บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

น้อยหน่าเป็นไม้ผลเมืองร้อนมีแหล่งกำเนิดในแถบร้อนและแห้งแล้งที่สุดของอเมริกากลาง และแถบ ที่ราบสูงของประเทศเปรู และอิคัวดอร์ ชาวปอร์ตุเกสได้นำน้อยหน่าไปปลูกที่ประเทศอินเดีย และมีการแพร่กระจายไปยังเขตร้อนของอียิปต์ หมู่เกาะอินดีสตะวันตก และจาไมก้า สำหรับประเทศไทยเข้าใจว่าอาจเป็นชาวปอร์ตุเกสหรือชาวอังกฤษที่นำน้อยหน่าเข้ามาปลูกเป็นครั้งแรกถ้าเป็นชาวปอร์ตุเกสคงนำเข้าครั้งแรกระหว่างปี พ.ศ. 2060 - 2230 และปลูกครั้งแรกที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาหรือลพบุรี เพราะมีน้อยหน่าพันธุ์ดีที่ลพบุรีชื่อ "น้อยหน่าพระที่นั่งเย็น" หรือ "น้อยหน่าพระนารายณ์" ถ้าเป็นชาวอังกฤษคงนำเข้าครั้งแรกเมื่อหลังปี พ.ศ. 2155 ในสมัยสมเด็จพระเอกาทศรถ และมีปลูกตั้งแต่จังหวัด ประจวบคีรีขันท์ เพชรบุรี นครปฐม จนถึงพระนครศรีอยุธยา และลพบุรี (เกศิณี, 2530)

ปัจจุบันน้อยหน่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของ บราซิล อียิปต์ อิสราเอล อัฟริกากลาง อินเดีย และบางประเทศในแถบเอเชียตอนใต้ (เกศิณี, 2530)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไป

ในทางอนุกรมวิธานได้จัดจำแนกน้อยหน่าไว้ดังนี้

Class Dicotyledoneae

Order Ranales

Family Annonaceae

Genus *Annona*

Species *squamosa*

เกศิณี (2530) ได้รายงานเกี่ยวกับน้อยหน่าไว้ดังนี้ น้อยหน่าเป็นไม้ผลประเภทไม้ยืนต้นขนาดเล็กเป็นไม้ผลัดใบ ทรงต้นเป็นพุ่มสูงประมาณ 5 - 8 เมตร

ลำต้น ลำต้นแท้สูงประมาณ 300 ซม แตกกิ่งก้านสาขาเป็นกิ่งหลัก กิ่งรอง กิ่งแขนง และกิ่งย่อย การแตกกิ่งก้านจะอยู่ในระดับต่ำ ลำต้นและกิ่งค่อนข้างอ่อนแอ เปราะ และหักง่าย เปลือกลำต้นค่อนข้างเรียบสีน้ำตาล มีร่องตื้นตามความยาวของเปลือก ใบเป็นใบเดี่ยวและเรียงสลับ ไม่มีหูใบ ใบยาว 5 - 17 ซม ใบมีรูปร่างคล้ายหอก ปลายใบแหลมหรือเป็นรูปลิ่ม ที่โคนใบปกคลุมด้วยขนอ่อน

ละเอียดทั้งสองด้าน ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน เมื่อแก่มีสีเขียวปนน้ำตาล ใบอ่อนแตกใหม่มีขนมากเมื่อแก่มีขนน้อยจนเกือบไม่มีเลย เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่น

ดอก ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือเกิดเป็นช่อ ดอกสมบูรณ์เพศประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 3 กลีบ แยกกัน ยาวประมาณ 2.5 - 3.5 ซม เกสรตัวผู้มีจำนวนมากประมาณ 182 - 185 อัน ประกอบด้วยก้านและอับละอองเกสรรวมกันอยู่เป็นกลุ่มรอบเกสรตัวเมีย ซึ่งมีรังไข่จำนวนประมาณ 80 - 119 อัน

น้อยหน่าจะผลัดใบและพักตัวประมาณเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ และผลิตตารวมให้ใบและดอกพร้อมกันหลังจากได้รับความชื้นอีกครั้งหนึ่ง ดอกเกิดเป็นกลุ่มๆละ 2 - 5 ดอกที่จุดเดียวกันบนลำต้น ส่วนใหญ่ดอกมีขนาดใหญ่ที่สุดตรงกลางเท่านั้นที่จะเจริญเติบโตและติดผล ต้นขนาดกลางมีดอกประมาณ 1,000 - 1,500 ดอกต่อปี หรือเกิดเป็น 3 - 5 รุ่น รุ่นแรกมีดอกบาน 20 - 30 เปอร์เซ็นต์ น้อยหน่ามีการผสมข้ามเนื่องจากเกสรตัวเมียพร้อมผสมได้ก่อนเกสรตัวผู้ คือ เกสรตัวเมียจะรับเกสรตัวผู้ได้ 1 - 2 วันก่อนวันดอกบาน ส่วนอับละอองเกสรจะแตกออกมาระหว่าง 11.30 - 14.30 น ของวันที่ดอกบาน การผสมเกสรทำได้ดีในช่วง 09.00 - 12.00 และ 14.30 - 17.30 น โดยทั่วไปดอกจะติดผลได้ประมาณ 4 - 6 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

ผล ผลน้อยหน่าเป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) รังไข่แต่ละอันเจริญเป็นผลย่อย (fruitlet) อยู่บนฐานรองดอกอันเดียวกัน เนื้อของผลเป็นส่วนที่เจริญเข้ามาข้างในของรังไข่นั่นเอง ผนังรังไข่เจริญเป็นเปลือกของผล ไข่เมื่อได้รับการผสมแล้วเจริญเป็นเมล็ด ส่วนที่หุ้มห่อไข่กลายเป็นเปลือกหุ้มเมล็ด

เมล็ด เมล็ดมีเปลือกหุ้มแข็งแรง มีอาหารสะสมอยู่จำนวนมาก มีคัพภะขนาดเล็ก มีถุงน้ำมันภายในเยื่อพาเรนไคมา

ลักษณะและชนิดของน้อยหน่า (เกศิณี, 2530)

น้อยหน่าที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Annona squamosa* Linn. เป็นพืชในตระกูล Annonaceae ซึ่งต้นไม้ในตระกูลนี้มีจำนวนมากกว่า 50 ชนิด มีชนิดที่เป็นไม้ผลและได้รับความนิยมแพร่หลายในการรับประทานอีก 4 ชนิด คือ

1. เชริมัวยา (Cherimoya : *Annona cherimola* Mill.)
2. ทุเรียนเทศ (Sour sop : *A.muricata* L.)
3. น้อยโหน่ง (Custard apple, Bullock's heart : *A.reticulata* L.)
4. อิลามา (Ilama : *A. diversifolia* Saffofd.)

พันธุ์น้อยหน่า แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของผลทั้งภายนอกและภายในแต่ละกลุ่มยังสามารถแบ่งออกเป็นพันธุ์ย่อยได้อีกดังนี้

1. กลุ่มน้อยหน่าพื้นเมืองหรือน้อยหน่าฝ้าย เป็นน้อยหน่าที่มีปลูกอยู่ดั้งเดิมแล้ว น้อยหน่าพื้นเมืองพันธุ์ดีมีแหล่งกำเนิดอยู่ในจังหวัดลพบุรี แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของผลดังนี้

พันธุ์พื้นเมืองผลสีเขียวหรือ “น้อยหน่าฝ้ายเขียว” มีใบสีเขียวเข้ม ผลรูปหัวใจขนาดใหญ่กว่าพันธุ์อื่น เมื่อแก่เต็มที่ผิวของผลมีสีเขียว ร่องตาตื้นและมีสีออกขาว ผลอ่อนนุ่ม เนื้อสุกมักแตกออกจากขั้ว เนื้อหยาบเป็นทราย เนื้อสีขาวกลิ่นหอม รสหวานจัด นิยมปลูกกันทั่วไป

พันธุ์พื้นเมืองผลสีม่วง หรือ “น้อยหน่าฝ้ายครั่ง” มีใบสีเขียวคล้ำ ผลรูปหัวใจขนาดเล็กกว่าพันธุ์อื่น เมื่อแก่เต็มที่ผิวของผลมีสีม่วงเข้ม ตานูน ร่องตาสีชมพู ผลสุกจะอ่อนนุ่ม เนื้อสีขาวอมชมพู เนื้อเละและยุ่ย กลิ่นหอม รสหวานน้อยกว่า แต่ค่อนข้างมันกว่าพันธุ์อื่น

2. กลุ่มน้อยหน่าหนังหรือน้อยหน่าญวน เป็นน้อยหน่าที่นำเข้าจากเวียดนามเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดย ภคินี คาซีบีในปี พ.ศ. 2475 โดยปลูกที่อารามแม่พระอุบลราชธานี แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะของผลดังนี้

พันธุ์หนังเขียว เป็นน้อยหน่าพันธุ์ดั้งเดิมที่นำเข้ามีใบสีเขียวเข้ม ผลแก่มีสีเขียวนวลตากว้างไม่ค่อยนูน ร่องตาตื้นสีเขียวอ่อน เนื้อสีขาว เนื้อละเอียด เปลือกร่อนเป็นแผ่นออกจากเนื้อได้ง่าย เนื้อมาก เนื้อเหนียว กลิ่นหอม รสหวาน

พันธุ์หนังทอง เป็นน้อยหน่าหนังเขียวที่ผ่าเหล่า เกิดจากการปลูกน้อยหน่าเขียวด้วยเมล็ดเมื่อปี พ.ศ. 2502 มีใบสีเหลืองทอง ร่องตาตื้น ผลสุกอ่อนนุ่ม เปลือกล่อนออกจากเนื้อได้หมด เนื้อละเอียด เนื้อกลิ่นหอม รสหวาน แต่ติดผลไม่ดกเท่าพันธุ์หนังเขียว

พันธุ์หนังสีครั่ง เป็นน้อยหน่าหนังเขียวที่ผ่าเหล่า เกิดจากการปลูกน้อยหน่าด้วยเมล็ดที่ตำบลหมูลี อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา มีลักษณะต้นคล้ายน้อยหน่าพันธุ์พื้นเมือง ผลสีม่วง ลักษณะผลคล้ายน้อยหน่าพื้นเมืองผลสีม่วง แต่ตาตื้น ตาใหญ่กว่า ร่องตาสีชมพูเข้ม ติดผลหนักกว่าพันธุ์หนังทอง

การขยายพันธุ์น้อยหน่า

น้อยหน่าขยายพันธุ์ได้ทั้งโดยวิธีอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ดังนี้

1. การขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศ ในประเทศไทยยังนิยมการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดอยู่ เมล็ดควรล้างน้ำให้สะอาดและไม่มีเนื้อติด นำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่มหรือผึ่งแดด ถ้าผึ่งแดดควรใช้กระด้ง หรือเสื่อรำแพน ตากให้แห้งเพียงครึ่งวัน ไม่ควรตากลงบนพื้นลานซีเมนต์โดยตรงเพราะเมล็ดจะร้อนทำให้คัพภะตาย หลังจากนั้นคลุกด้วยยากันรา เช่น แคปแทน หรือ ไดโฟลาแทน อัตรา 1 ช้อนแกงต่อเมล็ด 5 กิโลกรัม บรรจุในถุงพลาสติกผนึกปากให้สนิท หรือใส่กระป๋อง ปิดปากให้แน่น เก็บไว้ที่เย็นและแห้ง

การเพาะเมล็ดเพื่อจำหน่ายกล้าเป็นการค้า นิยมเพาะเมล็ดใส่ถุงพลาสติก โดยกรอกดินในช่วงเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม หยอดเมล็ดลงไปถุงละ 2 - 3 เมล็ด เมล็ดจะเริ่มงอกหลังจากเพาะได้ประมาณ 15 วัน พอถึงเดือนเมษายนจะได้ต้นกล้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 4 มม ต้นกล้าขนาดนี้สามารถจำหน่ายได้ แต่ถ้าต้องการปลูกให้ต้นรอดตายมากที่สุดควรใช้ต้นกล้าที่มีอายุ 1 ปีขึ้นไป

2. การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ทำได้โดยการติดตา และการต่อกิ่ง (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2531) การต่อกิ่งแบบเสียบข้าง มีการทดลองโดยใช้ต้นตอเป็นน้อยหน่าหนังที่มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 4-5 มม กิ่งพันธุ์ดีมีตาอย่างน้อย 2 ตา และความยาวประมาณ 8.5 ซม พบว่าการต่อกิ่งในฤดูหนาวหรือเดือนธันวาคมมีเปอร์เซ็นต์การติดตามากที่สุดถึง 96.33 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำกิ่งที่ต่อไปปลูกในต้นฤดูฝนหรือเดือนพฤษภาคมได้เลย การต่อกิ่งในฤดูร้อนหรือเดือนเมษายนมีเปอร์เซ็นต์การติดรองลงมาคือ 76.67 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำกิ่งที่ต่อไปปลูกในกลางฤดูฝน กิ่งจะเจริญเติบโตไม่สู้ดีนัก ส่วนการต่อกิ่งในฤดูฝนหรือเดือนสิงหาคมมีเปอร์เซ็นต์การติดต่ำที่สุดคือ 72.33 เปอร์เซ็นต์ และกิ่งพันธุ์ดีเจริญเติบโตไม่นานก็เข้าฤดูหนาวจึงต้องดูแลรักษามากเป็นพิเศษ

การต่อกิ่งแบบเสียบเปลือกใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการเปลี่ยนยอดพันธุ์ ส่วนใหญ่นิยมใช้กับต้นตอที่ลอกเปลือกได้และทำในต้นฤดูฝนถึงปลายฤดูฝน (เกศิณี, 2530)

นอกจากนั้นยังสามารถใช้วิธีการปักชำกับน้อยหน่าได้ จากการทดลองของ Parri *et al.* (1990) ได้นำวิธีการปักชำกับ *Annona cherimola* Mill. โดยใช้ กิ่งชำอายุ 3 และ 5 ปี โดยนำกิ่งชำมาจากต้นในวันที่ 9 พฤษภาคม 20 กุมภาพันธ์ และ 12 ตุลาคม 1988 นำมาจุ่มใน IBA ความเข้มข้น 8,000 ppm หลังจากนั้นนำไปชำใน perlite โดยนำไปไว้ในที่ที่มีการพ่นละอองน้ำ ส่วนการปักชำรากจากต้นอายุ 5 ปีทำโดยนำไปจุ่มลงใน benlate 1 ก/ล และ biomicin 100 ppm แล้วคลุมด้วย perlite พบว่ากิ่งชำจากต้นที่ตัดในวันที่ 9 พฤษภาคม 1988 เมื่อนำขึ้นมาจากสารละลาย IBA มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุดคือ 39 เปอร์เซ็นต์ ในการปักชำรากพบว่าไม่สามารถเกิดยอดหรือตาใหม่ได้

สภาพการปลูกเลี้ยงโดยทั่วไป

น้อยหน่าขึ้นได้ดีในดินเกือบทุกชนิด ตั้งแต่ดินเหนียว ดินทรายจัด หรือดินลูกรัง หรือ แม้แต่ดินที่มีปูนปนอยู่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ น้อยหน่าชอบดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำดีและมีความเป็นกรดและด่างประมาณ 5.5 – 7.4 น้อยหน่าชอบอากาศร้อนแห้ง ไม่ชอบอากาศหนาวจัดหรือมีฝนชุกมากจนเกินไปจนน้ำขัง แหล่งที่มีการปลูกน้อยหน่าจึงมักเป็นที่ดอน และค่อนข้างแห้งแล้ง เช่น จังหวัดสระบุรี ลพบุรี ประจวบคีรีขันท์ อุบลราชธานี และจังหวัดอื่นๆ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้ระยะปลูก 3 × 3 เมตร หรือ 4 × 4 เมตร (เกศิณี, 2530)

ผลของธาตุอาหารต่อเจริญเติบโตของพืช โดยใช้ N, P และ K อย่างละ 3 ระดับต่อการปลูกน้อยหน่าพบว่าพืชเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มีระดับของ N สูงที่สุด ส่วนผลของธาตุอื่นๆ มีเพียงเล็กน้อยส่วนการเกิดดอกจะเกิดหลังจากให้ N และ P ที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลา 10 ถึง 15 วัน แต่ถ้าใช้ N และ P ในความเข้มข้นต่ำจะเกิดดอกช้าออกไป 60 วัน ดอกมีจำนวนมากขึ้นเมื่อใช้ N ในระดับที่สูงขึ้น และการเกิดผลจะถูกกระตุ้นเมื่อมี N และ ที่มีอยู่ในใบและลำต้นมีระดับสูง (Blake and Lemos, 1996a)

การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศล้วนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *Annona* spp. ที่ปลูกเป็นการค้า *Annona* บางพันธุ์ในต่างประเทศมีการขยายพันธุ์โดยใช้วิธีติดตา และต่อกิ่ง แต่อย่างไรก็ตามการแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นตอย่อมเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตจากกิ่งของกิ่งพันธุ์ และอาจทำให้คุณภาพของผลลดลง จึงพบว่าการขยายพันธุ์ผ่านต้นตอและกิ่งพันธุ์อาจถูกจำกัดโดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมดังกล่าว ซึ่งยกเว้นใน *Annona* บางพันธุ์ เช่น sugar apple (*A.squamosa*), cherimoya (*A.cherimola*) และลูกผสมของ *Annona* มีการขยายพันธุ์โดยใช้วิธีปักชำ แต่ยังไม่ค่อยประสบความสำเร็จ นอกจากนั้นการขยายพันธุ์น้อยหน่าทั้งวิธีอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศตามวิธีดังกล่าวจะได้ต้นพันธุ์ในปริมาณน้อย ดังนั้นในระยะเวลาที่ผ่านมานักวิจัยจึงได้พยายามศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับขยายพันธุ์น้อยหน่าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งการนำวิธีการขยายพันธุ์ในหลอดแก้วมาใช้กับบางพันธุ์ได้ผลดีกว่าการขยายพันธุ์โดยใช้วิธีการดั้งเดิม นอกจากนั้นได้มีการนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ ซึ่งก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อพืชไปเพาะเลี้ยง ควรมีการเตรียมเนื้อเยื่อพืชให้พร้อมเพื่อให้พืชมีอัตราการรอดตายมากที่สุด และมีอัตราการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่ำ ซึ่งเห็นได้จากการทดลองของ Bracho *et al.* (1999) ได้ศึกษาโดยนำปลายยอดจากต้นอายุ 6 ปีของ *Annona muricata* L. และ *A. glabra* L. เพื่อนำมาชักนำให้เกิดการแตกตาโดยคลุมยอดด้วยแผ่นโพลีเอทธีลีนเพื่อลดความเข้มแสงให้เป็น 26.66 เปอร์เซ็นต์ นำยอดจำนวนครึ่งหนึ่งไปพ่นด้วย ridomil (metalaxy กับ mancozeb) 2 ก/ล และ rifampicin 300 มก/ล จำนวน 2 ครั้ง คือ 5 วัน และ 1 วันก่อนการเก็บตัวอย่างพืช ฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชโดยแช่ไว้ใน sodium hypochlorite 5 นาที ตามด้วยแช่ใน ridomil 2 ก/ล เป็นเวลา 20 นาทีและ rifampicin 300 มก/ล เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (1962) เมื่อเลี้ยงไป 14 วัน ในทุกกรรมวิธีของพืชทั้ง 2 ชนิดไม่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย พบว่าชิ้นส่วนยอดของ *A. glabra* L. และ *A. muricata* L. ที่ pretreat ด้วย ridomil และ rifampicin ก่อนการเก็บเกี่ยวมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 10 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนยอดที่ไม่ได้ pretreat พบว่ามีอัตราการรอดตาย 55 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยหน่าทำได้จากหลายส่วนของพืช จากการทดลองของ Blake and Lamos (1996b) ได้นำส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) จากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดน้อยหน่า และจากตาที่ได้จากต้นน้อยหน่าอายุ 3 ปี โดยใช้ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ขนาด 1.5 ซม และตาไปเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM (Lloyd and McCown, 1981) ที่เติม BA ระดับต่างๆ พบว่า BA 35 มคม ทำให้เปอร์เซ็นต์ตาเปลี่ยนเป็นยอดได้สูงสุด

จากการศึกษาในพืชสกุลเดียวกับน้อยหน่าหลายชนิดพบว่าได้มีการศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้ส่วนต่างๆ ดังนี้

Mascarenhas *et al.* (1984) พบว่าเมื่อนำส่วนใบของ *A. cherimola* Mill. ที่เกิดจากต้นกล้าไปเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่มี BA และ kinetin พบว่าจะได้จำนวนยอดสูงสุดเมื่อใช้ฐานใบที่ติดก้านใบจาก ต้นกล้าที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 1,000 ลักส์

จากการศึกษาของ Aree *et al.* (1990) เพื่อหาชนิดของชิ้นส่วนพืช อาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง ชนิดและระดับของสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดต้นของพืช 5 ชนิด ซึ่งผลการทดลองได้เรียงตามผลที่ดีที่สุด ดังนี้

1. Cherimolas ใช้ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก/ล และ BA 0.1 - 1.0 มก/ล
2. Kiwifruits
    ก. ใช้ส่วนของปล้องเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือ อาหารของ Anderson ที่มี NAA 1.0 มก/ล และ BA 1.0 มก/ล หรือ
    ข. ใช้ส่วนตาเลี้ยงบนอาหาร MS หรืออาหารใดๆที่เติม NAA 0.3 มก/ล หลังจากนั้นย้ายลงบนอาหารที่เติม BA 1.0 มก/ล และ GA_3 0.01 มก/ล
3. Mountain pawpaw (*Carica pubescens*) ใช้ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง เลี้ยงบนอาหาร Nitsch หรือ MS หรือ Jordan (1988) ที่เติม NAA 1 มก/ล และ BA 0.8 มก/ล
4. Babaco (*C.pentagona*)ใช้ส่วนตาข้างเลี้ยงบนอาหารสูตร Nitsch ครึ่งส่วนที่เติม NAA มก/ล และ BA 0.8 มก/ล
5. Pepino (*Solanum muricatum*) ใช้ส่วนของตาข้าง เลี้ยงบนอาหารสูตร Jordan (1988) ที่มี NAA 0.3 มก/ล BA และ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01 มก/ล ตามลำดับ

Jordan *et al.* (1990) ได้รายงานการใช้พืชทดลอง 8 ชนิด คือ potatoes, pepino (*Solanum muricatum*), kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) ยาสูบ (ทุกพันธุ์ที่มีความเป็นไปได้สูงในการชักนำให้เป็นต้น), *Carica pentagona*, *Pouteria obovata* (*P.lucuma*), *C.pubescens* และ *Annona cherimola* (ทุกสายพันธุ์ที่ขยายพันธุ์ได้ยาก) โดยนำชิ้นส่วนพืชทั้ง 8 ชนิดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น (gelrite) 0.17 เปอร์เซ็นต์ และสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งจะเห็นผลการทดลองภายใน 40 วัน นอกจากนั้นยังได้มีการผสมกับพืชต่างชนิดและนำมาเลี้ยงพบว่าการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาของคู่ผสมที่น่าสนใจคือคู่ผสมของ *C.pentagona* × *S.muricatum* และ *P.obovata* × *S.muricatum* โดยมีการเพิ่มจำนวนยอดและราก และคู่ผสมของ *A.deliciosa* × *A.cherimola* เกิดการยับยั้งขบวนการ oxidation ของเนื้อเยื่อพืช จากการทดลองพบว่าพันธุ์ที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดรากต่ำเช่น *C. pentagona* เมื่อผสมกับพันธุ์ที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดรากได้สูง เช่น *S.muricatum* สามารถชักนำพันธุ์ที่เกิดรากได้ยากให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงขึ้นได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับของ NAA และ BA ต่ำคือ 0.1 มก/ล ซึ่งถ้าเลี้ยง *C.pentagona* เพียงชนิดเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

การนำเมล็ดของ *A. cherimola.* พันธุ์ Tardiva ไปเพาะบนอาหารเพื่อผลิตต้นกล้า แล้วนำส่วนต่างๆ ของต้นกล้าไปเลี้ยงเพื่อดูการเจริญเติบโต โดยดูจำนวนยอดและความยาวยอดในอาหารที่มีระดับของไซโตไคนินต่างกัน นอกจากนั้นนำตาที่ได้จากต้นในสภาพธรรมชาติที่มีอายุ 2 ปีไปเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกันเพื่อดูการเจริญของตา พบว่าการเพิ่มจำนวนยอดได้ผลดีมากเมื่อใช้ส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง แต่ยอดที่เกิดขึ้นไม่สามารถเกิดรากได้ อาหารที่มี BA 0.5 มก/ล มีความเหมาะสมต่อการเจริญของยอดมากที่สุด แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์เมื่อนำชิ้นส่วนพืชมาจากสภาพธรรมชาติ และพบว่าพืชที่นำมาจากเรือนเพาะชำมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่า (Parri *et al.*,1990)

ในการทดลองของ Goreux *et al.* (1991) จากการเลี้ยงข้อ ปล้อง และ zygotic embryos ของ cherimoya สายพันธุ์ 'Concha Lisa' บนอาหารที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตต่างกัน พบว่าใช้เวลา 40 วันเพื่อชักนำให้มีการเพิ่มปริมาณยอดในสภาพหลอดแก้ว ซึ่งชิ้นส่วนปล้องที่เลี้ยงในอาหารที่เติม PVP (polyvinyl-pyrrolidine), casein hydrolysate 100 มก/ล, NAA 0.5 มก/ล และ BA 2 มก/ล ทำให้ได้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนมากที่สุดคือ 19.6 ยอดต่อชิ้น

Bejoy and Hariharan (1992) ได้รายงานการเพาะเมล็ดบนอาหาร MS ครึ่งส่วน โดยใช้ส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงยาว 1 ซม จากต้นกล้าอายุ 10-15 วันหลังจากงอก ไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีน้ำตาล 30 ก/ล และวุ้น 8 ก/ล เพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยทดลองเปรียบเทียบกับอาหารสูตร White (W) (1963), Gamborg (B5) (Gamborg *et al.*,1968) และ Nitsch (N) (Nitsch, 1969) โดยใช้ความ เข้มข้นของ BA 2.2 - 13.3 มคม และ NAA 0.27 - 2.7 มคม พบว่าเกิดตายอดจาก ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงโดยตรงภายใน 30 - 35 วัน ที่ทุกระดับของอ๊อกซินและไซโตไคนิน แม้ว่า ตายอดสามารถชักนำให้เกิดโดยใช้ BA เพียงชนิดเดียว แต่ตาที่เกิดไม่สามารถยืดตัวเป็นยอดได้ เมื่อใช้ NAA ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดตายอดและตาสามารถเจริญต่อไปเป็นยอดได้ ซึ่งความเข้มข้นของ BA 8.9 มคม และ NAA 0.54 มคม มีผลกระตุ้นให้เกิดยอดมากที่สุดโดยเฉลี่ย 4.8 ยอดต่อชิ้น แต่ถ้าใช้ NAA มากกว่า 0.54 มคม และ BA มากกว่า 8.9 มคม ทำให้ได้จำนวนยอดลดลง ซึ่งการลดลงของอ๊อกซินและไซโตไคนินต่ำกว่า 2.7 และ 8.9 มคม สามารถกระตุ้นการยืดยาวของยอดได้ จากการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่าอาหารสูตร N และ MS ทำให้เนื้อเยื่อมีการตอบสนองมากที่สุด แต่อาหารสูตร MS ทำให้เกิดจำนวนยอดต่อชิ้นมากที่สุด แสดงว่า BA สามารถชักนำตายอดจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ *A. muricata* ซึ่งทั้งสารเร่งการเจริญเติบโต และธาตุอาหารมีผลต่อการชักนำและการยืดยาวของตายอด โดยเฉพาะอ๊อกซิน มีความจำเป็นต่อการเจริญของยอด

การเลี้ยงข้อและตาข้างของ cherimola ที่ยังมีอายุน้อยในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารที่เติม BA 0.66 มคม หรือ zeatin 1.36 มคม พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ ส่วนยอดที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มี activated charcoal 1 ก/ล เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มี IBA 50 มคม น้ำตาล 58.4 มคม และ กรดซิตริก 200 มก/ล โดยนำไปเลี้ยงไว้ในที่มืด 7 วัน และที่มีแสง 3 วัน แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตรเดิมที่มีเกลือของธาตุอาหารหลักครึ่ง

หนึ่ง โดยไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโตพวกอ๊อกซิน ซึ่งยอดที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการรอดตาย 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ย้ายออกปลูก (Barcelo-Munoz *et al.*, 1994) เช่นเดียวกับการทดลองของ Jordan *et al.* (1993) ที่ใช้ส่วนของข้อ ปล้อง ใบ ก้านใบ pericarp, zygotic embryo และ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA, IAA, IBA, 2,4-D, BA, 2iP, zeatin, TDZ และ GA_3 เพื่อศึกษาถึงผลของชิ้นส่วนต่างๆของ *A. cherimola* ที่มีผลต่อการเกิดยอด (ตาราง 1) พบว่าได้ผลดีที่สุดจากส่วนของก้านใบที่มีส่วนของใบติดอยู่ และชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง บนอาหารที่มีฮอร์โมน NAA 2.7 มคม และ BA 8.9 มคม ที่มี casein hydrolysate (CH) 200 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นผลร่วมของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดสามารถกระตุ้นการเกิดอวัยวะ (organogenesis) และการเกิดยอดจากชิ้นส่วนปล้องของพันธุ์ 'Concha Lisa' จากต้นอายุ 3 ปีได้สำเร็จ และการใช้น้ำตาลซอบิทอล โดยมีสารเร่งการเจริญเติบโตคือ NAA 2.7 มคม ร่วมด้วย BA 8.9 มคม สามารถชักนำการเกิดยอดได้มากถึง 30 เปอร์เซ็นต์ จากส่วนปล้องของน้อยหน่าซึ่งเฉลี่ยเป็น 4.2 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งถ้าใช้ซูโครสจะไม่มีผลตอบสนองใดๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ โดยใช้ CH 200 มก/ล และเพิ่ม PVP 100 มก/ล พบว่าสามารถเกิดยอดเฉลี่ยมากขึ้นได้เป็น 19 ยอดต่อชิ้น ซึ่งเป็นจำนวนยอดสูงสุด จากการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ cherimoya ในอาหารที่มี NAA และ IBA ที่มีระดับความเข้มข้นสูงไม่ทำให้เกิดรากแต่เกิดยอดใหม่ ส่วนคัพภะจากเมล็ดจะเกิดยอดจำนวนมากโดยไม่ผ่านแคลลัสภายในเวลา 3 - 4 สัปดาห์ เมื่อใช้ 2,4-D 0.45 มคม และ BA 4.5 มคม หรือ zeatin 4.6 มคม นอกจากนั้นยังใช้ส่วนอื่นเพื่อชักนำยอด เช่น anther และใบซึ่งทั้ง 2 ชนิด สามารถเกิดยอดโดยผ่านแคลลัส แต่ยังเกิดปัญหาการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อ

การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นกล้าและส่วนข้ออายุ 5 ปีของ *A.atemoya (A.cherimola × A.squamosa)* สายพันธุ์ 'African Pride' พบว่าได้จำนวนยอดมากที่สุดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงบริเวณใกล้รากเมื่อเลี้ยงในที่ที่มี photosynthetic photon flux (PPF) 30 มคมต่อตารางเมตรต่อวินาที บนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ BA 2 มก/ล kinetin, biotin และ calcium pantothenate ความเข้มข้น 0.5, 0.1 และ 0.1 มก/ล ตามลำดับ และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดที่เกิดจากส่วนข้อของต้นอายุ 5 ปีที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนเหมือนอาหารที่ใช้เลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยงดังกล่าว แต่เพิ่ม ammonium nitrate 1 ก/ล ให้จำนวนยอดมากกว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS และ WPM การเพิ่มระดับ kinetin มากกว่า 0.5 มก/ล ทำให้จำนวนยอดและน้ำหนักสดมากขึ้น ซึ่งการเพิ่ม BA มากกว่า 2 มก/ล ทำให้จำนวนตายอด ความยาวยอด และน้ำหนักสดลดลง ยอดที่ได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เพิ่ม IBA 50 มก/ล เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 วันก่อนที่จะย้ายลงไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี activated charcoal 0.25 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ในที่มีแสงสว่าง สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 40 เปอร์เซ็นต์ (Dodd *et al.*,1994)

ตาราง 1 ผลตอบสนองทางสัณฐานวิทยาเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วน *A.cherimola* ต่างกัน (Jordan *et al.*,1993)

ชิ้นส่วนพืช	ผลตอบสนองทางสัณฐานวิทยา	สารเร่งการเจริญเติบโต (มคม)
ใบ	เกิดแคลลัส, เนื้อเยื่อเกิดอาการ เป็นสีน้ำตาล	Z 4.6-22.8, 2iP 4.9-24.6, TDZ 0.45
ก้านใบ	เกิดกลุ่มยอด	NAA 2.7, BA 8.9
ข้อ	เกิดกลุ่มยอดและ แคลลัส	NAA 0.54-27, BA 0.44-4.4
ปล้อง	เกิดกลุ่มยอดและ แคลลัส	NAA 2.7, BA 8.9
ตาข้าง	เนื้อเยื่อเกิดอาการเป็นสีน้ำตาล	ทุกชนิด
ลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง	เกิด multiple shoots	NAA 2.7, BA 8.9
	เกิดราก	NAA 54.0
เกสรตัวผู้	มีการแบ่งและเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื้อเยื่อเกิดอาการ เป็นสีน้ำตาล	NAA 5.4, BA 4.4
คัพภะจากเมล็ด	เกิดยอด และแคลลัส	2,4-D 0.45, BA 4.5 หรือ Z 4.6

Rasai *et al.* (1995)ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ เอทธิลีน น้ำตาล และความชื้นสัมพัทธ์ ต่อการชักนำการเกิด autotrophy จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ *A.atemoya* สายพันธุ์ 'African Pride' พบว่าเมื่อใช้คาร์บอนไดออกไซด์ เอทธิลีน และ ความชื้นสัมพัทธ์สูงขึ้น โอกาสที่เกิด autotrophy จะสูงขึ้นด้วย ซึ่งขณะเดียวกันต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่ใช้เลี้ยงต่ำลงด้วย

การเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นกล้า *A.muricata* สามารถชักนำให้เกิดตาและยอดจำนวนมากบนอาหารสูตร WPM ที่มีระดับของ BA ต่างๆ และเมื่อนำชิ้นส่วนของต้นที่โตเต็มที่จากสภาพภายนอกหลอดแก้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน สามารถเกิดยอดได้ดี โดยยอดเกิดจากเนื้อเยื่อ meristem ที่อยู่บริเวณข้อ และพบว่าเมื่อใช้ BA สูงขึ้นทั้งส่วนข้อ และลำต้นใต้ใบเลี้ยงสามารถเกิดยอดได้มากถึง 4 - 5 ยอดต่อชิ้น ส่วนการใช้ NAA ที่มีความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA มีผลต่อการชักนำให้ตามีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ยอดที่ได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่มี activated charcoal 3 ก/ล แต่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีกาแลคโตส และ NAA เพื่อกระตุ้นการยอดเกิดราก (Blake and Lemos, 1996a)

จากการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนปล้องของ *A.muricata* ที่เติบโตภายนอกสภาพปลอดเชื้อ โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Nitsch ที่มีซอบิทอลเป็นแหล่งของคาร์บอน พบว่ายอดที่เกิดจะมีการพัฒนาก็ต่อเมื่อย้ายชิ้นส่วนพืชลงไปบนอาหารที่ไม่มีสารเร่งการเจริญเติบโต โดยใช้น้ำตาลซูโครส

กาแลคโตส หรือกลูโคส สามารถชักนำและพัฒนายอดของ *A.muricata* ในสภาพปลอดเชื้อได้ (Baker and Lemos, 1998)

นอกจากพืชในตระกูล Annonaceae แล้วยังมีการทดลองที่น่าสนใจที่มีศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ในพืชที่มีเนื้อไม้ และไม่มีเนื้อไม้บางชนิดดังนี้

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด ตาข้าง และใบอ่อนของกฤษณาในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการทดลองกับปลายยอดและตาข้างของกฤษณา 2 ชนิด (*Aquilaria crassna* และ *A.malaccensis*) ในอาหารสูตร WPM และ สูตร MS ดัดแปลง โดยลดความเข้มข้นของไนเตรทลงครึ่งหนึ่ง และเติม BA, 2iP หรือ kinetin ที่มีระดับความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 และ 4.00 มก/ล พบว่าปลายยอดและตาข้างของกฤษณาเจริญเติบโตได้ดีในอาหารทั้งสองสูตร และ BA ให้ผลดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก kinetin ให้ผลรองลงมา ส่วน 2iP ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดโดย BA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.25 และ 0.50 มก/ล) สามารถเพิ่มจำนวนยอด และให้ยอดที่มีความยาวมากกว่า BA ที่ระดับความเข้มข้นสูง แต่ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงใบอ่อนของกฤษณาทั้ง 2 ชนิด ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 - D 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มก/ล ร่วมกับ BA 2.00 และ 3.00 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี แต่แคลลัสที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (พิมล, 2538)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเมล็ดลองกอง (*Lansium domesticum* Correa.) 3 สายพันธุ์ คือ ลองกองลางสาด และดูกู พบว่าลองกองที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม benzyladenine (BA) เข้มข้น 2.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด ส่วนการเลี้ยงตาข้าง และยอดดูกูในอาหารสูตร WPM เติม thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 0.01 และ 0.05 มก/ล มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ยของตาข้างและยอดสูงสุดตามลำดับ การเลี้ยงยอดและตาข้างลางสาดและลองกองในอาหารสูตร WPM หรือ MS ร่วมด้วย BA เข้มข้น 0.25 และ 0.50 มก/ล ให้ความยาวยอดเฉลี่ยของดูกูไม่แตกต่างกับสูตรที่ไม่เติม NAA การเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารดังกล่าวให้จำนวนยอดเฉลี่ยของดูกู ลองกองและลางสาดสูงขึ้น (วันทนา, 2538)

การเลี้ยงตาข้างของส้ม Shamouti พบว่า GA_3 ทำให้ปล้องของยอดยืด ขณะที่ BA และ kinetin ชักนำให้เกิดยอดถึง 6 ยอด แทนที่จะมีเพียง 2 ยอดตามปรกติ เมื่อตัดยอดเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรปรกติ โดยวางบนกระดาษกรองพับ ยอดมีการเจริญเติบโตได้มากกว่า 55 วัน การเติม IAA หรือ BA ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่ถ้าเติม GA_3 ช่วยกระตุ้นการเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด และเมื่อนำตาที่ตัดมาในช่วงฤดูใบไม้ผลิมาศึกษาพบว่าตาที่มีอายุต่างกันใช้ระยะเวลาในการแตกตาต่างกัน กล่าวคือ ตาที่มีอายุ 2 - 4 สัปดาห์ ใช้เวลานานถึง 22 วัน จึงจะแตกตาเช่นเดียวกับตาที่ตัดในฤดูหนาวที่มีอายุ 10 เดือน แต่ตาที่มีอายุ 4 และ 12 เดือนต้องการเวลาสำหรับการแตกตาเพียงแค่ 2 - 4 วัน เท่านั้น (Altman and Goren, 1971)

ในการเพิ่มปริมาณยอดจากการเลี้ยงยอดต้นกล้าจาก nucellus ของ *C.aurantium Carrizo citrange* และส้ม cleopatra (*C.reshni* Hort. ex Tanaka) บนอาหารสูตร MT ที่มี BA kinetin และ 2iP[6-(δ, δ-dimethylalyllamino)-purine] ระดับความเข้มข้น 0.2, 1.0 ถึง 5.0 มก/ล พบว่าปริมาณ BA ที่เพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณยอดเพิ่มขึ้นและปริมาณยอดสูงสุดเกิดบนอาหารที่มีปริมาณวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำตาลซูโครส 3 - 4 เปอร์เซ็นต์ และได้รับแสง 2.2 กิโลลักซ์ ส่วน NAA 1.0 มก/ล สามารถชักนำให้ออกรากได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารที่ใช้วุ้น 0.5 - 1.0 เปอร์เซ็นต์ (Kitto and Young, 1981)

ในการชักนำการเกิดยอดใหม่จากส่วนต่างๆของต้นกล้า และต้นแก่ของส้มสามใบ Carrizo citrang ส้ม Cleopatra มะนาว Rangpur และส้ม Symon พบว่า เมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 3 เดือน ส่วนยอดโดยเฉพาะพันธุ์ Carrizo ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BA เกิดยอดใหม่จำนวนมาก โดยยอดต้นอ่อนและต้นแก่ตอบสนองต่ออาหารแตกต่างกัน ต้นแก่ต้องการธาตุอาหารหลักจากสูตร MS เพียงครึ่งส่วน ที่มี BA 2.5 มคม ขณะที่ยอดต้นอ่อนตอบสนองได้ดีกับธาตุอาหารหลักสูตร MS ที่มี BA 10 มคม ส้ม Symon ให้ยอดใหม่เพียง 2 - 3 ยอด จากการเลี้ยงยอดของต้นกล้า แต่ตาข้างสามารถให้ยอดจำนวนมาก ส่วนปล้องมะนาว และส้มพันธุ์ Cleopatra เกิดยอดจำนวนน้อยและช้า ในขณะที่พบว่าส้มสามใบมีลักษณะการข่มยอดสูง การใช้ส่วนของปล้อง พบว่ายอดส่วนมากเกิดจากการพัฒนาของแคลลัส แต่ปล้องจากกล้า citrange เกิดยอดจำนวนมากบริเวณรอยตัดทั้งสองข้างเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มี BA 2.5 มคม ตรงกันข้ามกับปล้องของต้นแก่ทุกพันธุ์ที่ทดลอง ซึ่งเกิดยอดเพียงเล็กน้อยหรือไม่เกิดเลย ส่วนข้อของส้มทุกพันธุ์ที่กล่าวมาไม่ว่าจะมาจากต้นอ่อนหรือต้นแก่นับว่าเป็นส่วนที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอด (Barlass and Skene, 1982)

ในการขยายพันธุ์ *Troyer citrange* ด้วยส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายราย และรากบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และBAP ความเข้มข้น 0.1 - 10 มก/ล พบว่าส่วนของรากเกิดเป็นยอดได้โดยตรงโดยไม่ผ่านแคลลัสในอาหารที่มี BAP 10.0 มก/ล และ NAA 1.0 มก/ล แต่ลำต้นเหนือใบเลี้ยงให้ยอดผ่านแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP 0.25 มก/ล และ NAA 0.1 มก/ล และให้ยอดโดยตรงเมื่อเพิ่ม BAP 0.5 มก/ล และ NAA 0.1 - 1.0 มก/ล ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง และสามารถชักนำให้ออกรากได้ด้วยการเติม NAA 2.0 มก/ล เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากการทดลองของ Pontikis and Sapoutzaki (1985) ขยายพันธุ์ส้ม Troyer citrange ด้วยการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA, IBA และ GA_3 ความเข้มข้น 0.5, 0.1 และ 0.1 มก/ล ตามลำดับ พบว่า phloroglucinol 89.0 มก/ล ทำให้การเพิ่มยอดเป็นทวีคูณ และสามารถชักนำยอดให้ออกรากได้โดยย้ายยอดไปเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจาก BA และเพิ่มปริมาณ IBA เป็น 1.0 มก/ล และ phloroglucinol เป็น 178.0 มก/ล (Edriss and Burger, 1984)

จากการทดลองของ Shengeliya และ Butenko (1988) พบว่า การพัฒนาตาข้างของมะนาวพันธุ์ Meyer และพันธุ์ Gruzinski ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมไซโตไคนินนั้นขึ้นอยู่กับอายุพืช แหล่งที่มาและชนิดของพืชเป็นอย่างมาก ในปีเดียวกันนี้ Nel (1988) เลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของยอดจากส้มในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MT ที่เติม BA และ NAA สามารถพัฒนาเป็นยอด และชักนำให้ออกรากในอาหารสูตร MT ครึ่งส่วนที่มี NAA และรากมีความยาวเพิ่มขึ้นได้ในอาหารที่ปราศจากฮอร์โมน

จากการเลี้ยงส่วนของลำต้นของต้นกล้า ส้มเกลี้ยงพันธุ์ Pinaapple มะนาวพันธุ์ Maxican และ Citron พันธุ์ Arizona Etrog พบว่าปริมาณ BA เพียง 3 มก/ล จะทำให้ส้มและ Citron มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากขณะที่มะนาว ต้องการ BA 1 มก/ล เมื่อมีตา 1 - 2 ตา ตาส้มสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สามารถตัดแยกชักนำให้เกิดรากได้ แต่ถ้ามีจำนวนตามาก ตาจะมีขนาดเล็กและไม่สามารถงอกรากได้ ข้อที่มีตาเพียงตาเดียว สามารถเพิ่มจำนวนตามากขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA เพิ่มขึ้นถึง 1.0 มก/ล ปริมาณ BA ที่มากขึ้นจะยับยั้งการเจริญของยอด พบว่าการเจริญของยอดขึ้นอยู่กับชนิดความเข้มข้นของ BA และจำนวนยอด โดยถ้าเกิดหลายยอดจากตาเดียว จะมีเพียงยอดเดียวที่มีการเจริญยืดยาวขนาด 1.0 – 2.0 ซม ในเวลา 2 สัปดาห์ ขณะที่ยอดอื่นยังคงเท่าเดิมหรือมีการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย และยอดที่มีขนาดสั้นเหล่านี้จะเจริญได้ก็ต่อเมื่อมีการตัดแยกเอาต้นที่เจริญกว่านั้นออกไป ส้มและมะนาวให้จำนวนยอดสูงสุดเมื่ออาหารที่ใช้เลี้ยงมี BA 1.0 มก/ล ขณะที่ Citron ต้องการ BA เพียง 0.1 มก/ล โดยจะได้ยอดที่มีขนาดสูง 1.0 - 1.5 ซม (Duran-Vila *et al.*, 1989)

Sim *et al.* (1989) พบว่าเมื่อนำปลายยอดและข้อจากต้นแก่ของ *C.mitis* มาเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP หรือไม่ก็ตามสามารถเกิดยอดได้ 66 - 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ส่วนต่างๆของต้นกล้า อาทิ ส่วนเหนือใบเลี้ยง ใบ ปลายยอดและข้อ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ทั้งสิ้น ในการชักนำให้เกิดตาจากการเลี้ยงราก 3 รูปแบบ คือ รากที่ติดอยู่กับต้นกล้าทั้งต้น รากที่ติดอยู่กับต้นกล้าที่ตัดปลาย และรากอย่างเดียว พบว่าจำนวนตาที่เกิดสูงสุดได้จากการเลี้ยงรากที่ติดกับต้นกล้าทั้งต้นในอาหารที่มี BA 0.5 มก/ล ให้จำนวนยอดถึง 275 ยอด จากชิ้นส่วนพืชเพียง 13 ชิ้น ในเวลา 9 สัปดาห์

ตาของแอปเปิ้ลพันธุ์ Tydeman's Early Worcester ที่สร้างขึ้นในระหว่างฤดูใบไม้ผลิ และฤดูร้อนสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชได้มากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าที่เกิดจากตาที่เริ่มพัฒนาในช่วงฤดูกาลอื่นๆ อาหารที่ใช้เลี้ยงมีเกลือของธาตุอาหารหลักสูตร MS ที่มี BAP 4.4 มคม GA_3 2.8 มคม และ IBA 0.5 มคม ซึ่งการเพิ่มสาร antioxidants และ absorbants ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เข้าไปในอาหารสูตร MS ในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงสามารถลดปริมาณ สารฟีนอลได้ในบางกรรมวิธีและยังช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตา สามารถเพิ่มจำนวนยอดบนอาหาร MS ที่มี BAP 2.2 มคม และ kinetin 7.5 มคม ในการชักนำให้เกิดรากทำได้โดยนำยอดที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี IBA 1.5 มคม มีน้ำตาล 15 ก/ล เป็นเวลา 9 วันก่อนจะย้ายลงสู่อาหารแข็งเพื่อให้เกิดราก การเพิ่ม

phloroglucinol (PG) ในอาหารเหลวทำให้เกิดรากได้เร็วและรากพัฒนาได้ดีกว่าเมื่อเติม PG ในอาหารสูตรเดียวกันที่เป็นอาหารแข็ง (Bhardwaj *et al.,* 1999) การพัฒนาของตาพิเศษสามารถพัฒนามาจากแคลลัสที่อยู่บริเวณรอยตัดของใบหรือจาก ก้านใบโดยตรง (Dosba and Escalettes, 1993; Druart, 1990; Maheswaran and Welander, 1992) ตามปรกติการเกิดตาจะเกิดบริเวณรอยตัดและบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร (James *et al.*, 1988; Aldwinckle and Yepes, 1994) เพราะรอยตัดมีทางลำเลียงธาตุอาหาร และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตทำให้การดูดซึมอาหารดีขึ้นแม้ว่าในพืชบางชนิด เช่น *P.canescens* สามารถเกิดยอดจากแคลลัสที่อยู่ส่วนบนของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหารโดยตรง (Sarwar and Skirvin, 1997)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อใบของแอปเปิ้ลที่มีอายุน้อยๆ โดยวางรอยตัดของเนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารมีโอกาสที่จะชักนำให้เกิดยอดได้ดี (Maheswaran and Welander, 1992; Aldwinckle and Yepes, 1994) ใบจะมีอัตราการพัฒนาสูงขึ้นเนื่องมาจากใบที่นำมาจากยอดเป็นใบที่มีอายุน้อยยังมีเซลล์ที่มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะไม่เต็มที่และมีเซลล์ที่มีความตื่นตัวในการดูดซึม และเผาผลาญสารอาหารมากขึ้นรวมกับมีฮอร์โมนและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นส่วนต่างๆ ของพืชได้ดี (Famiani *et al.*, 1994) แต่ Antonelli และ Druart (1990) พบว่าในบางกรณีในพืชชนิดเดียวกันนี้ใบที่มีอายุมากขึ้นจะได้ผลดีกว่า สาเหตุที่เนื้อเยื่อที่วางส่วนตัดสัมผัสกับอาหารมีการพัฒนาเป็นส่วนต่างๆ ได้ดีขึ้น อาจเนื่อง มาจากมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนบริเวณปากใบที่อยู่บนใบมากขึ้น หรือความสามารถของพาลิเสด พาเรนไคมา บนผิวของเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอาหารสามารถเคลื่อนย้ายธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตจากอาหารเข้าไปในชิ้นส่วนพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (Antonelli and Druart , 1990)

จากการศึกษาของ Maheswaran และ Welander (1992) พบว่าในแอปเปิ้ล การใช้ gelrite สามารถส่งเสริมให้เกิดตายอดได้ดีกว่าการใช้วุ้น พืชที่อยู่บนอาหารที่มี gelrite ยังคงมีสีเขียว และมีสุขภาพดี ในขณะที่ชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่ใช้วุ้นส่วนใหญ่เนื้อเยื่อพืชมีสีน้ำตาลส่วนพืชพวกสาลี่ใช้ phytagel แทนได้ผลดี (Chevreau *et al.*, 1990) ส่วนปัจจัยในการใช้แสงพบว่าแม้จะใช้ความเข้มแสงลดลงจาก 110 ไปเป็น 55 โมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีไม่มีผลแตกต่างต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดตาอย่างมีนัยสำคัญ แต่ใน *P.canescens* พบว่าเมื่อความเข้มแสงลดลงเช่นเดียวกันสามารถชักนำการเกิดยอดได้มากขึ้น จากการสังเกตพบว่าช่วงมืดที่เหมาะสมในการชักนำการเกิดตาขึ้นอยู่กับพันธุ์พืชซึ่งการแปรผันระยะเวลาที่ต้องการความมืดของพืชอยู่ระหว่าง 1 - 4 สัปดาห์ แต่จะได้ผลดีเมื่อใช้ช่วงมืด 2 - 3 สัปดาห์ (Druart ,1990)

จากการทดลองของ Yadav *et al.* (1990) ได้รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหม่อน (*Morus nigra* L.) โดยการใช้ชิ้นส่วนปลายยอดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่มีวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบผลของไซโตไคนิน คือ 6-benzyl amino purine (BAP) และ kinetin พบว่าจำนวนยอดเพิ่มมากที่สุดเมื่อใช้ BAP 1.0 มก/ล คือประมาณ 4.2 ยอด (ยอดที่ยาวมากกว่า 1.0 ซม

ขึ้นไป) ในเวลา 4 สัปดาห์ แต่ความยาวของยอดมากที่สุดเมื่อใช้ BAP 0.5 มก/ล และยังพบว่า BAP ให้ผลดีกว่า KIN ในการเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญเติบโต นอกจากนี้หม่อนเพิ่มปริมาณเป็น 3 - 5 เท่า เมื่อใช้ BAP 1.0 มก/ล เติมลงในอาหารเดียวกันนี้

Bhattacharya and Bhattacharya (1997) รายงานว่าสามารถขยายพันธุ์ *Jasminum officinale* L. โดยตัดยอดอ่อนมาตัดเป็นชิ้น ชิ้นละ 3.0 ซม ซึ่งแต่ละชิ้นต้องมีตาติดมา 1 - 2 ตาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ (4.44, 8.89 และ17.16 มคม) หรือ kinetin (4.65, 9.30และ 14.00 มคม) ชนิดเดียวหรือร่วมกับ NAA (0.53, 2.65, 5.30, 10.60 และ 16.00 มคม) พบว่าการเกิดยอดของเนื้อเยื่อข้อจะเกิดภายใน 2 สัปดาห์ หลังจากเริ่มเลี้ยง ยอดจะเจริญจนมีขนาด 1.0 ซมภายในเวลาเพียง 1 สัปดาห์ ระหว่างขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยอดนั้น ยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นสามารถพัฒนาเป็นกิ่งข้าง ซึ่งกิ่งข้างเหล่านี้สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้อีก ซึ่งอาหารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ อาหารที่มี BA 17.76 มคม และ NAA 0.50 มคม ซึ่งยอดใหม่ที่ได้เหล่านี้เมื่อตัดเป็นส่วนๆ ที่มีตาติดอยู่ 1 - 2 ตา สามารถนำไปเลี้ยงให้เกิดยอดได้อีก ดังนั้นจากชิ้นส่วนพืชชิ้นเดียวสามารถเพิ่มจำนวนยอดใหม่ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาเพียง 6 สัปดาห์ ซึ่งยอดจะถูกกระตุ้นให้ยืดยาวได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม BA 8.89 มคมและ NAA 16.00 มคม หรือ kinetin 18.60 มคม

นอกจากนั้นยังมีรายงานการขยายพันธุ์จากส่วนต่างๆที่เพาะได้จากเมล็ดของหญ้าตีนกา (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) โดยเกิดยอดผ่าน embryogenesis ในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4 - D เข้มข้น 1 - 100 มคม โดยเลี้ยงไว้ในที่มืดเพื่อชักนำให้เกิด somatic embryos พบว่าอาหารสูตร MS ที่มี 2,4 - D 5 ถึง 10 มคม เกิด somatic embryos ได้ดีที่สุด และเกิดมากที่สุดในส่วนที่อยู่เหนือตาที่อยู่บริเวณซอกใบ และในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณตาที่มี leaf primodia เกิดขึ้นแล้ว (Le *et al.*, 1997)

จากการศึกษาหาสูตรอาหาร และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของ pollen ของ cherimoya ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า pollen ที่โตเต็มที่จะถูกเก็บไว้ในเกสรตัวผู้ใน tetrads เมื่อเกิดการผสมเกสรบนยอดเกสรตัวเมีย pollen จะถูกปลดปล่อยออกมาจากระยะ tetrads ระหว่างนี้ถ้ากลไกของขบวนการเกิดในสภาพปลอดเชื้อจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และเสร็จสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่งโมง ขณะที่ในสภาพนอกหลอดแก้วใช้เวลานานถึง 5 ชั่วโมง การงอกของ pollen ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20 - 25 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้ pollen งอกจำเป็นต้องทำการ prehydration ก่อน และ pollen จะงอกเมื่อมีส่วนของยอดเกสรตัวเมียในอาหารด้วยเท่านั้น นอกจากอาหารดังกล่าวต้องมีส่วนผสมของแคลเซียม และโบรอน โดยใช้น้ำตาล 5 - 10 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้อาจนำไปใช้ในการหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการงอกของ pollen ตามสภาพธรรมชาติต่อไป (Galan-Sauco, 1999)

ในการศึกษาการเลี้ยง pollen ของ cherimoya สายพันธุ์ 'Sabor', 'Pierce', 'EI Blumpo' และ 'Villapark' ของ Nakanishi *et al.* (1999) จากการสังเกตพบว่า ในระหว่างที่ pollen ของ cherimola งอก เส้นผ่าศูนย์กลางของ pollen บวมขึ้นประมาณ 50 ไมโครเมตร ในการศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการงอกและและการยืดยาวของท่อซึ่งนำ pollen มาจากต้นที่ปลูกในโรงเรือนพลาสติก การงอกของ pollen และการยืดยาวของท่อจะเกิดได้ดีเมื่อใช้วุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาล 15 - 20 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกของ pollen และการยืดยาวของท่อคือ 22 - 25 องศาเซลเซียส ซึ่งการเติม boric acid 10 - 500 ppm ในอาหารที่มีวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำตาล 15 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การงอกของ pollen และการยืดยาวของท่อเกิดได้ดีขึ้น

การเลี้ยงเนื้อเยื่อของพวกที่มีเนื้อไม้ เช่น apricot พบว่าการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโต TDZ ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติคล้ายไซโตไคนิน มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดมากกว่าสารที่เป็นไซโตไคนิน เช่น BAP (Burgos et al., 2000)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อปัญหาหลักที่มักจะเกิดขึ้นคือการเกิดออกซิเดชั่นในขบวนการ metabolism เนื่องจากเกิดการสะสมของสารฟีนอลและมีปริมาณ polyphenoloxidase จำนวนมาก (Martinez-Cayuela *et al.*, 1998) ในการศึกษาการเกิดสารประกอบ ฟีนอลจากชิ้นส่วนใบของ cherimoya ที่เลี้ยงในอาหารในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ antioxidant ชนิดต่างๆ พบว่าสาร antioxidant 4 ชนิดที่ให้ผลดีที่สุดตามลำดับดังนี้

1. PVP ที่มีความเข้มข้นสูง ไม่เกิน 1000 มก/ล
2. ascorbic acid 50 มก/ล
3. glutathione 100 มก/ล
4. DIECA 100 มก/ล

ซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถรักษาเนื้อเยื่อให้มีสีเขียวและลดระดับของสารประกอบฟีนอลให้ลดลงในระหว่าง 40 วันแรกหลังจากเริ่มเลี้ยง (Jordan *et al.*, 1990)

การเพิ่ม NAA จะมีผลดีในการจำกัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอล เป็นเช่นนี้เพราะเกิดการออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลโดย auxin oxidase ดังนั้น NAA ความเข้มข้นสูงที่มีในอาหารจะไปแข่งขันในการจับกับ active site ของเอนไซม์

ในการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชจากข้อของ *A. squamosa* ในวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีปัญหาอย่างมากจากการเกิด abscission ของใบในระหว่างการเลี้ยง จึงได้มีการศึกษาโดยดูดซับ ตัวยับยั้งขบวนการการสร้างและการทำงานของเอทธีลีน เพื่อป้องกันการร่วงของใบ สารที่ช่วยยับยั้งการทำงานของเอทธีลีน เช่น silver thiosulfate และ 2, 5-norbornadiene ป้องกันการเกิด abscission ของใบได้มากกว่าตัวดูดซับเอทธีลีน เช่น activated charcoal, mucuric perchlorate และ potassium permanganate หรือตัวยับยั้งขบวนการสร้างเอทธีลีน เช่น aminoethoxyvinylglycine, aminooxyacetic acid และ cobalt chloride ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารประกอบ silver thiosulfate สามารถนำไป

ใช้ในการยับยั้งการเกิด abscission ของใบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *A. squamosa* อย่างได้ผล (Blake and Lemos, 1996b)

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนจากแบคทีเรียกับการเกิดออกซิเดชั่นจากสารประกอบฟีนอลกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาจากภายนอกสภาพหลอดแก้วโดยจัดการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อจากชิ้นส่วนข้อจากต้น *A. cherimola* ที่โตเต็มที่จากสภาพธรรมชาติและการใช้ antioxidant ในการเลี้ยง meristem จากปลายยอดเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการเกิด ออกซิเดชั่นจากสารประกอบฟีนอลระหว่างการเลี้ยง ซึ่งสารฟีนอลสะสมอยู่บริเวณปลายยอดในอาหารหรือในส่วนของกิ่งพืชทั้งพืชอวบน้ำ กึ่งเนื้อไม้และมีเนื้อไม้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาในการสร้างสารเหล่านั้นหรือบางช่วงของปีที่มีการสะสมของสารเหล่านั้น โดยมีการเก็บตัวอย่างของพืชทุกเดือนตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงมกราคมโดยนำมาฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช 3 วิธี วิธีที่หนึ่งฆ่าเชื้อในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ NaClO 3 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 20 แช่ไว้นาน 15 นาทีวิธีที่สองแช่เนื้อเยื่อใน Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน NaClO 25 เปอร์เซ็นต์ ที่มี Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที และวิธีที่ 3 แช่ใน N_2O_2 35 เปอร์เซ็นต์ที่มี Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที พบว่าไม่มีส่วนกระทบจากสารที่ใช้ฆ่าเชื้อกับชิ้นส่วนพืช โดยบันทึกผลการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่อาจเกิดขึ้นได้ แต่มีผลของสารประกอบฟีนอลกับเนื้อเยื่อพืช จากผลการทดลองพบว่าระหว่างเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายน เนื้อเยื่อพืชเกิดการปนเปื้อน 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ระหว่างเดือนธันวาคมและมกราคมการปนเปื้อนเกิดน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของการสะสมของสารฟีนอลได้มีการทดลอง ในขั้น ที่สอง โดยนำชิ้นส่วนพืชในเดือนมกราคมไปเลี้ยงพบว่าการใช้สาร antioxidant เช่น polyvinylpolypyrrolidone, ascorbic acid ร่วมกับ citric acid และ DIECA (diethyldithiocarbomate) ไม่มีผลช่วยลดปริมาณสารประกอบฟีนอล จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับของฟีนอลต่ำที่สุดในเดือนมิถุนายนและสูงสุดในเดือนสิงหาคมและกันยายนซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ *A.cherimola* มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงซึ่งช่วงนี้มีการเกิด lignification เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปว่าไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างช่วงที่มีการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียและช่วงที่มีการสร้างสารฟีนอล (Biancani *et al.*, 1999)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธี Thin Cell Layers

การเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ Thin Cell Layers (TCLs) เป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดบาง 0.10 - 0.30 มม โดยตัดเนื้อเยื่อตามขวางผ่านชั้นต่างๆ ของพืช หรือตัดตามยาวให้ได้ชั้น epidermis และ cortical cells จำนวน 3 ถึง 6 ชั้น การเลี้ยงโดยใช้ TCLs นี้สามารถชักนำให้เกิดยอดหรือต้นพืชโดยตรงโดยไม่ผ่านแคลลัสได้ (Tran Thanh Van, 1973) จากรายงานการทำ TCLs ของ *Begonia rex* ที่นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร ที่เติม cytokinin 10^{-6} โมล่าร์ จะเกิดยอดโดยตรงจาก TCLs จำนวนมากที่บริเวณผิวหน้าทั้งหมดของ epidermis หลังจากการเลี้ยง 15 - 20 วัน ซึ่งประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นส่วนพืชจะเกิดเป็นยอดได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง ความเข้มข้นของน้ำตาล อ๊อกซิน และ ไซโตไคนิน ในปี 1996 ได้มีรายงานการทำ TCLs ของใบเลี้ยงของ *Panax ginseng* C.A. Meyer ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4 - D (2,4 - dichlorophenoxyacetic acid) 5 มคม ใช้เวลา 9 สัปดาห์ในการเกิดเป็น somatic embryo แต่ถ้าใช้อาหาร MS ที่มี 2,4 - D 5 มคม แช่เนื้อเยื่อก่อนเลี้ยง TCLs พบว่าเกิด somatic embryo เร็วขึ้น 2 สัปดาห์ ถ้าใช้ BA และ Z (BZ) ร่วมกับ 2,4 - D จะเกิด somatic embryo ภายใน 6 สัปดาห์ของการเลี้ยง และอัตราการเกิด embryogenesis สูงกว่าการแช่ 2,4-D ก่อนเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าความเข้มข้นของ BA + Z เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการเกิด somatic embryo ที่สมบูรณ์ลดลงแต่อัตราการเกิด embryogenesis จะเพิ่มขึ้น (Ahn, 1996) นอกจากนั้นปัจจัยจากสภาพแวดล้อม เช่น แสงและอุณหภูมิก็มีผลต่อการแบ่งและเรียงตัวเซลล์จนเกิดเป็นอวัยวะใหม่โดย TCLs ของยาสูบมีอิทธิพลมาจากปริมาณของแหล่งให้แสงสว่าง นอกจากนี้ปริมาณ กลูโคสยังสามารถช่วยในการแบ่งและรวมตัวนี้ได้คือเมื่อใช้กลูโคส 167 มคม และให้แสงต่อเนื่องความเข้มข้น 50 วัตต์/ตารางเมตร เหมาะสมต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงไปเป็นดอก อย่างไรก็ตามแสงสว่าง 50 วัตต์/ตารางเมตรจำเป็นต้องให้ใน 6 วันแรกเท่านั้นจึงจะมีอิทธิพลในการเกิดดอกและพบว่าสามารถเกิดดอกได้ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ได้รับแสงในวันที่ 6 - 11 ของการเลี้ยง ดังนั้นช่วงวิกฤตจะอยู่ในช่วงแรกของการเลี้ยง ซึ่งน้ำตาลถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่าที่จะเป็นตัวปรับความดันออสโมติค (osmoregulator) การให้ปริมาณน้ำตาลที่ไม่พอดีจะทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดโครงสร้างของอวัยวะ เช่น ตา ที่ผิดปรกติขึ้น ดังนั้นแสงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดตาดอกได้ จึงต้องใช้ส่วนผสมของกลูโคส และซูโครสร่วมกับการใช้แสงจึงจะช่วยพัฒนาเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียได้ จากการศึกษาพบว่าแสงจะมีผลต่อการดึงน้ำตาลไปผลิตเป็นพลังงานโดยขบวนการ metabolism และเพิ่มประสิทธิภาพของ chloroplast ด้วย (Cousson and Tran Thanh Van,1983) อย่างไรก็ตามพบว่าพืชที่นำมาเลี้ยงส่วนมากจะเกิดเป็นรากและตายอดมากกว่าที่จะเกิดเป็นตาดอกโดยตรง (Tran Thanh Van *et al.*,1970)

การนำชิ้นพืชที่มีขนาดบางมากๆ มาเลี้ยงจะทำให้ได้จำนวนต้นพืชมากขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว เช่น จากรายงานการทดลองในปี 1994 ได้มีการพัฒนาการทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อบาง (Thin section culture) ในกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสม *Aranda deborah* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีการผลิตเป็นการค้ามาก แต่การเลี้ยงด้วยวิธีเดิมโดยใช้ปลายยอด และตาที่อยู่ที่ซอกใบมีการพัฒนาของ protocome-like bodies (PLBs) ช้าหลังจากนั้นต้องใช้เวลา 9 - 12 เดือนจึงจะพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งการทำวิธี TCLs ที่มีความหนาของเนื้อเยื่อเพียง 0.60 - 0.70 มม จากปลายยอดขนาด 6.00 – 7.00 มม เลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went (VW) เติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สามารถเกิดมากถึง 13.60 PLBs ในระยะเวลา 45 วันเปรียบเทียบกับการเลี้ยงปลายยอด 1 อัน โดยไม่ได้ทำ TLCs เกิด 2.70 PLBs ภายใต้สภาพการเลี้ยงที่เหมือนกัน การเติม α-naphthaleneacetic acid ในอาหารสูตร VW และเพิ่มน้ำมะพร้าว อันทำให้การสร้าง PLB เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวิธี TCLs พบว่า PLBs ที่ได้พัฒนาเป็นต้นอ่อน (plantlet) บนอาหารสูตร VW ที่มีน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ activated charcoal 0.50 ก/ล ซึ่งจะทำให้ได้ต้นอ่อน 80,000 ต้นต่อปีจากยอด 1 ยอดที่นำมาทำ TCLs เทียบกับการเลี้ยงปลายยอด 1 อัน ซึ่งจะได้ต้นอ่อน 11,000 ต้นต่อปี (Lakshmanan *et al.*, 1995) และจากการทดลองของ Do My *et al.* (1998) ได้มีการศึกษาวิธีการในการเพิ่มจำนวนต้น *Digitaria sanguinalis* L. ให้ได้ปริมาณมากขึ้นในระยะเวลาน้อย พบว่าสามารถผลิตต้นพืชได้ในเวลา 10 – 14 วัน โดยไม่ผ่านแคลลัส โดยใช้เทคนิค transverse Thin Cell Layer (tTCLs) สามารถเกิด pseudo-embryogenic structure ภายในเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อใช้อาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ เติม 2,4 - D 1 มคม ร่วมกับ 6 - benzylaminopurine (benzyladenine) 10 มคม ซึ่งต้นพืชที่เกิดขึ้นจาก tTCLs ที่เลี้ยงโดยใช้ gelrite จะมีน้ำหนักสดมากกว่า ต้นที่เลี้ยงโดยใช้วุ้น 6 เท่า และจะมากกว่าที่ใช้ agarose ถึง 30 เท่า

การพัฒนาของอวัยวะใดๆที่มีจุดกำเนิดบนเซลล์ที่บางมากๆ ทุกเซลล์จะมีการตอบสนองอย่างน้อยในระยะแรก ซึ่งต่างกันในชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดใหญ่ที่การตอบสนองของเซลล์น้อยเพราะการลดขนาดชิ้นส่วนพืชลงจะเป็นการลดระดับของ endogenous substance จึงทำให้มีความไวในการตอบสนองต่อสารกระตุ้นการเจริญเติบโต และ trophic substance ในปริมาณน้อยมาก หรือสนองตอบต่อสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น จึงแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาและเปลี่ยนรูปแบบของลักษณะที่แสดงออกไปเป็นอีกลักษณะหนึ่งโดยการใช้ปัจจัยง่ายๆ เพราะเซลล์สามารถตอบสนองได้ง่ายและรวดเร็ว (Le *et al.*, 1997)

จากการคิดค้นวิธีการชักนำให้เกิดตาโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืชที่มีเนื้อไม้พบว่ามีความเป็นไปได้สูงจากพืชพวก trifoliate orange (*Poncicus trifoliata* L. Raf) โดยการทำ tTCL จากเนื้อเยื่อที่ตัดจากปล้องของ *P. trifoliata* ที่มีอายุ 1 ปี เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP 1 – 50 มคม และ TDZ 0.10 – 10 มคม ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดตาคือเมื่อใช้ BAP 25.0 มคม และ TDZ 1 มคม ซึ่งจะทำให้เกิดตา 87 และ 72 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวน 24 และ 5 ตาต่อชิ้น ตามลำดับ

ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดตาและความถี่ของการเกิดตาของ tTCLs จะสูงขึ้นเมื่อใช้ BAP ผสมกัน TDZ คือเมื่อใช้ BAP 10 มคม ร่วมกับ TDZ 1 มคม พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของ tTCLs จะเกิดตาได้ 37 ตาต่อชิ้น และยอดที่เกิดขึ้นจะยืดยาวเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่มี GA_3 1 มคม ส่วนการชักนำให้เกิดรากจะใช้ NAA 5 มคม และพบว่ายอดที่เกิดรากแล้วเมื่อนำออกปลูกในโรงเรือนสามารถพัฒนาได้อย่างเป็นปรกติ การใช้ tTCLs ของพืชสามารถชักนำให้เกิดยอดโดยไม่ผ่านแคลลัส โดยใช้เวลา 9 สัปดาห์หลังจากเลี้ยงบนอาหารวุ้น (Ahn Hong *et al.*, 1999b)

จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ TCLs ของยาสูบในสภาพปลอดเชื้อเพื่อศึกษาผลตอบสนองของชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อเนื้อเยื่อ พบว่าเมื่ออาหารที่ใช้เลี้ยงปราศจากสารดังกล่าวสามารถเกิดตายอด และตาดอกได้น้อย โดยตายอดเกิดจากแคลลัสจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตามขวาง แต่พบว่าในขณะที่เกิดดอกจะมีปริมาณอ๊อกซินในอาหารในระดับสูง ขณะที่การทดลองที่ใช้เฉพาะ kinetin เนื้อเยื่อส่วน subepidermis และ chlorenchyma สามารถชักนำให้เซลล์เกิดขบวนการแบ่งเซลล์ได้ ทำให้เกิดกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่สามารถพัฒนาเป็นตาได้ ทั้งตาดอกและตายอดจะเกิด cicatritial genesis เมื่ออาหารที่ใช้เลี้ยงมีทั้งอ๊อกซิน และไซโตไคนิน และพบว่าตาที่เกิดโดยเฉพาะตาดอกจะเกิดทั้งบริเวณผิวหน้าของเนื้อเยื่อ (superficial) และ cicatritial genesis (Altamura *et al.*, 1992)

ผลของสารกระตุ้นการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการตอบสนองของ TCLs จากต้นยาสูบ *(Nicotiana tabaccum* L.) พันธุ์ 'Samsun' เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA 1.60 มคม และ NAA 0.50 มคม เหมาะสมต่อการเกิดยอด ขณะที่ BA ความเข้มข้น 0.50 มคมและ NAA 1.60 มคม มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากในชิ้นส่วนเดียวกัน แต่ถ้าใช้ NAA มากกว่า 16.00 มคมเนื้อเยื่อจะเกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว ส่วนตำแหน่งในการเกิดยอดบนเนื้อเยื่อพบว่ายอดจะย้ายตำแหน่งการเกิดจากบริเวณใกล้รากไปสู่บริเวณใกล้ยอดเมื่อความเข้มข้นของ NAA มากขึ้น โดยเนื้อเยื่อจะถูกชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ภายในวันที่สองหลังจากเลี้ยง ซึ่งการแบ่งเซลล์จะเกิดในบริเวณที่มีการสัมผัสกับอาหาร โดยตาข้างเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ในชั้น subepidermis และ/หรือ epidermis ขณะที่ตายอดเกิดจากเซลล์ในชั้น subepidermis และบางส่วนของชั้น cortex โดยเกิดยอดบริเวณส่วนบนของเนื้อเยื่อ (Creemers-Molenaar *et al.*, 1994)

จากการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Rhynchostylis gigantea* ใช้วิธี tTCLs โดยใช้ส่วนของลำต้นที่อยู่ส่วนฐานของปลายยอดของพืชอายุ 1 ปี โดยใช้เนื้อเยื่อขนาด 0.30 - 0.50 มม เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP, NAA, TDZ และ น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากบนอาหารที่มี BAP 3 มคม TDZ 3 มคม ซึ่งจะให้ยอดมากถึง 11.70 ยอดต่อชิ้นส่วน TCLs ที่เลี้ยง ส่วนรากเกิดได้ดีในอาหารที่มี forchlorfenuron 10 มคม และน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้นพืชมีขนาดมากกว่า 3 ซม หรือหลังจากเลี้ยง 4 - 6 สัปดาห์จึงย้ายออกปลูก (Ahn Hong *et al.*, 1999a)

Altamura *et al.* (1992) รายงานการเลี้ยง TCLs ของเนื้อเยื่อลำต้นจากต้นกล้ายาสูบบนอาหารที่มีการปรับระดับของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตหลายระดับเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารดังกล่าว โดยต้นยาสูบที่นำมาทดลองมี 2 ประเภท ประเภทแรกเป็นต้นยาสูบปรกติ แต่อีกประเภทหนึ่งเป็นยาสูบที่มีการถ่ายย้ายยีน TR- และ TL - DNA จากพลาสมิดของ *Agrobacterium rhizogenes* 1855 ซึ่งปรกติใช้ชักนำการเกิดราก การเปรียบเทียบยาสูบทั้งสองกลุ่มมีจุดประสงค์เพื่อหาระดับสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเกิดดอกจากส่วนของลำต้นที่กำลังมีการเจริญทางลำต้น พบว่าสามารถเกิดดอกขึ้นบนเนื้อเยื่อได้โดยตรงหลังจากเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 25 วัน โดยสามารถเกิดดอกบน TCL ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี kinetin เพียงชนิดเดียว ซึ่งเนื้อเยื่อจากต้นพืชที่ผ่านการถ่ายย้ายยีนสามารถเกิดตาดอกบนอาหารที่ไม่มีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต หรือมี IAA 1 มคม หรือ kinetin เพียงชนิดเดียว แต่สามารถเกิดตาดอกได้ดีที่สุดเมื่อใช้ IAA ร่วมกับ kinetin 1 มคม เท่ากัน คือให้ยอด 77 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถเกิดตาดอกจากอาหารที่มี IAA 10.0 มคม ร่วมกับ kinetin 0.10 มคม ทั้งพืชปรกติ และพืชถ่ายย้ายยีน แต่กรรมวิธีนี้สามารถชักนำเนื้อเยื่อทั้งสองกลุ่มให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำให้เกิดตายอดของพืชทั้งสอง เนื้อเยื่อของยาสูบปรกติสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีบนอาหารที่มี IBA และ kinetin ส่วนพืชที่มีการถ่ายย้ายยีนพบว่าสามารถชักนำให้เกิดตายอดได้มากที่สุดบนอาหารที่มี IAA และ kinetin ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 1 มคม โดยเกิดยอดได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อไม่ใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโต ทำให้พืชทั้งสองชนิดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่ต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าไซโตไคนินสามารถชักนำเนื้อเยื่อลำต้นยาสูบปรกติให้ออกดอกได้ สำหรับพืชถ่ายย้ายยีน เกิดดอกมากขึ้นเมื่อใช้ NAAร่วมกับไซโตไคนิน โดยใช้ปริมาณ IAA เพิ่มขึ้น แสดงว่าอ๊อกซินมีผลในการกระตุ้นตาดอกในชิ้นส่วน TCLsของเนื้อเยื่อที่ยังไม่โตเต็มที่

Cousson *et al.* (1989) นำ TCLs ของต้นยาสูบไปเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งมี IBA และ kinetin โดยปรับระดับ pH ตั้งแต่ 3.8 ถึง 7.8 และ จำนวนเนื้อเยื่อ จาก 0.50 – 10.00 ชิ้นส่วน/มล เพื่อศึกษารูปแบบการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นส่วนต่างๆโดยไม่ผ่านแคลลัส โดยเนื้อเยื่อ TCLs ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีระดับน้ำตาล IBA และ kinetin เท่ากันแต่มี pH ต่างกันทำให้ลักษณะที่ตอบสนองทางสัณฐานวิทยาต่างกัน โดยพบว่าการเติม IBA ในอาหารทำให้เกิดตายอดบนอาหารที่มี pH 6.1 หรือ 7.8 ขณะที่เนื้อเยื่อขณะเลี้ยงจะเกิดทั้งดอกและตายอดขึ้นด้วยกันเมื่อใช้ pH 6.8 และพบว่าความหนาแน่นของเนื้อเยื่อ TCLs ที่เลี้ยงมีผลต่อลักษณะที่ตอบสนอง คือ มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของผนังเซลล์และ/หรือ plasmalemma

การปรับปรุงพันธุ์น้อยหน่า

Botti and Jordan (1992) รายงานว่าพันธุ์น้อยหน่าที่มีความสำคัญทางการค้าคือ *A.cherimola* (cherimoya) และ *A.reticulata* (custard apple) และบางพันธุ์เกิดจากการผสมข้าม แต่การปรับปรุงพันธุ์มีข้อจำกัดเนื่องจากใช้ระยะเวลาช่วงแรกที่รอการติดผลใช้ระยะเวลายาวนานมาก (5 ปี) และมีผลของความแปลปรวนทางพันธุกรรมที่สูงมาก ดังนั้นการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมที่ต้องการ และการใช้ molecular markers มาช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ลงน่าจะช่วยในการพัฒนาพันธุ์ได้ ดังนั้นจึงนำเทคโนโลยีที่ได้จากการทดลองกับพืช 2 ชนิดเป็นตัวอย่าง คือ *Solanum muricatum* (melon shrub) และ *S.quitoense* (naranjilla) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการผสมตัวเองสูง และมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย เพราะควบคุมด้วยยีนจำนวนน้อย และตามด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการปรับปรุงให้ได้ลักษณะต้านทานโรคและแมลงในพืชดังกล่าว

ในปัจจุบันได้มีการใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุลมาปรับปรุงพันธุ์พืชมากขึ้น เช่น ได้มีการศึกษาการถ่ายย้ายลักษณะทางพันธุกรรมใน cherimoya โดยอาศัยแบคทีเรีย *Agrobacterium* โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อควบคุมขบวนการสุกภายหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ควบคุมยีนที่สร้าง polygalacturonase ยีนที่สังเคราะห์ ACC synthase และมีจุดประสงค์รองเพื่อปรับปรุงลักษณะต้านทานโรคและแมลงในพืชดังกล่าว ส่วนการปรับปรุงพันธุ์น้อยหน่าโดยวิธีอื่นได้มีการทดลองโดยชักนำให้เกิดยอดและรากจาก endosperm ของน้อยหน่าซึ่งน้อยหน่าปรกติมีจำนวนโครโมโซม 2x=2n=14 ขณะที่ต้นที่ชักนำให้เกิดจาก endosperm จะมีจำนวนโครโมโซม 2x=3n=21 แต่เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้น triploid มีน้อยมากเพียง 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Nair *et al.*, 1986)

ตามปกติความสำเร็จของการถ่ายย้ายยีนในพืชต่างๆขึ้นอยู่กับความสามารถชักนำเซลล์ที่ผ่านการถ่ายย้ายยีนแล้วให้เป็นส่วนต่างๆ ของพืชได้ (Potrykus *et al.*, 1990) เคยมีรายงานว่ามีการถ่ายย้ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ทำหน้าที่เป็น vector เข้าไปในชิ้นส่วนพืชที่มีเซลล์จำนวนมากพบว่าการเกิดเป็นอวัยวะไม่ประสบความสำเร็จ แต่ถ้าใช้ชิ้นส่วนพืชที่มีเซลล์จำนวนน้อยสามารถถ่ายย้ายยีน และชักนำเป็นต้นพืชได้ดีกว่า (Colby *et al.*, 1991) แต่เนื่องจากยังมีการศึกษาเรื่องการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเกิดส่วนต่างๆ ของพืชที่ได้รับการถ่ายย้ายยีนมีน้อยมาก และยังมีการศึกษาในพืชไม่กี่ชนิด ดังนั้นจึงต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (Sangman *et al.*, 1992)

การเลี้ยงอับละอองเกสรของ *A.squamosa* บนอาหารสูตร Nitsch ที่เติม BA และ NAA โดยตัดแยกส่วนต่างๆ ของดอกในสารแขวนลอยของ activated charcoal กับ sucrose และนำอับละอองเกสรไปเลี้ยงบนอาหารโดยในระยะแรกเก็บไว้ในสภาพไม่มีแสง และใช้ sucrose ความเข้มข้นสูง

แล้วจึงจะนำไปเลี้ยงในสภาพมีแสง และระดับ sucrose ต่ำ พบว่าสามารถเกิดต้นพืช haploid ที่ชักนำจากแคลลัสได้ (Macarenhas *et al.*, 1984)

สำหรับ cherimoya พันธุ์ ' Fion de Jete ' ซึ่งเป็นพันธุ์หลักในสเปนสามารถทำสำเร็จได้โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วย ซึ่งรวมถึง somatic embryogenesis, adventitious organogenesis และ การเลี้ยงเซลล์เพื่อที่จะนำไปใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของ *A.cherimoya* ทำให้ได้พืช haploid, tetraploid และ triploid หรือพืชไร้เมล็ด นอกจากนี้การศึกษายังมีจุดประสงค์เพื่อการถ่ายย้ายยีนเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีในขบวนการหลังการเก็บเกี่ยว และมีลักษณะที่สามารถต้านทานโรคและแมลงอีกด้วย (Caro *et al.*, 1999)

นอกจากนั้นยังมีพืชชนิดอื่นๆ ที่มีการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น kiwifruit ซึ่งตลาดของ kiwifruit (*Actinidia dilieiosa*) ที่ปลูกเป็นจำนวนมากมีอยู่เพียงพันธุ์เดียวคือ 'Hayword' ซึ่งยังไม่มีการนำความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่มาใช้ให้เป็นประโยชน์อย่างเต็มที่ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเทคนิคที่ก้าวหน้า เช่น organogenesis, somatic embryogenesis, การเลี้ยง endosperm, haploidy, การเลี้ยง protoplast การใช้ molecular markers และการถ่ายย้ายยีน ซึ่งการปรับปรุงทางพันธุกรรมที่มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ลักษณะการต้านทานต่อโรคและแมลง (Botti and Jordan, 1992)