บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเกี่ยวกับการขยายพันธุ์หงส์เหินในสภาพปลอดเชื้อ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การศึกษาเกี่ยวกับขนาดเพื่อการขยายพันธุ์

จากการศึกษาเกี่ยวกับขนาดของชิ้นส่วนพืชที่ได้จากต้นเดิมที่เลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้ออยู่ก่อนแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1.0 มก/ล (การทดลองที่ 1) พบว่าขนาดของพืชมีความสำคัญ โดยชิ้นส่วนโคนต้นที่มีขนาดใหญ่สามารถเกิดยอดได้เร็วกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก คือ ชิ้นส่วนพืชขนาด 0.5 ซม ใช้เวลาในการเกิดยอด 4.3 วัน ส่วนการตัดขนาด 0.2 และ 0.3 ซม ใช้เวลาในการเกิดยอดใหม่นานกว่าคือ 5.2 และ 5.0 วัน ตามลำดับส่วนจำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้พบว่าชิ้นส่วนทั้ง 3 ขนาดให้จำนวนยอดใหม่ไม่แตกต่างกันนัก คือได้ 2.5 - 2.9 ยอดตามลำดับ การที่ชิ้นส่วนขนาดใหญ่ใช้เวลาในการเกิดยอดได้เร็วกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก อาจเป็นเพราะชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีจำนวนตาข้างที่พัฒนาอยู่ก่อนแล้วมากกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็ก หรืออาจเป็นเพราะระดับของ endogenous ฮอร์โมนที่มีในชิ้นส่วนพืชเอง คือ มีสัดส่วนของไซโตไคนินต่ออ๊อกซินสูง เนื่องจากถูกตัดกาบใบออกไป จึงชักนำให้เกิดยอดได้เร็วกว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็ก เช่นเดียวกับงานทดลองของ จามจุรี (2533) ซึ่งได้ทำการทดลองขยายพันธุ์กระเจียวแดงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญ โดยชิ้นส่วนขนาดใหญ่สามารถใช้เวลาในการเกิดต้นและได้จำนวนต้นมากกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังอาจเป็นเพราะรอยแผลที่เกิดจากการตัดของชิ้นส่วนขนาดเล็กมีผลต่อการเจริญเป็นยอดของชิ้นส่วน จึงทำให้ชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กใช้ระยะเวลาในการเกิดยอดนานกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่

ขนาดของชิ้นส่วนพืช มีผลต่อความสูงต้น พบว่าชิ้นส่วนขนาดใหญ่ให้ต้นที่มีความสูงมากกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก โดยต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อโคนต้นที่มีขนาด 0.5 ซม มีความสูงเฉลี่ย 10.9 ซม ซึ่งมีความสูงมากกว่าการตัดขนาด 0.2 และ 0.3 ซม ซึ่งมีความสูง 8.2 และ 8.3 ซม ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอาหารที่ดูดจากอาหารใช้เลี้ยงที่มีอยู่ในชิ้นส่วนขนาดใหญ่ มีมากกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กกว่าทำให้ต้นมีความสูงมากกว่า และเป็นเพราะอายุของต้นที่เกิดจากชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีอายุมากกว่าเพราะเกิดยอดก่อน

ขนาดของชิ้นส่วนพืชไม่มีผลต่อการเริ่มเกิดราก คือชิ้นส่วนที่ไม่ว่าขนาดใหญ่หรือขนาดเล็กใช้เวลาในการเริ่มเกิดรากเฉลี่ย 8.8 วันหลังจากเริ่มเลี้ยง อาจเป็นเพราะว่าในตัวของเนื้อเยื่อมีปริมาณอ๊อกซินที่พืชสะสมไว้สมดุลต่อการเกิดรากและส่งผลให้ยอดใหม่ที่เกิดจากเนื้อเยื่อแม่ได้รับอิทธิพลนั้น หรือเกิดจากการพัฒนาเกิดต่อจากจุดกำเนิดเดิมที่มีอยู่แล้ว

ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยง พบว่าชิ้นส่วนโคนต้นที่นำมาเลี้ยง แม้ไม่สามารถสังเกตเห็นรากได้ด้วยตา แต่จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าจุดกำเนิดรากเริ่มเกิดแล้วในบริเวณใกล้ท่อลำเลียงและพัฒนาให้เห็นชัดเจนขึ้นในวันที่ 4 หลังการเลี้ยง และสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อไปได้นานเกิน 7 วัน คือ 8.8 วัน ส่วนการเกิดยอดใหม่นั้น พบว่าเซลล์ตื่นตัวเกิดขึ้นหลังการเลี้ยง 2 วัน แต่เริ่มมีการพัฒนาเป็นใบที่อ่อนมาก (leaf primodia) ให้เห็นภายในวันที่ 4 ต่อมาจุดกำเนิดของตาที่เห็นพัฒนาเร็วมาก โดยจะเป็นตาที่สมบูรณ์ในวันที่ 5 และสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า การที่พืชชนิดนี้เกิดจุดกำเนิดยอด และรากได้เร็วภายใน 1 สัปดาห์นั้น การเกิดอวัยวะดังกล่าวเกิดโดยตรงจากเนื้อเยื่อแม่ที่นำมาเลี้ยงโดยไม่ผ่านแคลลัส นอกจากนี้ สมดุลของอ๊อกซินในเนื้อเยื่อแม่ก็เหมาะต่อการเกิดราก แต่อาจไม่เหมาะสำหรับการเกิดยอดจึงต้องเติม BAP ในอาหารเพื่อให้เกิดสมดุล BAP ที่เหมาะสมสำหรับการเกิดยอด (exogenous cytokinin)

2. การศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของอาหาร

การศึกษาผลของ NAA และ BAP ที่มีต่อการแตกหน่อและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนโคนต้นที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นจากการทดลองที่ 2 พบว่า เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนโคนต้นบนอาหารวุ้นสูตร MS ดัดแปลงที่เติม NAA และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า NAA ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อจำนวนวันเมื่อเริ่มเกิดยอด แต่เมื่อพิจารณาผลของ NAA เพียงอย่างเดียวพบว่าถ้าไม่ใช้ NAA เกิดยอดได้ดีดีกว่าและยิ่งใช้ NAA ความเข้มข้นสูงยิ่งใช้เวลาในการเกิดยอดนาน แต่เมื่อพิจารณาผลของ BAP อย่างเดียวกลับไม่แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญ ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะชิ้นส่วนแม่ที่นำมาเลี้ยงได้รับอิทธิพลของ BAP ในอาหารก่อนแล้วซึ่งเพียงพอสำหรับการแตกยอดใหม่ แต่ระดับที่ใช้ในอาหารครั้งนี้ อาจอยู่ในช่วงที่พืชทดลองทนได้ และการเลี้ยงก็เป็นระยะเวลาที่ไม่นานเกินไป คือเพียง 8 สัปดาห์ แต่ในแง่ของ NAA ซึ่งเหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดราก ในอาหารเดิมก่อนย้ายเนื้อเยื่อไม่มีอ๊อกซินจึงแสดงผลให้เห็นได้ชัดเจนต่อการเริ่มเกิดยอดใหม่ โดยไม่มีความจำเป็นต้องใช้ NAA ในอาหาร นอกจากนี้ NAA และ BAP แสดงอิทธิพลร่วมกันเกี่ยวกับจำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงต้น และจำนวนใบเฉลี่ย ซึ่งจะพบว่า NAA ระดับ 0-0.5 มก/ล เมื่อใช้ร่วมกับ BAP 5.0 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งก็น่าจะมาจากเหตุผลเดียวกันคือ NAA เป็นอ๊อกซินที่เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดรากดังนั้นเมื่อไม่ใช้หรือใช้จำนวนน้อย จึงทำให้เกิดยอดและใบดีขึ้น และเมื่อใช้ NAA ความเข้มข้น 0-0.5 มก/ล ร่วม

กับ BAP 0.5 มก/ล เหมาะสำหรับทำให้ข้อยืดยาวขึ้น หากใช้ในความเข้มข้น 1.0 มก/ล จะทำให้ต้นมีขนาดสั้นกว่าเมื่อไม่ใช้ NAA หรือใช้ที่ 0.5 มก/ล ส่วนจำนวนใบเฉลี่ยก็เช่นกันเมื่อใช้ NAA ระดับ 0-1.0 มก/ล ร่วมกับ BAP 0-0.5 มก/ล ทำให้เกิดใบมากขึ้น แต่ในอาหารที่ไม่มี NAA เลย ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด สาเหตุน่าจะมาจากในอาหารที่ไม่มี NAA มีการเกิดยอดก่อนในภาพรวม ในทางกลับกัน เมื่อพิจารณา BAP อย่างเดียว จำนวนยอดเฉลี่ยจาก BAP ที่มีความเข้มข้น 5.0 มก/ล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด และเมื่อความเข้มข้นลดลงก็ให้จำนวนยอดน้อยลงตามลำดับ เนื่องจาก BAP เป็นไซโตไคนินที่ส่งเสริมการเกิดยอด แต่ BAP ที่ระดับสูง 2.0-5.0 มก/ล ทำให้ยอดสั้นลงอย่างเห็นได้ชัด หากต้องการให้ยอดยืดและมีจำนวนใบเฉลี่ยมาก จึงน่าจะเปลี่ยนอาหารใหม่ไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี BAP หรือมี BAP เพียง 0.5 มก/ล ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมาจาก การใช้ BAP ระดับต่ำ ทำให้สมดุลของอ๊อกซินต่อไซโตไคนินสูงจึงเกิดใบได้มาก เมื่อมาพิจารณาในเรื่องราก พบว่า NAA และ BAP มีอิทธิพลร่วมกันต่อจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย เมื่อไม่ใช้ NAA ในอาหาร แต่ใช้ BAP ที่ระดับ 2.0 และ 5.0 มก/ล ทำให้เกิดรากช้าที่สุด NAA ระดับ 5.0 และ BAP 0.5 มก/ล เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด และ เมื่อไม่ใช้ NAA แต่ใช้ BAP 1.0 มก/ล มีความยาวรากมากที่สุด เมื่อพิจารณาผลของ NAA อย่างเดียว ต่อการเกิดราก พบว่าเมื่อใช้ NAA 0.5-5.0 มก/ล เกิดรากเร็วกว่าเมื่อไม่ใช้ NAA ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะ NAA มีผลด้านการชักนำให้เกิดราก และที่ระดับ 5.0 มก/ล ก็ยังไม่สูงเกินไป แม้ว่า เมื่อไม่ใช้ NAA ก็สามารถเกิดรากได้ อาจเป็นเพราะในตัวเนื้อเยื่อในตัวเนื้อเยื่อแม่เองมีอ๊อกซิน (endogenus) อยู่ในระดับที่พอเหมาะต่อการเกิดรากอยู่บ้างแล้ว แต่หากพิจารณาถึงผลของ BAP อย่างเดียว พบว่าจะให้ผลในทางกลับกัน โดยเมื่อไม่ใช้ BAP หรือ ใช้ที่ระดับ 0.5 มก/ล รากเกิดเร็วกว่าเมื่อใช้ BAP ระดับสูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะ เมื่อเติม BAP ลงในอาหารจะทำให้อัตราส่วนของอ๊อกซินต่อไซโตไคนินต่ำลง ซึ่งจะทำให้เหมาะสมต่อการเกิดรากน้อยลง ซึ่งผลที่กล่าวมาแล้วสอดคล้องกับงานของ (Murashige, 1974) ที่กล่าวว่าโดยทั่วไปอัตราส่วนของอ๊อกซินและไซโตไคนินมีผลทำให้เกิดยอดหรือราก โดยถ้ามีอ๊อกซินในความเข้มข้นสูง จะทำให้เกิดรากและยับยั้งการเกิดยอด ในทางตรงกันข้าม ถ้ามีไซโตไคนินในความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดยอดและยับยั้งการเกิดราก นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญในการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตขึ้นกับชนิดของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตนั้น ความเข้มข้น และอัตราส่วนของสารชนิดต่างๆที่ใช้ (Shutter, 1988) สำหรับจำนวนรากเฉลี่ยนั้น เมื่อไม่ใช้ NAA เลยจะมีจำนวนรากน้อยที่สุด และเมื่อใช้ 2.0 มก/ล มีจำนวนรากอยู่ในกลุ่มมากที่สุด แต่ระดับสูงขึ้นไป จำนวนรากจะลดลง อาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ระดับนี้เริ่มสูงเกินไป สำหรับความยาวรากเฉลี่ยเห็นได้ชัดว่าไม่ควรใช้ NAA ที่ระดับ 5.0 มก/ล เนื่องจากรากสั้นกุดอย่างเห็นได้ชัด ในทางตรงกันข้าม เมื่อพิจารณาถึงผลของ BAP เพียงอย่างเดียวต่อจำนวนรากเฉลี่ย พบว่า BAP ที่ 0

และ 1.0 มก/ล ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากกว่าเมื่อใช้ BAP ระดับสูงขึ้น ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับความยาวรากเฉลี่ยด้วย

ผลของการเกิดยอดและรากดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Reynolds (1987) ที่กล่าวว่า สารกระตุ้นการเจริญเติบโตจากภายนอกที่ใส่เข้าไปในอาหารส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตและการสร้างส่วนต่างๆ (morphogenesis) ของเซลล์ อวัยวะและเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาพแวดล้อมด้วย (ไพบูลย์, 2524) นอกจากนี้ Leopold and Kriedeman (1975) กล่าวว่าสารในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นสูง มีผลต่อการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์มากกว่าการขยายเซลล์ แต่ในทางตรงกันข้ามกลับมีผลทำให้จำนวนรากเฉลี่ยที่เกิดมีจำนวนลดลง ฐิติภาส (2530) รายงานว่าได้นำต้นขิงที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนต้นได้ในปริมาณมาก และที่ระดับความเข้มข้นสูงให้จำนวนต้นเพิ่มมากขึ้นกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ แต่จำนวนต้นที่ได้มีขนาดเล็กลง ในทำนองเดียวกัน จามจุรี (2533) รายงานผลการทดลองในกระเจียว พบว่า ผลของ BAP ที่ใส่ลงไปในอาหารวุ้น สูตร MS 5.0 มก/ล จะทำให้จำนวนต้นเพิ่มมากขึ้นโดยไม่มีราก และการใช้ ไซโตไคนินมากกว่า 5.0 มก/ล ไม่มีผลทำให้จำนวนยอดเพิ่มมากขึ้นแต่อย่างใด

3. การเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อน

จากการศึกษาขนาดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงช่อดอกอ่อน 3 ขนาด คือ น้อยกว่า 0.5 , 0.5 และ 1.0 ซม ร่วมกับการตัดแบ่งชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อน 2 แบบคือ การตัดแบ่งโดยผ่าครึ่งตามขวาง และการไม่ตัดแบ่ง ส่วนในการทดลองที่ 3.1 พบว่าชิ้นส่วนขนาด 0.5 ซม ที่ไม่ได้ตัดแบ่งสามารถเกิดยอดได้เร็วที่สุด แต่เมื่อตัดแบ่งครึ่งตามขวางเกิดยอดได้เร็วรองลงมา ในขณะที่ช่อดอกขนาด น้อยกว่า 0.5 ซม ที่ตัดแบ่งและเลี้ยงทั้งช่อไม่เกิดยอดและแห้งตายไปในที่สุดซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงหรือสภาพที่ใช้เลี้ยงไม่เหมาะสมทั้งในเรื่องสารกระตุ้นการเจริญเติบโตและอาจต้องการอาหารที่ซับซ้อนกว่าหรืออาจเป็นเพราะช่อดอกอ่อนเกินไป ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานทดลองของประทุมพร (2538) ที่ได้ทดลองเลี้ยงดอกอ่อนของประยงค์ซึ่งพบว่าในดอกอ่อนของประยงค์ที่นำมาเลี้ยงมีเพียงการขยายขนาดของดอกและเปลี่ยนสีกลีบดอกจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และจากนั้นก็เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตาย ส่วนขนาดช่อดอก 1.0 ซม ใช้เวลาในการเกิดยอดนานกว่าขนาด 0.5 ซม เพราะช่อดอกอาจเริ่มพัฒนาไปมากแล้วจึงทำให้การชักนำให้เกิดยอดใช้เวลานาน ซึ่งมีรายงานการทดลองหลายการทดลองที่สนับสนุนผลการทดลองนี้ เช่น Onisei *et al.* (1993) ทำการเพาะเลี้ยงส่วนปลายของช่อดอกอ่อนของ *Digitalis lanata* และ *D. purpurea* โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นบนอาหารพื้นฐาน MS โดยเกิดต้นประมาณ 10 – 15 ต้นต่อชิ้นส่วน และยังพบว่าการพัฒนายอดใหม่จากการ

เลี้ยงช่อดอกอ่อนใช้เวลาค่อนข้างนาน เช่นเดียวกันคือใช้เวลาในการเกิดยอดเฉลี่ยประมาณ 3–5 เดือน และในปีเดียวกันนี้ Chang and Criley ทดลองนำกลีบประดับจากช่อดอกของขิงสีชมพู มากระตุ้นให้มีการพัฒนาของต้นและราก โดยต้องใช้ระยะเวลา นานถึง 9 เดือน นอกจากนี้การชักนำยอดจากช่อดอกอ่อนสามารถทำได้ในต้นพืชกลุ่มนี้ด้วย Richwine *et al.* (1995) รายงานว่าได้นำเอาช่อดอกอ่อนของ *Aloe* , *Gasteria* และ *Haworthia* มาเลี้ยงและชักนำให้เกิดยอดและราก โดยใช้เวลานาน 8–12 สัปดาห์ และการที่ช่อดอกอ่อนสามารถนำมาชักนำให้เกิดต้นได้โดยตรงโดยไม่ผ่านแคลลัสเพราะส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยเซลล์พวก parenchyma แต่อาจมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ในส่วนของก้านดอกหรือฐานรองดอก จึงสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ (ประศาสตร์, 2538)

สำหรับจำนวนยอดเฉลี่ย พบว่าทั้งสองปัจจัยที่ทดลองให้ผลร่วมกัน โดยพบว่าขนาดช่อดอก 0.5 ซม ไม่ตัดแบ่ง สามารถให้จำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดรากดีที่สุด และเมื่อพิจารณาเฉพาะผลของขนาดช่อดอกอ่อน พบว่าขนาด 0.5 ซม เป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการเกิดยอด ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก ส่วนรูปแบบการตัดนั้น การเลี้ยงชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนโดยไม่ตัดแบ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ยได้ดีที่สุด ส่วนจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดรากนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันกับการตัดแบ่งเมื่อจำนวนวันเกิดยอดของช่อดอกขนาด 0.5 ซม สามารถเกิดได้เร็วกว่าชิ้นส่วนอื่นจึงส่งผลให้เกิดการยืดตัวของยอดได้เร็วจึงทำให้มีความสูงมากกว่าชิ้นส่วนอื่น และสามารถเกิดใบได้มากเช่นกัน

ส่วนการศึกษาผลของ NAA และ BAP ที่มีต่อการเจริญเติบโตของช่อดอกในการทดลองที่ 3.2 โดยใช้ NAA และ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0-5.0 มก/ล เท่ากัน พบว่ามีผลร่วมกัน ต่อจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และจำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก โดย NAA ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/ล และ BAP ที่ความเข้มข้น 5.0 มก/ล เหมาะสมที่สุด แต่ระดับของสารทั้งสองชนิดที่ใช้ร่วมกันในระดับอื่นให้ผลไม่ชัดเจน ยกเว้นเมื่อไม่ใช้ BAP กับทุกระดับของ NAA ที่ยอดเกิดช้า ที่เป็นเช่นนี้เพราะ BAP ส่งเสริมการเกิดยอด ซึ่งเมื่อยอดเกิดช้าก็ส่งผลให้ ความสูงน้อยลงด้วย เนื่องจากมีช่วงเวลาการเจริญน้อยกว่า เมื่อสังเกตุดูด้วยตาเปล่าพบว่าลักษณะการเจริญเติบโตและความสมบูรณ์ของต้นที่ได้มีความแข็งแรง อวบใหญ่อย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะผลของ NAA เพียงอย่างเดียว พบว่า NAA ระดับ 1.0 มก/ล เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย และยังทำให้จำนวนใบเฉลี่ยมีมากที่สุดอีกด้วย แต่ NAA 5.0 มก/ล ช่วยให้เกิดรากเร็วที่สุด และมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เพราะหากใช้ NAA สูงถึง 5.0 มก/ล จะทำให้สมดุลของฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อสำหรับการเกิดยอดเปลี่ยนไป ซึ่งทำให้ได้จำนวนยอดน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาเฉพาะผลของ BAP พบว่า BAP ที่ระดับ 5.0 มก/ล เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบ

เฉลี่ย สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ BAP ระดับสูงมีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์และส่งเสริมการเกิดยอด ซึ่งหากดูจากผลการทดลองนี้แล้วพบว่าไม่จำเป็นต้องเติม BAP ในอาหาร เนื้อเยื่อก็เกิดยอดใหม่ได้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในตัวช่อดอกเองอยู่ในระยะอ่อนอยู่ มีปริมาณไซโตไคนินเพียงพอต่อการชักนำให้เกิดยอดจากช่อดอกอ่อนซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ง่ายต่อการเปลี่ยนแปลง

ด้วยเหตุนี้จึงเคยมีรายงานการเลี้ยงช่อดอกอ่อนของประทุมมา เช่น Wannakrairoj (1992) ได้เพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของประทุมมาบนอาหารดัดแปลงสูตร MS (1962) พบว่าการเติม BA 3.0 มก/ล ร่วมกับน้ำตาล 45 ก/ล มีผลทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนยอดเป็น 4.83 เท่าของการเจริญเติบโตตามปกติ

4. ผลของ Thin cell layer ที่มาจากตำแหน่งของข้อที่ต่างกันและลักษณะการตัดที่มีต่อการเติบโต

จากการทดลองที่ 4 พบว่าเมื่อนำข้อที่ตำแหน่งแตกต่างกันและลักษณะการตัดแบ่งแบบผ่าครึ่งตามยาวและผ่าครึ่งตามขวางโดยให้มีความหนา 0.1 ซม แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1.0 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ โดยการเลี้ยงข้อในตำแหน่งที่แตกต่างกันนั้น พบว่าส่วนข้อที่โคนต้น (ข้อที่ 1) มีการเริ่มเกิดยอดใหม่เร็วที่สุด และเมื่อข้ออยู่สูงขึ้นไปการเกิดยอดจะช้าลงตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม จำนวนยอดและความสูงเฉลี่ยจากข้อที่ 1 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด แต่จะน้อยลงตามลำดับเมื่อข้ออยู่ห่างจากโคนต้นมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะข้อในตำแหน่งที่อยู่บริเวณโคนต้นมีขนาดของข้อที่ใหญ่กว่า ทำให้ปริมาณอาหารสะสม พื้นที่ผิวที่สัมผัสอาหาร และจำนวนเซลล์มากกว่าข้อส่วนบนจึงมีโอกาสถูกชักนำได้มากว่าด้วย และข้อที่ 1 อยู่ห่างไกลจากเนื้อเยื่อจุดเจริญปลายยอด (meristem) และใบอ่อนมากที่สุดจึงอาจทำให้ปริมาณของอ๊อกซินไม่เท่ากับข้อส่วนปลายยอดซึ่งเมื่ออ๊อกซินน้อยลงสมดุลของอ๊อกซินต่อไซโตไคนินก็สูง โดยทั่วไปเหมาะสำหรับการเกิดยอดใหม่ แต่สัดส่วนนี้ไม่ได้มากเกินไปจึงยังทำให้ยอดใหม่ที่ได้ มีขนาดสูง และคุณภาพดี ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับการทดลองของสุรีย์พร (2534) ได้ทำการเลี้ยงยอดจากข้อส้มโอที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Schenk and Hildebrand (1972) ที่มีสารสกัดจากมอลท์และน้ำมะพร้าว พบว่า การเจริญเติบโตจะดีที่สุดเมื่อใช้ยอดที่เกิดจากข้อลำดับที่ 4–9 ซึ่งเป็นลำดับที่อยู่ห่างจากปลายยอดมากเพราะตำแหน่งข้อยิ่งห่างจากยอดจะช่วยให้ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาได้มากกว่ายอดที่ได้จากตำแหน่งข้อใกล้ยอด นอกจากนี้ ยังพบว่าลักษณะการตัดแบ่งเนื้อเยื่อให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นการตัดแบ่งแบบผ่าครึ่งตามยาวหรือผ่าครึ่งตามขวางสามารถให้จำนวนยอดได้ 2-3 ยอดภายในเวลา 1 สัปดาห์ อาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อที่ตัดมีขนาดเล็กและมีความบางมากจึงมีพื้นที่ผิวที่เป็นรอยตัดเป็นสัดส่วนพื้นที่ผิวต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นมากกว่าชิ้นส่วนขนาดใหญ่ จึงทำให้สามารถใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นซึ่ง Hosoki *et al.*(1989) ได้รายงานวิธีการเพิ่มปริมาณของ *Japanese horseradish* (Wasabi) (Extrema

Japonica Maxim) อย่างรวดเร็วโดยวิธีการแบ่งยอดออกเป็น 2 ส่วนตามยาว เพื่อชักนำให้ตาข้างเจริญ ด้วยวิธีนี้จะได้ต้น 1,000 ต้นจากการเลี้ยงปลายยอด 1 ยอดในระยะเวลา 1 ปี การตัดแบ่งนี้สามารถใช้กับพืชที่มีลำต้นเทียมได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Cronaure and Krikorian (1984)ได้ขยายกล้วยพันธุ์ Philippines Lacatan และ Grande Narine เพื่อให้ได้จำนวนต้นเพิ่มขึ้นโดยการเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เมื่อต้นมีความสูง 2 ซม จะผ่าตามยาว นำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งเหลวจะเกิดยอดใหม่ขึ้นจำนวนมาก ส่วนกล้วยพันธุ์ Pelipita นั้นส่วนยอดที่แบ่งครึ่งสามารถเกิดต้นได้ 18--27 ยอดภายในเวลา 4 สัปดาห์เท่านั้น

ส่วนจำนวนราก พบว่าการทดลองนี้ ตำแหน่งข้อ และลักษณะการตัดมีผลร่วมกันต่อจำนวนรากเฉลี่ย กล่าวคือ ตำแหน่งข้อที่ 1 ของการตัดจากทั้งสองกรรมวิธี ให้จำนวนรากมากที่สุด และจำนวนรากจะน้อยลงเมื่อตำแหน่งข้ออยู่สูงขึ้นไปจนข้อที่ 5 ไม่เกิดรากเลย ผลนี้เป็นการยืนยันว่าตำแหน่งข้อที่ 1 บริเวณโคนต้นมีอ๊อกซินมากกว่าข้อที่อยู่สูงขึ้นไปตามลำดับ

5. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนโคนต้น

จากการนำชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของหงส์เหินมาเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS ซึ่งเติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.25 และ 1.25 มก/ล ในการทดลองที่ 5.1 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ คือ 0–0.05 มก/ล นั้นสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตทางความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนใบ และจำนวนราก ดีที่สุดเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มก/ล และจำนวนยอดเฉลี่ยก็อยู่ในกลุ่มดีที่สุดด้วย แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นผลทั่วไปกลับทำให้ความสูงต้น จำนวนใบ และจำนวนรากค่อยลดลงตามลำดับเช่นเดียวกับเมื่อใช้ระดับต่ำกว่า และเห็นได้ชัดเมื่อไม่ใช้ 2,4-D เลย ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะ 2,4-D เป็นอ๊อกซินที่ไปลดอิทธิพลของ BAP ลงจึงทำให้ยอดยาวขึ้น แต่ยังคงมีอิทธิพลของ BAP อยู่บ้างในระดับที่ยังเหมาะสมต่อการเกิดยอดใหม่ด้วย แต่หากใช้ระดับสูงขึ้นจะทำให้สมดุลของไซโตไคนินและอ๊อกซินที่เหมาะสำหรับการเจริญดังกล่าวจึงแสดงออกโดยการเจริญลดลง และไม่เกิดยอดเมื่อระดับ 2,4-D ที่ใช้สูงสุด อย่างไรก็ตาม 2,4-D ทั้ง 2 ระดับสูงสุด ทำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อแม่แทน ที่เป็นเช่นนี้เพราะ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มอ๊อกซินที่มีผลในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และชักนำให้เกิดแคลลัส การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารที่มี 2,4-D มีผลทำให้เกิดแคลลัสแต่มีการเจริญเติบโตทางต้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากผลของ 2,4-D ในความเข้มข้นต่ำๆ อาจเกิดสมดุลที่พอเหมาะกับฮอร์โมนที่มีอยู่เดิมในชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อจึงทำให้ไปส่งเสริมการเจริญเติบโตทางลำต้นได้ แต่พบว่าเมื่อความเข้มข้นสูงมากขึ้นกลับมีผลทำให้เกิดการชะงักการเจริญ และจากการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.25 มก/ล เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในหงส์เหิน ซึ่งระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสม

ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันในชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิด เช่น การชักนำให้เกิดแคลลัสของลิลลี่ ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 4.0 มก/ล (Stimuat *et al.*1980) ในแกลดิโอลัส ใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มก/ล (Stefaniak,1994) และฟรีเซียใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก/ล (Tamura, 1978) เป็นต้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันไป เนื่องจากระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ในอาหารสัมพันธ์กับระดับของสารดังกล่าวภายในเนื้อเยื่อพืชด้วย

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนโคนต้นที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D 1.25 มก/ล ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่สามารถเห็นยอดด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน แต่จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าภายในเนื้อเยื่อพืชเองมีการเปลี่ยนแปลงเป็นจุดเริ่มต้นของตายอดแล้วที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการสะสม 2,4-D ในเนื้อเยื่ออาจยังไม่มากพอที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปในอาหารเดิมนาน 2 สัปดาห์ 2,4-D จะส่งผลให้เซลล์บริเวณท่อลำเลียงมีการแบ่งเซลล์จำนวนการย้อมสีจะติดสีเข้ม แสดงว่าระดับของ 2,4-D ที่ใช้เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสต่อไป และผลของ 2,4-D นี้ยังมีอิทธิพลต่อไปทำให้เกิดกลุ่มเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งเซลล์มาก แต่ละกลุ่มมีขอบเขตชัดเจน และสามารถหลุดเป็นอิสระจากเนื้อเยื่อแม่ได้ แต่ยังไม่เปลี่ยนเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ก้อนเนื้อเยื่อเหล่านี้สามารถเพิ่มปริมาณของก้อนใหม่ได้ ทำให้สามารถสังเกตเห็นด้วยตาในสัปดาห์ที่ 3 ก้อนเนื้อเยื่อเหล่านี้น่าจะเป็น embryogenic callus เพราะมีลักษณะร่วนและหลุดจากเนื้อเยื่อแม่ได้ และมีเม็ดกลมสีเหลืองแต่เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงมี 2,4–D ค่อนข้างสูงจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอัพภะที่สมบูรณ์ และ หรือเป็นยอดหรือราก หากต้องการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่น่าจะย้ายเนื้อเยื่อเม็ดเล็กๆ เหล่านี้ไปเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจาก 2,4-D และหรือใช้ weaker auxin แทน หรืออาจจำเป็นต้องใช้อ๊อกซินร่วมกับไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำร่วมกัน

ส่วนผลของความมืดและแสงที่มีต่อการเกิดแคลลัสในการทดลองที่ 5.2 พบว่า แคลลัสที่ได้สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่มืดและที่มีแสง แสดงว่าอิทธิพลของ 2,4-D สามารถแสดงออกได้ในทั้งสองสภาพ และที่แสงความเข้มข้นต่ำน่าจะช่วยให้แคลลัสที่เกิดมีการสังเคราะห์แสง เนื่องจากการเจริญในรูปของ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ก้อน embryogenic callus ที่ได้จากการเลี้ยงในที่มืดมีสีค่อนข้างขาวกว่า และแสดงอาการคล้ายฉ่ำน้ำซึ่งในการทดลองของ Bhansali and Arya (1978) ได้นำเอาส่วนลำต้นและรากของ *Citrus aurantifolia* มาเลี้ยงบนอาหารสูตร CM (Chaturvedi and Mitra, 1974) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันพบว่าแคลลัสสามารถเกิดได้ดีเมื่อเติม NAA, kinetin และ 2,4-D ในปริมาณ 0.5, 0.25 และ 0.25 มก/ล ตามลำดับ โดยพบว่าในที่มืดแคลลัสที่เกิดจากราก มีลักษณะอ่อนและร่วน มีสีขาวครีม ขณะที่แคลลัสของลำต้นมีลักษณะแข็ง แน่น เป็นเม็ดกลมๆ สีเหลืองซีด เมื่อนำแคลลัสของลำต้น

ไปเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP 0.5 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.05-0.1 มก/ล หรือไม่เติมก็ตาม สามารถเกิดยอดจำนวนมากเป็นจำนวนสูงถึง 10 –12 ยอดต่อชิ้นส่วนที่เลี้ยง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University