บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดยอดของน้อยหน่าในสภาพปลอดเชื้อครั้งนี้สามารถแบ่งกลุ่มปัจจัยทดลองได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

1. การศึกษาเกี่ยวกับชิ้นส่วนพืช

1.1 ขนาดของชิ้นส่วน

จากการศึกษาเกี่ยวกับขนาดของชิ้นส่วนน้อยหน่านั้น ได้ทดลองโดยใช้ลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงของต้นกล้าน้อยหน่าเหมือนการทดลองของ Blake and Lemos (1996) โดยลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงมีขนาดยาว 7 ซม จึงต้องแบ่งเป็น 3 ตำแหน่ง คือ โคน กลาง และปลาย ซึ่งแต่ละตำแหน่งใช้ขนาดที่ใช้ทดลองอยู่ 7 ขนาด คือ <0.50, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 และ 15.00 มม พบว่าโดยภาพรวมส่วนปลายสามารถเกิดยอดต่อชิ้นส่วนมากที่สุด รองลงไปคือ ส่วนกลางและโคนตามลำดับ และขนาดมีผลต่อการเกิดยอด ซึ่งขนาดที่ใหญ่ขึ้นโดยภาพรวมก็ทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นมีจำนวนมากขึ้นด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ขนาดใหญ่สุด แต่ขนาดเล็กเกินไปไปคือส่วนโคนขนาด < 0.50 – 2.00 มม และส่วนกลางขนาด 0.50 มม และเล็กกว่านี้ไม่เกิดยอดเลย นั่นเป็นเพราะส่วนปลายมีเซลล์พาเรนไคมาจำนวนมากและเป็นเซลล์ตื่นตัว (active) เพราะมาจากเนื้อเยื่อที่ยังอ่อนอยู่จึงสามารถถูกชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่า แต่เนื้อเยื่อส่วนโคนเกิดยอดได้น้อยเพราะมีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Famiani *et al.* (1994) ที่กล่าวว่าการเกิดยอดของ apicot เกิดจากเนื้อเยื่อซึ่งมีเซลล์ที่อยู่ในระยะที่เหมาะต่อการพัฒนา และมีเซลล์ที่มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะไม่เต็มที่ แต่มีเซลล์ที่มีกิจกรรมในการดูดซึมและเผาผลาญสารอาหารมากขึ้น ร่วมกับมีฮอร์โมนและธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นยอดได้มากกว่าส่วนอื่น ๆ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากส่วนปลายมีมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ส่วนโคนการเกิดยอดมีเปอร์เซ็นต์ต่ำน่าจะมาจากเหตุผลเดียวกัน ส่วนโคนที่มีขนาดเล็กมากไม่เกิดยอดอาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อที่เกิดยอดยากอยู่แล้ว แต่การตัดชิ้นส่วนบางมากทำได้ลำบาก และอาจทำอันตรายเนื้อเยื่อเนื่องมาจากเทคนิคการตัด และอาจเกี่ยวกับ BAP ที่ใช้ในอาหารที่เนื้อเยื่อส่วนโคน

นำไปใช้ ทำให้ สมดุลย์ภายในของเนื้อเยื่อเองไม่เหมาะสมซึ่งปรากฏให้เห็นจากการเกิดสีน้ำตาลก่อนตาย

นอกจากนี้ขนาดและตำแหน่งของชิ้นส่วนลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงยังมีผลต่อจำนวนวันเฉลี่ยที่เริ่มเกิดยอด โดยส่วนปลายจะเกิดยอดเร็วที่สุดเพียง 8.00 - 9.43 จากขนาด <0.50 – 1.00 มม ส่วนขนาดใหญ่ขึ้น เนื้อเยื่อส่วนปลายใช้เวลาในการเกิดยอดมากขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับเนื้อเยื่อจากส่วนกลาง และส่วนโคนที่มีเนื้อเยื่อขนาดเล็กลงใช้เวลาการเกิดยอดมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด สาเหตุอาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อเล็กมากจากส่วนปลายที่มีเซลล์ตื่นตัวมากเมื่อหลุดจากอิทธิพลของต้นแม่ (ต้นกล้า) สามารถแสดงศักยภาพได้เร็วกว่า แต่เนื้อเยื่อขนาดใหญ่ขึ้นแม้ใช้เวลาเกิดยอดนานกว่าแต่ก็ไม่เกิน 2 สัปดาห์ สำหรับเนื้อเยื่อส่วนกลาง และโคนซึ่งมีเซลล์ที่เปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะมากกว่าเมื่อตัดขนาดบางมากน่าจะฟื้นตัวเพื่อแบ่งเซลล์สร้างยอดใหม่ได้ช้ากว่า

จากการพิจารณาถึงความเหมาะสมในการทำ TCLs กับน้อยหน่าไม่จำเป็นต้องตัดเนื้อบางมากเช่น 0.50 มม ซึ่งเป็นขนาดใกล้เคียงกับ ยาสูบ และ *Aranda deborah* ที่ใช้ขนาด 0.60 มม (Altamura and Capitani, 1992 ; Lakshmanan et al., 1995) เนื่องจากจำนวนยอดที่เกิดต่อชิ้นน้อยเกินไปและหากพิจารณาระยะเวลาการเกิดยอดร่วมกับจำนวนยอดน่าจะใช้เนื้อเยื่อส่วนปลายขนาด 1.00 มม แม้ว่าเนื้อเยื่อขนาด 15.00 มม สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด แต่ เนื้อเยื่อขนาด 15.00 มม มีขนาดใหญ่เกินไปที่จะนำมาทำ TCLs อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อขนาดใหญ่จากส่วนปลายก็น่าจะนำมาใช้ได้ดีในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่า หรือการขยายพันธุ์ต้นลูกผสมเพื่อผลิตต้นที่สม่ำเสมอเพื่อทดสอบในด้านต่างๆ ต่อไป

1.2 ตำแหน่งเนื้อเยื่อจากต้นกล้า

ในการศึกษาหาตำแหน่งของต้นกล้าที่เหมาะสมต่อการเกิดยอด พบว่าตำแหน่งต่างๆของต้นกล้าให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาถึงตำแหน่งปล้องที่ 1 และลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง พบว่าไม่สามารถเกิดยอดได้ ซึ่งต่างจากผลที่ได้จากการทดลองที่ 1.1 เนื่องจากต้นกล้าที่ใช้ในการทดลอง 1.1 มีอายุเพียง 1 สัปดาห์ และมีความสูง 7 ซม ในขณะที่การทดลองนี้ได้เลี้ยงต้นกล้าไว้จนครบ 4 สัปดาห์ ต้นกล้าที่มีอายุมากอาจเกิด lignification เกิดการสะสมของลิกนิน และแทนนิน ทำให้เนื้อเยื่อที่แก่เกินไปจะใช้เวลาเฉลี่ยในการเกิดยอดมากขึ้นด้วย นอกจากนั้นยังเกิดสีน้ำตาลที่ผิวของเนื้อเยื่อและในอาหาร ซึ่งอาจเกิดจากการที่เนื้อเยื่อมีการปล่อยสารแทนนินแพร่ลงไปในอาหาร ซึ่งการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อพืชที่มีเนื้อไม้ เนื่องจากมีสารพวก tannins และ hydroxyphenol ในระดับสูงอันเนื่องจากการทำงานของ copper – containing oxidase enzyme ได้แก่ polyphenol oxidase และ tynosinase เป็นต้น ซึ่งมักจะทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อเป็นไปได้ช้า หรืออาจทำให้การเจริญหยุดชะงักไป การใช้สารประกอบพวก antioxidant ต่างๆ เช่น polyvinyl pyrrolidone [polyvidone] (PVP), ascorbic acid และ glutathione สามารถกระตุ้นการเพิ่ม

จำนวนยอด และลดอาการเกิดสีน้ำตาลได้ (Goreux, 1991) นอกจากนี้การย้ายชิ้นส่วนไปยังอาหารใหม่บ่อยๆ สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อได้เช่นกัน เพื่อรอให้มีข้อและปล้องครบตามที่ต้องการก่อน เนื้อเยื่อส่วนใต้ใบเลี้ยงอาจแก่เกินไปส่วนจำนวนวันเฉลี่ยในการเกิดยอดของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมคือ ข้อที่ 1 ใช้เวลาน้อยที่สุดในขณะที่ลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เริ่มแข็งตัดยากใช้เวลาในการเกิดยอดมากที่สุด สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของข้อที่ 1 ก็สูงที่สุด และข้อที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรองลงมา ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลเดียวกับที่กล่าวข้างต้นแล้ว การเกิดยอดในการทดลองนี้ผลของตำแหน่งของ ต้นกล้านี้ต่างจากการทดลองของ Dodd *et al.*, (1994) พบว่าจากการเลี้ยงลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงของ *A.atemoya* จะได้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อวันมากที่สุดจากลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงบริเวณใกล้ราก

2. การศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของอาหาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ส่วนประกอบของอาหารมีส่วนสำคัญต่อการชักนำให้เกิดส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช โดยเฉพาะอัตราส่วนของอ๊อกซินและไซโตไคนิน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการบังคับทิศทางการเกิดต้นหรือรากจากชิ้นส่วนพืช ถ้าอ๊อกซินสูงจะทำให้เกิดรากและยับยั้งการเกิดยอด แต่ถ้าไซโตไคนินสูงจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์การเกิดยอด และยับยั้งการเกิดราก (ประศาสตร์, 2538)

จากการศึกษานี้เป็นการใช้สารไซโตไคนิน คือ BAP ร่วมกับอ๊อกซิน คือ IBA (การทดลองที่ 2.1) เพื่อหาอัตราส่วนของอ๊อกซินต่อไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเจริญของยอดอ่อนซึ่งเคยเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP สูงคือ 8.0 มก/ล และในอาหารนั้นยอดไม่ยืด ในการทดลองที่ 2.1 ซึ่งพบว่าแม้ไม่ใช้ BAP ก็ไม่ทำให้ยอดยืดขึ้น เป็นเพราะชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงสะสม BAP ไว้มากจึงแสดงผล (carrying – over effect) ในอาหารที่เลี้ยงใน subculture ต่อมา และไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญด้านอื่นด้วย แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะผลของ IBA อย่างเดียว พบว่ามีผลต่อความยาวข้อเฉลี่ยและความยาวใบเฉลี่ย แต่ก็ไม่สามารถหักล้างผลรุนแรงของ BAP ได้ จึงไม่แสดงอิทธิพลร่วมกัน ในการทดลองที่ 2.2 เมื่อใช้ kinetin ในปริมาณที่สูงขึ้นทำให้ต้นมีความสูงเฉลี่ยเพิ่มขึ้น โดย kinetin ที่ 5.0 มก/ล จะให้ต้นมีความสูงมากที่สุดเฉลี่ย 1.91 มม ส่วนลักษณะอื่นๆ ในการทดลองนี้พบว่า kinetin ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งความยาวข้อเฉลี่ย ขนาดใบเฉลี่ย และจำนวนใบ แต่เมื่อใช้ kinetin ที่ร่วมกับ IBA อิทธิพลร่วมกันต่อความสูงและขนาดใบเฉลี่ย โดยเมื่อใช้ IBA ร่วมกับ kinetin ทุกระดับความสูงเฉลี่ยไม่ได้รับอิทธิพลมากเช่นเดียวกับเมื่อใช้ IBA ร่วมกับ kinetin 0 – 0.3 มก/ล แต่เห็นผลชัดเมื่อเพิ่ม kinetin เป็น 5.0 มก/ล อาจเป็นเพราะ kinetin เป็นไซโตไคนินที่อ่อน (weak cytokinin) เมื่อใช้ในระดับที่เหมาะสมร่วมกับ IBA จึงสามารถลดอิทธิพลของ BAP ในอาหารเดิมก่อนย้าย โดยแสดงผลร่วมกันต่อการเจริญของยอด

ในการศึกษาผลร่วมระหว่าง BAP และ GA_3 พบว่า BAP และ GA_3 มีผลร่วมกันต่อการเกิดและเจริญของยอดน้อยหน่า แต่เมื่อใช้ GA_3 5.0 มก/ล เพียงอย่างเดียว ทำให้ยอดมีการเจริญมาก

ที่สุด แต่ความสูงลดลงมากเมื่อเพิ่ม BAP ทุกระดับความเข้มข้น ในการทดลองของรังสิมา (2536) ไซโตไคนินไม่ช่วยในการเพิ่มปริมาณต้น แต่จะส่งผลให้เกิดการยืดยาวของต้นในด้านความสูงในปอสา นอกจากนี้ยังมี GA_3 ที่ช่วยในการเจริญของพืชด้วย โดยพบว่า GA_3 1.0 มก/ล เมื่อใช้ร่วมกับ BAP 1.0 มก/ล ทำให้ยอดยืดยาวได้ แต่ถ้าใช้ GA_3 เพียงชนิดเดียว ระดับ GA_3 ที่ทำให้ยอดมีความยาวมากที่สุดคือ 1.0 มก/ล สำหรับการเลี้ยงข้อส้มโอบนอาหารที่มี BAP 1.0 มก/ล มีการแตกตาและตาเจริญเติบโตเป็นยอด โดยมีขนาดของยอดยาวเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณ GA_3 มากขึ้น (สุรีย์พร, 2534) GA_3 ไม่มีผลต่อการเกิดตา แต่ GA_3 ทำให้ยอดมีความยาวเพิ่มขึ้น (Kawase *et al.*, 1989, Kochba *et al.*, 1973 และ Altman and Goren, 1974) จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า GA_3 1.0 มก/ล มีผลทำให้ยอดมีความสูงมากที่สุด เนื่องจาก GA_3 ทำให้ปล้องของยอดยืด (Altman and Goren, 1974) ถ้าไม่ใช้ GA_3 กว่าที่เกิดจากเมื่อเติม GA_3 ถึงระดับ 5 มก/ล ทำให้ใบมีความกว้าง และมีจำนวนใบน้อยลง นั่นแสดงให้เห็นว่าอาหารที่มี GA_3 มีผลต่อการเจริญของยอดน้อยหน่าทางด้านบวก แต่จากการทดลองของ Guardiola *et al.* (1982) พบว่า GA_3 ที่มีความเข้มข้นสูงที่ 10.0 มก/ล ทำให้การขยายแผ่นใบถูกยับยั้ง ขณะที่ความยาวข้อ และความยาวใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ GA_3 ระดับต่างๆ

เมื่อพิจารณาปริมาณ BAP ที่ใช้ในอาหารเพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อไม่ใช้ BAP ยอดจะมีความสูงเพิ่มขึ้น ซึ่ง BAP แต่ลักษณะการเจริญอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้ BAP ระดับต่างๆ เหมือนกับผลการทดลองกับกฤษณา (*Aquiliaria erassna, Aquiliaria malaccensis*) เมื่อใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.2 และ 0.5 มก/ล) สามารถเพิ่มจำนวนยอด และให้ยอดที่มีความยาวมากกว่า BA ที่ระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งจากการทดลองของ Edriss and Burger (1984) พบว่าการใช้ BAP ปริมาณมากจะยับยั้งการเจริญของตาและทำให้ยอดที่ได้มีขนาดสั้น แต่จากการศึกษาในส้ม Shamouti พบว่าการเติม BA ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต (Altman and Goren, 1974) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 2.1 การที่ BAP ไม่แสดงผลต่อการเจริญของน้อยหน่าอย่างเห็นได้ชัด เมื่อใช้ร่วมกับ IBA น่าจะเป็นเพราะยอดที่นำมาทดลองเคยเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP สูงอยู่แล้วถึง 2 ช่วงเวลาการตัด (subculture) จึงมีผลต่อการสะสมไว้ในเนื้อเยื่อ แต่ IBA ระดับที่ใช้ร่วมกันก็ไม่สามารถหักล้างผลนั้นได้ ซึ่งผลการทดลอง 2.2 ซึ่งใช้ kinetin ที่เป็น weaker cytokinin ช่วยลดบทบาทของ BAP ลงได้

นอกจากฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของยอดแล้ว ส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหาร มีส่วนสามารถส่งเสริมให้ยอดมีการเจริญเติบโตดีขึ้น จากการทดลองที่ 3.1 เป็นการศึกษาถึงผลของน้ำมะพร้าวที่มีต่อการเจริญของยอด น้ำมะพร้าวมีสารต่างๆ ที่ช่วยการเจริญเติบโตเช่น วิตามิน กรดอะมิโน และน้ำตาล ซึ่งสามารถแบ่งส่วนประกอบสำคัญได้ 3 ส่วน (Pollard *et al*, 1961) คือ nitrogenous fraction ซึ่งประกอบด้วยสาร reduced nitrogenous compound หลายชนิดในรูป amino acid และ amide ซึ่งส่วนนี้ใช้แทนได้โดยการเติม casein hydrolysate, amino acid, urea หรือ

ammonia ส่วนนี้ช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อมากกว่าสารประกอบ nitrate อย่างเดียว ส่วนที่สองเป็น neutral fraction เป็นสารพวก nonionic หรือ weakly ionic ประกอบด้วย carbohydrate ชนิดต่างๆ ที่มีส่วนประกอบของ myo – inositol, scullo – inositol และ sorbitol ส่วนประกอบส่วนที่สองนี้ไม่ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช แต่จะให้ผลช่วยการเจริญเติบโตมากเมื่อใช้ร่วมกับส่วนประกอบส่วนที่สาม ส่วนที่สองนี้ช่วยให้เซลล์พืชมีปฏิกิริยาต่อสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดอื่น ส่วนที่สามเป็น active fraction ประกอบด้วยสารที่ช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์ โดยแสดงผลร่วมกับส่วนที่สอง ส่วนประกอบส่วนนี้มี diphenyl urea รวมอยู่ด้วย ซึ่ง diphenyl urea นี้ แสดงผลเช่นเดียวกับ cytokinin N^6 adenin derivatives (Shantz and Steward, 1959) ซึ่งส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีมาก เป็นที่เข้าใจว่า diphenyl urea คงเป็น side chain doner ทำปฏิกิริยากับ adenine แล้วเกิดเป็นไซโตไคนินได้รายงานว่า cytokinin activity ในน้ำมะพร้าวนั้นน่าจะเป็นผลของ zeatin ประเภท ribonucleoside ดังนั้นน้ำมะพร้าวจึงมีสภาพเป็นปัจจัยซึ่งมีผลกับ metabolism ในพืช ที่แสดงให้เกิดผลทางสรีระวิทยาของไซโตไคนินซึ่งช่วยในด้านการเจริญเติบโตของพืช การแบ่งเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ ตลอดจนการออกดอกออกผล แต่ในการทดลองนี้พบว่าน้ำมะพร้าวไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นจำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น พบว่าน้ำมะพร้าว 30 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดใบมากที่สุดคือ 7.6 ใบ/ต้น ซึ่งปริมาณน้ำมะพร้าวมากหรือน้อยกว่านี้จะให้จำนวนใบลดลงจากการทดลองในส้มโอพบว่า น้ำมะพร้าวเป็นสารที่จำเป็นต่อการเกิดตาและพัฒนาเป็นยอด แต่น้ำมะพร้าวทำให้ใบของยอดใหม่ที่ได้เรียวเล็กแทบมองไม่เห็นแผ่นใบ ที่ระดับน้ำตาลเท่ากันแต่เมื่อเพิ่มน้ำมะพร้าวมากขึ้น มีผลทำให้ความยาวยอดใหม่ และความยาวใบเพิ่มขึ้น (สุรีย์พร, 2534) สอดคล้องกับการทดลองของ Kochba *et al.* (1973) โดยเฉพาะอย่างยิ่งความกว้างใบ ซึ่งจะแผ่ขยายแผ่นใบอย่างชัดเจน ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในน้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ซับซ้อนที่ทำหน้าที่คล้ายอ๊อกซิน และจิบเบอเรลลินอยู่ด้วย (Dix and Van Staden, 1982) จากการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าที่ระดับน้ำมะพร้าวต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบน้อยกว่า อาจเป็นผลมาจากปริมาณไซโตไคนินในน้ำมะพร้าว เพราะจากการทดลองของ Edriss และ Burger (1984) พบว่า การใช้ไซโตไคนินปริมาณมากจะยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด แสดงว่าเมื่อใช้ปริมาณน้ำมะพร้าวมากขึ้นไซโตไคนินในนั้นจะมากขึ้นด้วย จึงไปยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด เช่นเดียวกันที่ระดับน้ำมะพร้าวสูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ยอดที่มีการเจริญน้อยกว่าที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ไซโตไคนินที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าวมีปริมาณมากกว่าที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ยอดมีการเจริญเติบโต นอกจากนั้นปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวยังมีผลต่อการเจริญของยอดด้วย น้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอน และเป็นตัวปรับแรงดันออสโมติกในอาหาร ซึ่งทำให้พืชเจริญได้เป็นปรกติ แต่ถ้ามีปริมาณน้ำตาลมากเกินไปทำให้ยอดผิดปรกติ และตายได้ ซึ่งจากการทดลองนี้เมื่อใช้น้ำมะพร้าว 30 เปอร์เซ็นต์ อาจมีระดับน้ำตาลเมื่อ

รวมกับความเข้มข้นที่มีอยู่ในอาหารจึงส่งเสริมการเจริญในแง่การเพิ่มจำนวนใบขึ้น แต่ก็ไม่สูงเกินไปจนเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง จึงเหมาะสมที่จะทำให้ยอดเจริญได้ปรกติ

นอกจากน้ำมะพร้าวแล้วยังใช้ L – Glutamine ในการทดลองเพื่อช่วยในการเพิ่มการเจริญของยอดอ่อน ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า L - Glutamine 50 มก/ล มีผลทำให้ยอดมีความสูงมากที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับที่ 0 มก/ล แต่เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของความสูงยอดเฉลี่ยของกรรมวิธีอื่น พบว่าค่าเฉลี่ยไม่อยู่ในทิศทางเดียวกัน เช่นค่าเฉลี่ยของยอดเมื่อใช้ L - Glutamine 25 มก/ล จะต่ำกว่าที่ 0 และ 50 มก/ล อาจเนื่องยอดที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนพืชหนึ่งชิ้นไม่สม่ำเสมอ แม้ว่าขนาดยอดที่เลือกมาใช้ทดลองจะมีขนาดเดียวกันแต่อาจแตกต่างกันในเรื่องอายุจึงทำให้ผลแสดงออกมาดังกล่าวแล้ว แต่จากการทดลองนี้อาจจะมีแนวโน้มว่าการใช้ L - Glutamine มากกว่า 100 มก/ล จะทำให้ความสูงของยอดอ่อนลดลง ซึ่งการใช้ L - Glutamine 0 - 50 มก/ล อาจจะมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือให้ยอดที่มีความสูงมากที่สุด แต่การไม่ใส่ L - Glutamine เลยจะดีที่สุดเนื่องจากเป็นการประหยัดสารในเมื่อกรรมวิธีที่ไม่ใส่ L - Glutamine มีแนวโน้มไม่ต่างกับการใส่ L - Glutamine ที่ 25 และ 50 มก/ล ส่วนขนาดใบเฉลี่ยทางด้านความยาวของใบ ใบจะมีความยาวมากที่สุดเมื่อใช้ L - Glutamine 150 และ 50 มก/ล ในขณะที่ L - Glutamine 100 มก/ล จะทำให้ความยาวใบเฉลี่ยลดลง ซึ่งอาจมีเหตุผลเช่นเดียวกับผลทางด้านความสูงของต้น ซึ่งเป็นสาเหตุจากความไม่สม่ำเสมอของของอายุต้น แต่ความกว้างใบเฉลี่ยไม่แสดงผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งต่างจากการใช้กรออะมิโนชนิดอื่นเช่น arginine และ glutamine มีผลทำให้ใบของพืชมีขนาดใหญ่ขึ้นมากกว่าจะมีผลต่อการยืดของลำต้นหรือกิ่งก้าน (Harada and Ohta, 1996)

ส่วนประกอบของอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักคือ ชนิดของธาตุอาหารหลักและปริมาณของน้ำตาล ซึ่งจากการทดลองที่ 3.3 จะเห็นว่าชนิดของธาตุอาหารหลัก และความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลร่วมกันต่อการเจริญของยอด เมื่อใช้ธาตุอาหารหลักสูตร VW ร่วมกับน้ำตาล 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ยอดมีการเจริญมากที่สุด แต่สูตรอาหารและน้ำตาลไม่มีผลทำให้จำนวนใบเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่การใช้อาหารสูตร VW ร่วมกับน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญในทุกด้าน ทั้งความสูงต้นเฉลี่ย ความยาวข้อ และขนาดใบเฉลี่ยมากที่สุด ถ้าใช้อาหารสูตร VW ร่วมกันน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์จะทำให้ได้เพียงความสูงต้น และขนาดของใบเท่านั้นที่มากที่สุด แต่ความยาวข้อเฉลี่ยลดลง จากผลการทดลองพบว่าความสูงต้น และขนาดใบเฉลี่ยเมื่อใช้อาหารสูตร VW ร่วมกับน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดน้อยกว่าเมื่อใช้น้ำตาล 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากยอดที่เลี้ยงแม้ว่ามีขนาดใกล้เคียงกันแต่อายุอาจต่างกัน ดังนั้นค่าเฉลี่ยที่ได้จึงมีความแปรปรวนมาก จากการศึกษาผลของปัจจัยหลักแต่ละชนิดเมื่อพิจารณาถึงธาตุอาหารหลักแต่ละสูตรโดยพิจารณาปริมาณอิออนที่สำคัญของธาตุอาหารดังแสดงในตาราง 34 จะเห็นว่าอาหารสูตร VW เป็นอาหารที่ทำให้ยอดมีการเจริญมากที่สุดในทุกลักษณะ เนื่องจากธาตุอาหารหลักสูตร VW มีปริมาณของอิออน Nitrate

น้อยกว่าในอาหารสูตร SH และ ½SH แต่ปริมาณ Ammonium มากกว่าในสูตรอาหารทั้งสอง ทำให้อัตราส่วนของ Nitrate และ Ammonium น้อยกว่าสูตร SH และ ½SH มาก แสดงว่า การที่ยอดมีการเจริญของข้อและใบในอาหารสูตร VW ได้ดีกว่าอาหารสูตร SH และ ½SH นอกจากเป็นสาเหตุเนื่องจากในอาหารสูตร VW มีอัตราส่วนของ nitrate และ ammonium เหมาะสมกับการเจริญของยอดแล้ว ยังจะเป็นเพราะโปแตสเซียมในอาหารสูตร SH และ½SH สูงเกินไป

ตารางที่ 33 ปริมาณอิออน (มิลลิโมล) ชนิดต่างๆ ในธาตุอาหารหลักสูตร VW ดัดแปลง, SH และ ½ SH

อิออน	VW ดัดแปลง (มิลลิโมล)	SH (มิลลิโมล)	½ SH (มิลลิโมล)
Nitrate	6.47	24.73	12.37
Ammonium	7.56	2.61	1.31
$NO^-_3 : NH^+_4$	0.86	9.48	4.74
Total Nitrogen	14.03	27.34	13.67
Phosphate	1.84	2.61	1.31
Magnesium	1.01	1.62	0.81
Calcium	0.64	2.14	1.07
Potassium	7.03	24.73	12.37

นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบอื่นที่ประกอบในอาหาร เช่น น้ำตาล เมื่อพิจารณาเพียงอย่างเดียว จะเห็นว่าน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของยอด โดยยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ยอดมีการเจริญได้ดีกว่าน้ำตาล 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยที่น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ยอดมีความสูงเฉลี่ย ขนาดใบเฉลี่ยมากที่สุด ส่วนความยาวข้อเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ย ไม่มีผลตอบสนองต่อปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการทดลองของ Navarro *et al.* (1975) ที่พบว่าเมื่อมีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ขนาดของใบกล้วยกว้างยิ่งขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่ใช้อาจสูงถึงร้อยละ 10 ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็น และช่วยให้การเจริญเติบโตของพืชมีเมตาบอลิสมต่างๆ เกิดขึ้นได้ตามปรกติ แต่ถ้าปริมาณน้ำตาลที่มากเกินไปจะทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลาต่อมา ทั้งนี้เนื่องมาจากระดับน้ำตาลที่สูงขึ้นมีผลให้ค่าแรงดันออสโมติค (osmotic pressure) ในอาหารสูงขึ้น ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชมีลักษณะ

ฉ่ำน้ำ และใส นอกจากนี้ยังพบว่าระดับน้ำตาลที่สูงขึ้นมีผลยับยั้งการทำงานของสารกลุ่มไซโตไคนินด้วย

3. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

3.1 การกำเนิดและพัฒนาของยอด

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่แสดงจุดกำเนิดยอดพบว่า การเกิดยอดเกิดกันได้โดยตรงจากเนื้อเยื่อโดยไม่ผ่านแคลลัส โดยมีจุดเริ่มต้นที่ subepidermis ในวันที่ 2 หลังจากเริ่มเลี้ยงบนอาหาร การแบ่งเซลล์เกิดต่อมาที่เซลล์ชั้น epidermis และเซลล์ชั้น cortex 3 – 4 ชั้น ทำให้สังเกตเห็นกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญได้โดยใช้เวลาเพียง 6 วัน และใบอ่อนมาก (leaf primordia) ปรากฏในวันที่ 10 ต่อมา โครงสร้างของยอดเกิดให้เห็นในวันที่ 11 การเกิดตายอดจาก TCLs ที่เกิดขึ้นเร็วมาก และเกิดยอดหลายยอดต่อชิ้นส่วนที่เลี้ยง อีกทั้งสามารถเกิดได้ในการเลี้ยงครั้งแรกเลยจึงเหมาะสำหรับใช้ TCLs ในการปรับปรุงพันธุ์พืช และการขยายพันธุ์

3.2 ใบฉ่ำน้ำ

จากรูปที่ได้จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาจากใบของต้นกล้าน้อยหน่าที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เพราะความผิดปรกติส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ใบ (Ziv, 1986; Gasper *et al.*, 1987) พบว่าใบที่เกิดอาการฉ่ำน้ำ จะมีลักษณะของชั้น epidermis ไม่สม่ำเสมอ เช่นเดียวกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเกี่ยวกับโครงสร้างใบของปอสา พบว่าใบที่ฉ่ำน้ำจะมีเซลล์ epidermis ที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ ซึ่งการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบของ epidermis เกิดจากการที่เซลล์ภายในมีการเรียงตัวกันไม่เป็นระเบียบ โดยเฉพาะชั้น parisade การเรียงตัวจะไม่ชัดเจนเป็นปรกติ (รังสิมา, 2539) และเซลล์จะมีขนาดขยายใหญ่มากเมื่อเปรียบเทียบกับใบที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ นอกจากนั้นยังมีโครงสร้างอื่นๆ ของใบที่ฉ่ำน้ำที่ชี้ให้เห็นถึงความผิดปรกติ เช่น ท่อน้ำ ท่ออาหาร และ stomata ในใบที่ฉ่ำน้ำจะไม่สังเกตเห็น ท่อน้ำท่ออาหาร และ stomata เนื่องจาก stomata มีหน้าที่ในการคายน้ำ และเป็นที่ผ่านเข้าออกของก๊าซ เมื่อใบที่ไม่มี stomata จึงทำให้การคายน้ำไม่ปรกติ น้ำที่อยู่ภายในไม่สามารถระบายออกได้ จึงทำให้ใบมีอาการฉ่ำน้ำและใบใส และใบที่ฉ่ำน้ำที่สังเกตได้จะมี air space ขนาดเล็ก การฉ่ำน้ำนั้นเป็นความผิดปรกติทางสรีรวิทยาที่มีการสร้างลิกนินและคิวตินลดลง ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น เนื่องมาจากการแพร่กระจายของน้ำเข้าไปภายในเนื้อเยื่อเหล่านั้น (Gasper *et al.*, 1987) ซึ่งสาเหตุของอาการฉ่ำน้ำของการทดลองนี้ อาจเกิดจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพิ่มความเข้มข้นของ BAP ที่สูง จะกระตุ้นให้เกิดการฉ่ำน้ำมากขึ้น เนื่องจาก BAP ไปเร่งการแบ่งเซลล์ ทำให้การผลิตลิกนินไม่เพียงพอต่อปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Phan, 1991) และการเพิ่มขึ้นของก๊าซเอทธิลีนเป็นอีกสาเหตุหนึ่งในการเกิดการฉ่ำน้ำได้ ซึ่งการสะสมของปริมาณก๊าซเอทธิลีนจะไปกระตุ้น peroxidase ให้ไปมีผลกับกิจกรรมของ phenylalanine ammonia lyase และกิจกรรมของสารฟีนอล ซึ่งจะทำให้การสะสมของลิกนินน้อยลง และสูญเสียความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ นอกจากนั้น

ยังมีสาเหตุอื่นๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ว่า เป็นสาเหตุของอาการฉ่ำน้ำ ได้แก่ ความชื้นสูง ปริมาณของธาตุอาหาร คาร์โบไฮเดรตที่มากเกินไป ปริมาณวุ้นที่น้อยเกินไป ความเข้มแสงต่ำ (Ziv, 1986; Gasper *et al.*, 1987) และอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป (กาญจนา, 2531)

3.3 การเกิดใบที่มีปุ่มปม

เมื่อนำใบที่มีปุ่มปมหงิกงอไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าปุ่มปมที่เกิดขึ้นเกิดจากการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis ที่ผิดปรกติ โดยเซลล์ชั้นนี้จะเกิดการโป่งพองออกไปเพียงชั้นเดียว ซึ่งปุ่มที่สังเกตเห็นเป็นการโป่งพองของเซลล์ชั้น epidermis นอกจากนี้ปุ่มที่เกิดขึ้นบางตำแหน่งเป็นกลุ่มของเซลล์ parenchyma ในลักษณะของแคลลัสโดยไม่มีจุดเจริญหรือมีการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งใบที่เกิดปุ่มปมจะมีอาการหงิกงอ ใบแข็ง บางส่วนมีอาการของการฉ่ำน้ำร่วมด้วย เช่น หงิกงอ ใบแข็ง และใบใส ใบในลักษณะนี้จะมีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่กางเต็มที่เหมือนใบปรกติ ลักษณะปุ่มปมที่เห็นไม่ใช่ลักษณะแคลลัสปรกติ อาจไม่ใช้จุดเริ่มต้นของการเกิดอวัยวะโดยผ่านขบวนการใดขนวนการหนึ่ง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University