่า และเร็วกว่าอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อก็จะทำให้เนื้อเยื่อตายไปในที่สุด (พรทิพย์ และคณะ,2533)

2.2.4 การเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัส

ชิ้นส่วนแคลลัสแบบเกาะกันหลวมๆ เกิดยอดได้แต่ใช้เวลานานมากคือพบยอดเมื่อก้อนแคลลัสใหญ่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารที่ผลิตขึ้นในก้อนแคลลัสนั้นมีอิทธิพลต่อการเกิดยอดใหม่ในภายหลัง ผลการศึกษาพบว่า 2,4-D ระดับ 0.025, 0.05 และ BAP 0.5 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมาก แต่ถ้าใช้ BAP ตั้งแต่ 1 มก/ล ขึ้นไป ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมตามปกติกลับทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดลดลง ในการทดลองนี้ 2,4-D ช่วยให้เกิดยอดและรากเร็วขึ้น แสดงว่าแคลลัสที่นำมาเลี้ยงมีการสะสมไซโตไคนินอยู่ค่อนข้างสูงแล้ว การเติม 2,4-D จึงช่วยปรับสมดุลย์สัดส่วน ไซโตไคนิน:อ๊อกซิน ให้เหมาะสมขึ้น และการที่ BAP ความเข้มข้นสูงทำให้ใบฉ่ำน้ำเป็นการยืนยันผลดังกล่าวด้วย สอดคล้องกับรายงานของพรทิพย์และคณะ (2529) ที่ว่าการกระตุ้นให้แคลลัสสร้างตายอด (shoot bud) ได้นั้น อาหารที่ใช้เป็นอาหารที่มีระดับไซโตไคนินค่อนข้างสูงกว่าอ๊อกซิน งานทดลองในครั้งนี้พบว่าต้นสามารถเกิดรากได้มากที่สุด 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีเฉพาะ BAP ความเข้มข้นต่ำ 0.005 มก/ล และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของอ๊อกซิน 0.05 มก/ล พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดรากน้อยลงจนไม่สามารถเกิดรากได้ อาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ให้เมื่อรวมกับอ๊อกซินภายในเนื้อเยื่อแล้วเข้มข้นเกินไป ในขณะที่ Enaksha (1994) เลี้ยงแคลลัสของ Easter lily บนอาหารที่มี 2,4-D และ BAP เข้มข้นเท่ากันคือ 0.1 ม/ล ภายในเวลา 3-5 สัปดาห์จึงเกิดต้นใหม่ แต่ต้นใหม่ที่ได้มีอาการบวมและฉ่ำน้ำ

ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อแคลลัสชนิดเกาะกันแน่นก็คล้ายกับที่มีผลต่อแคลลัสชนิดที่เกาะกันหลวม แต่แคลลัสชนิดเกาะกันหลวมทนต่อ BAP และ 2,4-D ระดับสูงได้น้อยกว่า ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะการเกิดแคลลัสชนิดที่ต่างกันนั้นเป็นเพราะอิทธิพลที่ได้รับจากไซโตไคนินต่ออ๊อกซินที่ต่างกันอยู่แล้ว คุณภาพของต้นจากแคลลัสทั้งสองชนิดก็แตกต่างกันด้วย กล่าวคือ แคลลัสที่ฉ่ำน้ำ (เกาะกันหลวม) ก็ให้ต้นที่ฉ่ำน้ำ แต่ยอดใหม่ที่เกิดจากการไม่เติม BAP ไม่แสดงอาการฉ่ำน้ำ

Van der Valk *et al.* (1992) พบว่าอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ และแคลลัสของ *Allium* ที่เป็นแคลลัสแน่น สามารถพัฒนาเป็นคัพภะเทียม ได้เมื่อใช้ kinetin ในสูตรอาหาร MS หรือการทดลองของ นิรันดร์และคณะ (2536) สามารถชักนำเนื้อเยื่อส่วนฐานของ *Allirm cepa* ให้เกิดแคลลัสแน่น ได้ในเวลา 6 สัปดาห์ หลังการเพาะเลี้ยง และแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงส่วนฐานต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก/ล เมื่อย้ายลงบนอาหารสูตร MS ที่มี IAA ความเข้มข้น 0.1 มก/ล ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลานาน 15 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็น คัพภะเทียมได้ และเจริญเติบโตเป็นต้นหลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองนี้คือการใช้ BAP ร่วมกับ 2,4-D สามารถชักนำให้แคลลัสทั้ง 2 ชนิด เกิดยอด โดยผ่านแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ หรือผ่าน embryogenic callus ซึ่งเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่นและมีผิวมัน แต่ใช้เวลานานถึง 26 สัปดาห์

3. ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ ในการใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ขยายพันธุ์ในหลอดแก้ว แต่ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธียังใช้เวลานาน จึงสมควรหาวิธีให้ได้ยอดในเวลาที่สั้นขึ้น และน่าจะทำการวิจัย และพัฒนาให้สามารถขยายปริมาณมากอย่างรวดเร็วได้