

วิจารณ์

1. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บชิ้นส่วนข้อมาฟอกมาเชื้อ

การฟอกมาเชื้อชิ้นส่วนของกล้วยไ้พอน กล้วยหมู้ง และพิพนน้อย ในเบื้องต้นได้ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ และระยะเวลาในการฟอกมาเชื้อที่ทำให้ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง คือ ฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 นาน 10 นาที และฟอกซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10-15 นาที การฟอกมาเชื้อชิ้นส่วนของพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ การทำความสะอาดชิ้นส่วนก่อนที่จะนำมาฟอกมาเชื้อเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากกิ่งอ่อนจะมีขนอ่อนนุ่มปกคลุม บอบบาง ช้ำง่าย โดยเฉพาะกล้วยหมู้ง และพิพนน้อย วิธีทำความสะอาดที่เหมาะสม คือ การใช้ฟู่กันทำความสะอาดตามซอกตาเบา ๆ ด้วยความระมัดระวัง

การฟอกมาเชื้อชิ้นส่วนของกล้วยไ้พอน กล้วยหมู้ง และพิพนน้อยที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนของพืชทั้ง 3 ชนิดที่เก็บในฤดูร้อนมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุด และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด รองลงมาคือชิ้นส่วนข้อที่เก็บในฤดูหนาว และชิ้นส่วนข้อที่เก็บในฤดูฝนมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงสุด และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำสุด เช่นเดียวกับการศึกษาในส้มโอ (*Citrus maxima*) (สุริย์พร, 2534) และประยงค์ (*Aglaia odorata*) (วินิจ, 2546) ที่พบว่า การฟอกมาเชื้อชิ้นส่วนข้อที่เก็บในช่วงฤดูฝนมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ในส้มโอ และ 93.3 เปอร์เซ็นต์ในประยงค์ แต่ในช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาวเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนจะลดลงเหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ในส้มโอ และ 23.3-30 เปอร์เซ็นต์ในประยงค์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงขึ้น เนื่องจากประเทศไทยมีภูมิอากาศร้อนชื้น ซึ่งเหมาะกับการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้การนำชิ้นส่วนที่เก็บในฤดูฝนมาฟอกมาเชื้อ มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูง (สุพินญา, 2540; รังสฤษฎ์, 2541; วินิจ, 2546) ในขณะที่ในฤดูร้อนและหนาวอากาศแห้งเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าในฤดูฝนจึงมีการปนเปื้อนต่ำกว่า และพบว่าในฤดูร้อนยอดที่เก็บมาฟอกมาเชื้อเป็นยอดที่ผลิใหม่ แต่ยอดที่เก็บได้ในฤดูหนาวเป็นยอดที่เจริญผ่านช่วงฤดูฝนมาแล้ว จึงมีโอกาสมะสมเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่ายอดที่ผลิใหม่ในฤดูร้อน อีกทั้งบริเวณตายอด ดาข้าง และกิ่งอ่อนของพืชทั้ง 3 ชนิดในการศึกษาครั้งนี้มีขนปกคลุมจึงยากแก่การทำความสะอาดและทำให้ปลอดเชื้อ นอกจากนี้พืชวงศ์ Annonaceae ยังมีการปนเปื้อนอันเนื่องมาจาก

เชื้อจุลินทรีย์ภายในท่อลำเลียงเอง (George and Nissen, 1987; Rasai *et al.*, 1995 a; Castro *et al.*, 1999)

2. การศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในท่อลำเลียงของชิ้นส่วน

การปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในชิ้นส่วนพืช ซึ่งอาศัยอยู่ในท่อลำเลียง (endophytic microorganisms) สังเกตได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ไม่พบการปนเปื้อนไประยะหนึ่งแล้ว หรือในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ มักแสดงอาการบริเวณรอยตัดที่สัมผัสอาหาร (Collin and Edwards, 1998; Bridg, 2000) เช่นเดียวกับการศึกษาในทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) และน้อยหน่าออสเตรเลีย (*A. cherimola*) Bridg (2000) รายงานว่าจะพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทุกครั้งหลังการย้ายชิ้นส่วนลงสู่อาหารใหม่ประมาณ 3 สัปดาห์ และจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกล้วยไต้หวัน กล้วยหมื่น และพิพวนน้อย ทุกครั้งที่มีการตัดแต่งและย้ายลงสู่อาหารใหม่ ชิ้นส่วนมักจะมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอยตัดที่สัมผัสอาหาร การลดปัญหาที่เกิดขึ้นทำได้โดยการใชยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับชนิด ความเข้มข้น ระยะเวลาในการใช้ วิธีการใช้ และความจำเพาะในการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ (Talaro and Talaro, 1993; Wiedemann and Grimm, 1996; Bridg, 2000; Farooq, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบการใช้และไม่ใชยาปฏิชีวนะชนิด streptomycin, penocep (มีส่วนประกอบของ penicillin และ streptomycin), tetracycline และ rifampicin โดยวิธีการแช่ชิ้นส่วนข้อในสารละลายยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่า rifampicin หรือ rifampin สามารถลดการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด ซึ่งยาปฏิชีวนะชนิดนี้ตามฤทธิ์การทำลายจัดอยู่ในกลุ่มที่มีผลขัดขวางการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (บัญญัติ, 2534; Volk, 1992) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA dependent RNA polymerase ซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียทั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Volk, 1992; Talaro and Talaro, 1993) การทดสอบการละลาย rifampicin ทับบนอาหารกึ่งแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพลดการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ภายในท่อลำเลียงได้มากกว่าการใช้ rifampicin ร่วมกับการฟอกฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว คล้ายคลึงกับการทดลองของ Bridg (2000) ที่เปรียบเทียบยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ nystatin cefotaxime และ rifampicin ในการลดปัญหาการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในชิ้นส่วนข้อของทุเรียนเทศ และน้อยหน่าออสเตรเลีย พบว่า rifampicin ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด โดยวิธีการเททับบนอาหารกึ่งแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยง

หรือการผสมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายในท่อลำเลียงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการใช้ rifampicin ร่วมกับการฟอกฆ่าเชื้อซึ่งลดการปนเปื้อนได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ nystatin และ cefotaxime สามารถลดการปนเปื้อนได้เพียง 25-50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเททับบนอาหารกึ่งแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงหรือผสมลงในอาหาร แต่ไม่สามารถลดการปนเปื้อนได้เมื่อใช้ร่วมกับการฟอกฆ่าเชื้อ และจากการตรวจสอบพบว่าการปนเปื้อนเกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas* spp. และ *P. saccharophila* ในส่วนของ Farooq (2002) ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะกลุ่มที่ทำลายเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ tetracycline rifampicin และ polymyxin B และกลุ่มที่ทำลายเชื้อรา ได้แก่ bavistin ความเข้มข้น 50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้ร่วมกับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของน้อยหน่า (*Annona squamosa*) พบว่า rifampicin ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพลดการปนเปื้อนได้สูงสุด 50.66 และ 52.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้งาน คือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นสูง (200 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะเป็นพิษต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ Philips *et al.* (1981); Pollock *et al.* (1983) ยังพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงคือชะลอและลดการสร้างยอดใหม่ของชิ้นส่วนพืช

3. การศึกษาผลของ BA ร่วมกับ AgNO_3 ในการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอด และการป้องกันการหลุดร่วงของใบ

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของกล้วยไต้หวัน กล้วยหมูสัง และพีชน้อย พบว่า ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีการหลุดร่วงของใบมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม AgNO_3 และการหลุดร่วงของใบลดลงอย่างมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม AgNO_3 การหลุดร่วงของใบนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอธิลีน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผลชักนำหรือกระตุ้นให้เกิดการแก่ชราและการหลุดร่วงของส่วนต่างๆ (Reid, 1995) การแก้ปัญหาคือการหลุดร่วงของใบทำได้โดยใช้สารที่มีสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์เอธิลีน สารกลุ่มที่ช่วยดูดซับเอธิลีน หรือการใช้สารที่มีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอธิลีน (Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994; Lemos and Black, 1994; 1996 a) ในการทดลองครั้งนี้ใช้ AgNO_3 ความเข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าสามารถลดการหลุดร่วงของใบในพืชทั้ง 3 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงน้อยหน่า (Lemos and Black, 1994; 1996 a) และฝ้าย (*Gossypium herbaceum*) (Bayer, 1976) ที่รายงานว่า Ag^+ เป็น strong inhibitor ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของเอธิลีน มีผลลดการหลุดร่วงของใบ

การศึกษาผลของ BA ร่วมกับการเติมและไม่เติม AgNO_3 ในการชักนำให้ขึ้นส่วนของกล้วยไ้พอน และกล้วยหุ้มสังเกิดยอด พบว่า การเติม AgNO_3 ในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0-20 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณยอดของกล้วยไ้พอนและกล้วยหุ้มสัง และความยาวยอดของกล้วยไ้พอน แต่มีผลต่อความยาวยอดของกล้วยหุ้มสัง การเติม AgNO_3 ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไ้พอน แม้ว่าจะไม่มีผลให้ยอดใหม่มีความยาวเพิ่มขึ้น แต่ทำให้ยอดที่เกิดใหม่สามารถพัฒนาได้อย่างปกติ แตกต่างจากยอดที่ไม่ได้รับ AgNO_3 อย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยง *Passiflora edulis* พบว่าการเติมและไม่เติม AgNO_3 ความเข้มข้น 23.5 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณยอด แต่การเติม AgNO_3 ทำให้ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะแข็งแรงกว่า (Trevisan *et al.*, 2005)

ส่วนการเพาะเลี้ยงกล้วยหุ้มสัง พบว่า เมื่อไม่เติม AgNO_3 ยอดที่ได้จะสั้น ยอดมีลักษณะการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ใบมีสีค่อนข้างเหลือง แต่ยอดที่ได้รับ AgNO_3 มีความยาวมากกว่า ยอดใหม่มีการพัฒนาได้ คล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยง mini-roses ที่พบว่า เมื่อปริมาณ mercuric perchlorate ($\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$) ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติดูดซับเอธิลีนในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจะทำให้ยอดมีความยาวเพิ่มขึ้น แสดงว่าเอธิลีนในภาชนะเพาะเลี้ยงมีผลยับยั้งการเติบโตของยอด (Kevers *et al.*, 1992) และในการเพิ่มปริมาณยอดของเลมอน (*Citrus limon*) Kotsias and Roussos (2001) พบว่า การเพาะเลี้ยงขึ้นส่วนของอาหารสูตร Driver-Kuniyuki ที่เติม BA ความเข้มข้น 13.2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 17.64 ไมโครโมลาร์ ทำให้ยอดใหม่มีความยาวมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 13.2 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.29 ไมโครโมลาร์ พืชต่างชนิดกันมีการตอบสนองต่อ AgNO_3 แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วผลของเอธิลีนมักเป็นไปในทางยับยั้ง ดังนั้นการใช้สารยับยั้งเอธิลีนมักจะมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน (morphogenesis) ในพืช เช่น การเติม AgNO_3 ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอธิลีนสามารถกระตุ้นการชักนำยอดจากแคลลัสของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) ให้เกิดเพิ่มขึ้นได้ (Purnhauser *et al.*, 1987) และกระตุ้นการเพิ่มปริมาณยอดจากข้อใบเลี้ยง และส่วนใต้ใบเลี้ยงของแตงกวา (*Cucumis sativus*) บางสายพันธุ์ (Mohiuddin *et al.*, 1997) และการเติม silver thiosulphate (STS) ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอธิลีนในอาหารเพาะเลี้ยงต้นกล้วยฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) พบว่าสามารถชักนำให้ขนาดของแผ่นใบ การเติบโตของยอด และรากเพิ่มขึ้น เป็นต้น (Mollers *et al.*, 1992) แต่ในบางพืช เช่น มังคุด (*Garcinia mangostana*) พบว่า การเติม AgNO_3 และ L- α -2-aminoethoxyvinylglycine (AVG) จะมีผลชะลอการเกิดยอดและ

การพัฒนาของแคลลัสจากแผ่นใบ (Goh *et al.*, 1997) และในเลมอน Kotsias and Roussos (2001) พบว่าการเติม AgNO_3 จะส่งผลยับยั้งการเกิดยอดใหม่

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของกล้วยไ้พอนและกล้วยหมูสังบนอาหารที่เติม BA พบว่า มีการเพิ่มปริมาณยอดได้บนอาหารที่เติม BA ทุกระดับความเข้มข้น (5-20 ไมโครโมลาร์) เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินมีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) โดยส่งเสริมการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ จึงมีผลกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณยอดได้ (Lyndon, 1990; Taiz and Zeiger, 2002) BA เป็นไซโตไคนินที่ให้ผลในการชักนำยอดได้ดีที่สุด ดังจะเห็นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงในพืชหลายชนิด รวมทั้งในการชักนำยอดจากชิ้นส่วนของพืชวงศ์ Annonaceae ด้วย ความเข้มข้นที่ให้ผลในการตอบสนองดีจะอยู่ในช่วงประมาณ 2.22-17.6 ไมโครโมลาร์ (0.5-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) (George and Nissen, 1987; Tazzari, 1990, Bejoy and Hariharan, 1992; Encina *et al.*, 1994; Rasai *et al.*, 1994; Lemos and Black, 1996 b, 1996 c; Bridg, 2000; Farooq *et al.*, 2002; Zobayed *et al.*, 2002; Padilla and Encina, 2004) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดและตำแหน่งของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง ปริมาณ exogenous hormone และปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า BA ความเข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ และ 15 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณยอดกล้วยไ้พอนและกล้วยหมูได้ดีสูงสุด ตามลำดับ ความเข้มข้นของไซโตไคนินที่สูงกว่านี้ ทำให้จำนวนยอดใหม่ของกล้วยไ้พอนและกล้วยหมูลดลง สอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณยอดในพืชหลายชนิด เช่น มะตูม (*Aegle marmelos*) (สุพินญา, 2540) ประยงค์ (วินิจ, 2546) น้อยหน่า (Nagori and Purohit, 2004) และ มัลเบอรี่ (*Morus spp.*) (Chitra and Padmaja, 2005) เป็นต้น เนื่องจากในชิ้นส่วนพืชเดิมก็มีไซโตไคนินอยู่ การเติมเพิ่มจากภายนอกเข้าไปจนมีปริมาณไซโตไคนินสูงเกินไปจะไปมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิดมากเกินไปจนเกิดอันตรายต่อชิ้นส่วนพืช ส่งผลให้จำนวนยอดและความยาวยอดลดลง (Moore, 1989; Mok and Mok, 1994)

สำหรับความยาวยอดของกล้วยไ้พอน พบว่า การเติม BA ทุกระดับความเข้มข้น (5-20 ไมโครโมลาร์) มีผลยับยั้งความยาวยอด ผลการทดลองนี้คล้ายกับการทดลองของสุภาวดี (2540) ที่พบว่าการเพิ่มปริมาณยอดลำควน (*Melodorum fruticosum*) จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0-17.6 ไมโครโมลาร์ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.1 ไมโครโมลาร์ ยอดมีความยาวสูงสุด และเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้นมากกว่าระดับนี้ ความยาวยอดจะลดลง และการทดลองของ Nagori and Purohit (2004) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนไฮโปคอติลของน้อยหน่าบน

อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0-44 ไมโครโมลาร์ พบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 8.8 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งความยาวยอด แต่สำหรับกล้วยหมูสัง พบว่า BA ไม่มีผลต่อความยาวยอด แสดงให้เห็นว่าพืชต่างชนิดกันมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

ในพีพวนน้อย พบว่าการเติม AgNO_3 ความเข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ มีผลป้องกันการหลุดร่วงของใบได้ ในการเพิ่มปริมาณยอดพีพวนน้อย เมื่อเพาะเลี้ยงยอดที่ได้ต่อไปอีกระยะหนึ่ง ยอดมักเปลี่ยนเป็นสีดำ น่าจะเป็นผลจากสารกลุ่ม phenolic compounds และ tannin ซึ่งสารกลุ่มนี้จะส่งผลกระทบต่อและเป็นสาเหตุให้เกิดสีน้ำตาลและดำของชิ้นส่วนในระหว่างการพัฒนาเลี้ยง ซึ่งพืชในวงศ์นี้มีคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิด phenolic compounds (hypersensitivity) (Martinez-Cayuela *et al.*, 1988; Bridg, 2000) แม้ว่าในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื่อจะมีการแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว แต่ก็เพียงลดปัญหาได้ในระยะหนึ่ง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกล้วยไอ้พอน กล้วยหมูสัง และพีพวนน้อย พบว่า ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีความยาวสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมไซโตไคนิน (BA หรือ TDZ) และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความสูงของยอดมีแนวโน้มลดลง อาจเป็นผลเนื่องจากออกซินที่สร้างขึ้นจากปลายยอดใหม่ มีผลกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ ทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้รับ BA หรือ TDZ มีการเติบโตยืดยาวขึ้นได้ (พีรเดช, 2529) และเมื่อไม่มีบทบาทของไซโตไคนินมาขัดขวาง ออกซินจึงแสดงบทบาทได้เต็มที่ ทำให้ยอดยืดยาวมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไซโตไคนิน (Pierik, 1998; Lyndon, 1990) เช่นเดียวกับการทดลองเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนตาข้างของต้นมะตูม (สุพินญา, 2540) โมกซ้อน (*Wrightia religiosa*) (สุธี, 2541) ชมพู่มะเหมี่ยว (*Eugenia malaccensis*) และตะลิงปลิง (*Averrhoa bilimbi*) (พัชรารัตน์, 2542) เป็นต้น

4. การศึกษาผลของ GA_3 ต่อการยืดยาวของยอด

ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไอ้พอนบนอาหารที่เติม BA จะเห็นได้ว่ายอดที่ได้ค่อนข้างสั้นและมีจำนวนข้อของยอดหลักน้อย จึงศึกษาผลของ GA_3 ต่อการยืดยาวของยอด โดยเฉพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 ไมโครโมลาร์ พบว่า การเติม GA_3 ทำให้ยอดใหม่มีความยาวเพิ่มขึ้น โดย GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ยอดมีความยาวสูงสุด 1.37 เซนติเมตร เนื่องจาก GA_3 มีผลกระตุ้นการยืดยาวของเซลล์

โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณลำต้นที่ต่ำจากปลายยอดลงมา (Taiz and Zeiger, 2002) ในงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการใช้ GA_3 กระตุ้นให้เกิดการยืดยาวของยอดพืชหลายชนิด เช่น *Gardenia jasminoides* (Economou and Spanoudaki, 1986) *Citrus sinensis* (Maggon and Singh, 1995) *Achras sapota* (Purohit and Singhvi, 1998) หม่อน (*Morus indica*) (Chitra and Padmaja, 1999) เลมอน (Kotsias and Roussos, 2001) กุหลาบ (*Rosa hybrida*) (Singh and Syamal, 2001) และสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) (Chaturvedi *et al.*, 2004) ความเข้มข้นที่ให้ผลคืออยู่ในช่วงประมาณ 0.29-2.89 ไมโครโมลาร์ (0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตัวอย่างการทดลองในทุเรียนเทศ โดย Bridg (2000) ที่พบว่า GA_3 ความเข้มข้น 0.29-5.77 ไมโครโมลาร์ มีผลกระตุ้นให้ยอดมีการยืดยาวเพิ่มขึ้น และมีจำนวนข้อที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 1.44 ไมโครโมลาร์ ยอดใหม่มีความยาวสูงสุด

การเติม GA_3 นอกจากจะทำให้ความยาวยอดเพิ่มขึ้นแล้ว จำนวนข้อของยอดหลักที่มองเห็นด้วยตาเปล่าก็เพิ่มขึ้นด้วย การที่จำนวนข้อของยอดหลักเพิ่มขึ้นนี้เป็นผลทางอ้อมจากการเติม GA_3 คือเมื่อเติม GA_3 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้เกิดการยืดยาวของปล้อง ทำให้ข้อที่มีการสร้างขึ้นแล้วแต่ยังถูกใบที่ส่วนยอดห่อหุ้มอยู่เกิดการยืดยาวขึ้นจนทำให้สามารถมองเห็นได้ (Bajaj, 1991; Pierik, 1998; Bridg, 2000)

5. การศึกษาผลของ TDZ ในการชักนำให้ขึ้นส่วนข้อเกิดยอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของกล้วยไ้พอนบนอาหารที่เติม TDZ พบว่า มีการเพิ่มปริมาณยอดได้บนอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 5-20 ไมโครโมลาร์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด เนื่องจาก TDZ จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินเช่นเดียวกับ BA จึงมีผลกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดได้เช่นเดียวกัน (Lyndon, 1990; Mok and Mok, 1994; Taiz and Zeiger, 2002) TDZ เป็นไซโตไคนินสังเคราะห์ที่มีความไวสูง ให้ผลในการชักนำยอดในพืชหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ (Malik and Sexena, 1992; Murthy *et al.*, 1998; Khawar *et al.*, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชพวกไม้เนื้อแข็ง (woody plant) (Huetteman and Preece, 1993) มีผลทำให้เกิดการ reprogram ของเซลล์เพื่อเข้าสู่ development pathway ใหม่ ส่งเสริมการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด แต่มีผลจำกัดในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด (Malik and Sexena, 1992; Murthy *et al.*, 1998; Shan *et al.*, 2000)

ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไ้พอน ยอดใหม่ที่ได้จากการชักนำด้วย BA จะค่อนข้างสั้น ซึ่งในบางพืช เช่น เลนทิล (*Lens culinaris*) (Hoque *et al.*, 2004) และแอปเปิ้ล (*Malus domestica*) (Fasolo *et al.*, 1989) การชักนำยอดด้วย BA เพียงอย่างเดียว ยอดที่ได้มักมีลักษณะเตี้ย เกิดเป็นกระจุก อาจแก้ไขได้โดยนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่เติม GA_3 เพื่อให้ยอดยืดยาวขึ้น หรือการชักนำยอดโดยใช้ BA ร่วมกับไซโตไคนินชนิดอื่น เช่น kinetin หรือร่วมกับออกซิน หรือ GA_3 ยอดที่ได้จะมีความยาวเพิ่มขึ้น การชักนำยอดกล้วยไ้พอนด้วย TDZ ยอดใหม่ที่ได้จะมีความสูงและจำนวนข้อของยอดหลักมากกว่ายอดที่ชักนำด้วย BA ในการทดลองของ Malik and Saxena (1992); Hoque *et al.* (2004) พบว่า TDZ มีผลช่วยกระตุ้นการเกิดยอดใหม่และส่งเสริมการยืดยาวของยอดเลนทิลได้ โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้เกิดยอดจำนวนสูงสุด ในการเพิ่มปริมาณยอดกล้วยไ้พอน พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ TDZ สูงถึง 20 ไมโครโมลาร์ ความยาวยอดจะลดลง คล้ายคลึงกับการเพิ่มปริมาณยอดจากเอมบริโอของเลนทิล ที่ Malik and Saxena (1992) พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ TDZ สูงถึง 50 ไมโครโมลาร์ ก็จะส่งผลยับยั้งความยาวยอด และยอดที่ได้จะมีลักษณะผิดปกติ แต่ในบางพืชพบว่าการใช้ TDZ ในการเพิ่มปริมาณยอดมีผลยับยั้งความยาวยอด เช่น มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (Bhagawat *et al.*, 1996) *Albizia julibrissin* (Sankhla *et al.*, 1996) และ *Vaccinium vitis-idaea* (Debnath, 2005) แสดงให้เห็นว่าผลของไซโตไคนินในการชักนำยอดมีความแตกต่างกันขึ้นกับ ชนิด และความเข้มข้นของสาร และชนิดพืช เป็นต้น (Pierik, 1998)

ในการชักนำให้ขึ้นส่วนของกล้วยไ้พอนเกิดยอดด้วย TDZ จะสังเกตเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ปลายใบของยอดใหม่มักมีสีดำและอาจเกิดการหลุดร่วงที่ไม่ได้เกิดจากการแก่ชราเนื่องจากโคนใบส่วนที่เหลือยังคงมีสีเขียว ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องจาก TDZ เพราะมีรายงานว่าสารในกลุ่ม phenylurea มีผลกระตุ้นให้เกิดการหลุดร่วงของใบได้เช่นเดียวกับ calcium cyanamide, sodium chlorate และ ethephon (Arteca, 1996; Taiz and Zeiger, 2002) แม้ว่าสารในกลุ่ม phenylurea จะมีโครงสร้างบางส่วนที่แสดงฤทธิ์ของไซโตไคนิน แต่การมีโครงสร้างหลักเป็น phenylurea แตกต่างกับไซโตไคนินทั่วไปที่เป็น adenine รวมถึงการมี free base ในโครงสร้างที่ต่างกันไซโตไคนินแต่ละชนิด ทำให้มีสมบัติบางประการแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้ขึ้นกับความสามารถในการตอบสนอง และการมี cytokinin receptor ที่เหมาะสมในแต่ละพืช (Mok and Mok, 1994; Taiz and Zeiger, 2002)

6. การศึกษาผลของ IBA และ NAA ในการชักนำให้ยอดเกิดราก

ในการชักนำให้ยอดกล้วยไ้พอนและกล้วยหมุ้งเกิดรากด้วยวิธีการต่าง ๆ ในสภาพปลอดเชื้อที่ดัดแปลงตามวิธีของ Encina *et al.* (1994); Lemos and Black (1996 c); Farooq *et al.* (2002); Nagori and Purohit (2004); Padilla and Encina (2004) ซึ่งชักนำรากพืชในวงศ์ Annonaceae ได้แก่ น้อยหน่า น้อยหน่าออสเตรเลีย และทุเรียนเทศได้เป็นผลสำเร็จ พบว่าไม่สามารถชักนำให้ยอดกล้วยไ้พอนและกล้วยหมุ้งเกิดรากได้ แม้ว่าจะจัดอยู่ในพืชวงศ์เดียวกัน อาจเนื่องมาจากพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการตอบสนองต่อการชักนำได้แตกต่างกัน เป็นผลจากลักษณะพันธุกรรมของพืชเอง มีรายงานว่าในสภาพเพาะเลี้ยง การชักนำให้พืชในวงศ์นี้เกิดรากทำได้ค่อนข้างยาก (George and Nissen, 1987; Rasai *et al.*, 1995 a; Farooq *et al.*, 2002; Padilla and Encina, 2004) เช่นเดียวกับพืชอีกหลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล (cv. Jonathan และ Delicious) (Sriskandarajah *et al.*, 1982) *Quercus robur* และ *Q. rubra* (Sanchez *et al.*, 1996) และกระถินเทพา (*Acacia mangium*) (Monteuuis and Bon, 2000) เป็นต้น ซึ่งส่วนมากใช้วิธีการชักนำรากโดยกระตุ้นด้วยออกซินความเข้มข้นสูง ๆ โดยใช้ระยะเวลาสั้นลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (Lemos and Black, 1996 c; Sanchez *et al.*, 1996; Nagori and Purohit, 2004) ตัวอย่างเช่น การชักนำรากในทุเรียนเทศ Lemos and Black (1996 c) แช่ชิ้นส่วนโคนยอดในสารละลาย NAA ความเข้มข้นสูง 500 หรือ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (2,685 หรือ 5,370 ไมโครโมลาร์) นาน 3 นาที พบว่า ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในสภาพธรรมชาติก็พบว่า การขยายพันธุ์พืชวงศ์ Annonaceae โดยการตอนกิ่งและการปักชำ ใช้ระยะเวลานานและมักไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (ทอม, 2546) เนื่องจากการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานต่ำ โดยเฉพาะการเกิดราก (George and Nissen, 1987; Rasai *et al.*, 1995 a, 1995 c; Lemos and Black, 1996 a; Castro *et al.*, 1999; Bridg, 2000; Farooq *et al.*, 2002; Zobayed *et al.*, 2002; Nagori and Purohit, 2004; Padilla and Encina, 2004)

สำหรับการชักนำรากในสภาพธรรมชาติ เมื่อครบ 35 วันหลังจากย้ายปลูกยอดกล้วยไ้พอนที่ได้รับการกระตุ้นด้วย NAA หรือ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตสูง และพบว่ายอดที่จุ่มโคนยอดในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 8,000 ไมโครโมลาร์สามารถเกิดรากได้ ซึ่ง Nagori and Purohit (2004) ได้เปรียบเทียบการชักนำให้ยอดของน้อยหน่าเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อและสภาพธรรมชาติ พบว่าในสภาพธรรมชาติดีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงกว่า การชักนำรากกล้วยไ้พอนด้วยวิธีการดังกล่าวคล้ายคลึงกับการทดลองของ สุธี (2541) ซึ่งชักนำรากจากยอดโมกซ้อนในสภาพเพาะเลี้ยงไม่ประสบความสำเร็จ จึงนำยอดที่ผ่านการกระตุ้นด้วย NAA หรือ IBA

ออกปลูก หลังจากย้ายปลูกลาน 45 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 64.47 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเกิดรากขึ้นจากแคลลัสสีน้ำตาลบริเวณโคนยอด

7. การศึกษาการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของชิ้นส่วนใบเมื่อกระตุ้นด้วย BA ร่วมกับ NAA

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไ้พอน พบว่า อาหารที่เติม NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินเพียงอย่างเดียว หรือการเติม NAA ร่วมกับ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัสได้ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA ทำให้มีจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสและคะแนนการเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วย NAA เพียงอย่างเดียวคล้ายคลึงกับการทดลองของ Omura *et al.* (1987) ที่พบว่า อาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบของทับทิม (*Punica granatum*) เกิดแคลลัสได้สูงสุด และในการชักนำให้ชิ้นส่วนใบของ *Phlox paniculata* เกิดแคลลัส Jain *et al.* (2002) พบว่า อาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BA มีผลชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัสได้สูงสุด และในการชักนำให้ชิ้นส่วนใบของ *Cephaelis ipecacuanha* เกิดแคลลัส Rout *et al.* (2000) พบว่า การใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA สามารถชักนำแคลลัสได้มากกว่าการใช้ 2,4-D หรือ BA เพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกับการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของลำคาน (สุภาวดี, 2540) และต้นผีเสื้อ (*Dianthus caryophyllus*) (Jain *et al.*, 2001) และชิ้นส่วนข้อของตะขบ (*Flacourtia jangomas*) (Chandra and Bhanja, 2002) แต่ในพืชหลายชนิดสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสได้สูงสุดด้วยออกซินเพียงอย่างเดียว เช่น ใบอ่อนของโมกซ้อน (สุธี, 2541) อีพิคอติลของ *Citrus acida* (Chakravarty and Goswami, 1999) นอกจากนี้ยังมีชิ้นส่วนพืชบางชนิดที่การเติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่น การทดลองของ Karam and Al-Majathoub (2000) พบว่า การเติม TDZ เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้ก้านช่อดอก กลีบดอก และก้านใบของ *Cyclamen persicum* เกิดแคลลัสได้

นอกจากอัตราส่วนที่เหมาะสมของออกซินและไซโตไคนินแล้ว ชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินก็มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดพืช สายพันธุ์ และชนิดของชิ้นส่วน เป็นต้น (รังสฤษฎี, 2541; Moore, 1989; Pierik, 1998) ตัวอย่างเช่น ในการทดลองของ Chakravarty and Goswami (1999) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอีพิคอติล ของ *Citrus acida* บนอาหารที่เติม 2,4-D NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน พบว่า 2,4-D สามารถชักนำให้

ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสได้ ในขณะที่ NAA และ IBA ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ แต่จะเกิดเป็นราก และในการชักนำให้ใบอ่อนของลำคานเกิดแคลลัส สุภาวดี (2540) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้นเกินกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไ้พอน ส่วนมากมีลักษณะเป็น friable callus ที่ไม่มีการพัฒนาต่อไปเป็นโครงสร้างอื่น แม้ว่าเซลล์พืชทุกเซลล์มีความสามารถที่จะเจริญเติบโตพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ (totipotency) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือแคลลัสอาจมีการพัฒนาเกิดเป็นยอด ราก (shoot/root organogenesis) หรือพืชทั้งต้น (embryogenesis) ได้ แต่การพัฒนาจะเกิดขึ้นหรือไม่ หรือจะพัฒนาโดยกระบวนการใดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ข้อจำกัดของการแสดงออกของเซลล์พืชแต่ละชนิด ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและอัตราส่วนสมดุลระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ในการพัฒนาของแคลลัสโดยทั่วไป หากอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงจะพัฒนาเป็นราก ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำจะพัฒนาเป็นยอด และถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสมดุลกันจะพัฒนาเป็นแคลลัสต่อไป (รังสฤษฎี, 2541; Seabrook, 1980) ซึ่งความเข้มข้นที่ได้รับต้องเหมาะสมกับแต่ละระยะของการพัฒนาด้วย ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ Jain *et al.* (2001) พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้ชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นฝั่เลื้อยเกิดแคลลัสได้สูงสุด และแคลลัสจะมีการพัฒนาเกิดเป็นยอดเมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสหรือกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างต่าง ๆ กับที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาของโครงสร้างที่เกิดขึ้นอาจไม่ใช่อาหารสูตรเดียวกัน (Pierik, 1998; Hamama *et al.*, 2001) ดังนั้นการที่แคลลัสของกล้วยไ้พอนไม่มีการพัฒนาต่ออาจเนื่องจากได้รับอาหารไม่เหมาะสมกับระยะการพัฒนาเพราะในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไ้พอน ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลานาน (8 สัปดาห์) และการได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานาน ๆ อาจส่งผลยับยั้งกระบวนการพัฒนาได้ (Goodwin and Mercer, 1983; McCown and Sellmer, 1987; Moore, 1989)

สำหรับพืชวนน้อย เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเดียวกับการศึกษาในกล้วยไ้พอน พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น

ได้ แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ NAA ลง พบว่า สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นบนแผ่นใบได้ โดยอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และการเติม BA เพียงอย่างเดียว หรือการเติม NAA ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดโครงสร้างรูปกลม (nodule) โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียว (สูตรที่ 4) และการเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 10-20 ไมโครโมลาร์ (สูตรที่ 10 และ 11) มีจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงสุด แต่ในสูตรที่ 11 มีคะแนนการเกิดการเปลี่ยนแปลงสูงสุด คล้ายคลึงกับการชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดโครงสร้างรูปกลมใน *Stellaria longipes* (Miranda *et al.*, 1999) กระถินเทพา (Xie and Hong, 2001) และแอปเปิ้ล (cv. Topred) (Yancheva *et al.*, 2003) ที่พบว่าการใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดโครงสร้างรูปกลมซึ่งจะพัฒนาเป็นยอดได้ในเวลาต่อมา โดยมีการเรียกโครงสร้างรูปกลมดังกล่าวแตกต่างกัน เช่น nodular structure (Miranda *et al.*, 1999) nodule form (Xie and Hong, 2001) หรือ meristematic dome (Yancheva *et al.*, 2003)

โครงสร้างรูปกลมที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนใบ ในระยะแรกมีลักษณะกลมเกลี้ยง ผิวมีความวาว คล้ายไซมาติกอิมบริโอระยะ globular แต่เมื่อติดตามพัฒนาการกลับไม่พบโครงสร้างระยะ heart shape และ torpedo shape ที่ชัดเจน เมื่อศึกษาลักษณะกายวิภาค พบว่า โครงสร้างที่เห็นเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนใบ มีการพัฒนาใน 2 ลักษณะ ได้แก่ 1) โครงสร้างที่เกิดจากกระบวนการเกิดอวัยวะ (organogenesis) เนื่องจากพบว่ามีท่อลำเลียงภายในโครงสร้างเชื่อมต่อกับท่อลำเลียงของชิ้นส่วน มักพบที่เกิดจากเนื้อเยื่อบริเวณใกล้ท่อลำเลียงของชิ้นส่วนใบ คล้ายคลึงกับการเกิดยอดโดยตรงจากชิ้นส่วนใบของแอปเปิ้ล (cv. Topred) (Yancheva *et al.*, 2003) และใบเลี้ยงของแตงโม (*Citrullus lanatus*) (Krug *et al.*, 2005) และ 2) โครงสร้างที่เกิดจากกระบวนการเกิดไซมาติกอิมบริโอ (embryogenesis) เนื่องจากพบว่ามีท่อลำเลียงภายในโครงสร้างแยกจากชิ้นส่วนใบที่นำมาเพาะเลี้ยง และพบเนื้อเยื่อจุดกำเนิดราก มักพบที่เกิดการพัฒนาจากเนื้อเยื่อชั้นอพิเคอร์มิสและชั้นไดอพิเคอร์มิส คล้ายคลึงกับการเกิดการเกิดไซมาติกอิมบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนไซโกติกอิมบริโอของเลี่ยน (*Melia azedarach*) (Vira *et al.*, 2003) Sharp *et al.* (1980) กล่าวว่ารูปแบบการพัฒนาเป็นอวัยวะและไซมาติกอิมบริโอ อาจถูกกำหนดหรือเกิดโดยการสุ่ม เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อ รูปแบบของการพัฒนาแบ่งเป็นทางตรงและทางอ้อมคือเกิดผ่านแคลลัส โดยเขามีแนวความคิดว่า รูปแบบของการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานโดยตรงถูกกำหนดไว้ภายในเซลล์พืช เซลล์มีลักษณะเป็น pre-embryogenic determined cells (PEDC) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความพร้อมส่วนการเกิดโดยทางอ้อมนั้น เกิดขึ้นเมื่อเซลล์หรือแคลลัสได้รับการชักนำให้เกิดความพร้อม จึง

เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า induced embryogenic determined cells (IEDC) (รังสฤษดิ์, 2541; Lyndon, 1990) และในพืชหลายชนิด พบว่าการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสามารถเปลี่ยนกลับเป็นยอดได้แม้ว่าจะมีความถี่ในการเกิดต่ำ (Raemakers *et al.*, 1995) จากการศึกษาในครั้งนี้สังเกตพบว่าตำแหน่งบนชิ้นส่วนใบพืชน้อยที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็น nodule ที่จะพัฒนาเกิดเป็นยอดโดยตรง หรือโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมากมักเป็นบริเวณรอยตัดหรือบนแผ่นใบใกล้รอยตัด และตรงบริเวณกลางและฐานใบมักมีการตอบสนองได้ดีกว่าปลายใบ สอดคล้องกับการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบของแอปเปิ้ล (cv. McIntosh) ที่ Sarwar and Skirvin (1997) พบว่า ชิ้นส่วนใบบริเวณกลางและฐานใบมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดยอดมากกว่าปลายใบ และการเกิดยอดมักเกิดบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนมากกว่าบนแผ่นใบ

การเกิดโครงสร้างมากกว่าหนึ่งลักษณะจากชิ้นส่วนเดียวกัน มักเกิดเนื่องจากการได้รับปัจจัยบางประการที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่น ในการชักนำให้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงของเมลอน (*Cucumis melo*) เกิดการเปลี่ยนแปลง พบว่าอาหารสูตรที่เติม IAA (11.4 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ kinetin (5 ไมโครโมลาร์) ชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดแคลลัส ในขณะที่อาหารที่เติม IBA (5 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ BA (4.4 ไมโครโมลาร์) ชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วน และอาหารที่เติม BA (2.7 ไมโครโมลาร์) ชักนำให้เกิดยอดโดยตรงจากชิ้นส่วน (Kintzios *et al.*, 2004) หรือความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่น การทดลองของ Singh *et al.* (2003) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วแระ *Cajanus cajan* ที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกบนอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่ำ (0.05-1.0 ไมโครโมลาร์) จะชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอด แต่หากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้นสูง (10-20 ไมโครโมลาร์) จะเกิดโซมาติกเอ็มบริโอขึ้น แต่การเกิดโครงสร้างหลาย ๆ รูปแบบบนชิ้นส่วนเดียวกันที่ได้รับปัจจัยต่าง ๆ เหมือนกันก็สามารถพบได้ เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากไซโกติกเอ็มบริโอของ *Fagopyrum esculentum* บนอาหารสูตร RX ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิดยอด ราก และโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัส (Rumyantseva *et al.*, 2005) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนไฮโปคอติลของ *Stellaria longipes* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น 3 รูปแบบ ได้แก่ การเกิดยอดโดยตรงจากชิ้นส่วน เกิด nodular structure ก่อนพัฒนาเป็นยอด และเกิดแคลลัสก่อนพัฒนาเป็นยอด (Miranda *et al.*, 1999) และในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Camillia japonica* โดย Pedroso and Pais (1993) นำชิ้นส่วนใบไปแช่ในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 1 กรัม

ต่อลิตร นาน 20 นาที แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2 MS ที่เติม D-glucose 25 กรัม ต่อลิตร เก็บในที่มืดนาน 11 วัน ก่อนย้ายมาไว้ในสภาพได้รับแสง พบว่า ที่ตำแหน่งต่างกันของ ชิ้นส่วนใบมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน ภายใต้อาหารและแสงเดียวกัน คือ เกิดโสมาคีเอ็มบริโอ โดยตรงจากชิ้นส่วนใบเฉพาะบริเวณขอบใบ เกิดรากโดยตรงบริเวณเส้นกลางใบ เกิด *habituated callus* บริเวณใกล้โคนใบ และเกิด *organogenic callus* บริเวณโคนใบตรงรอยตัดและบริเวณส่วนปลายใบ ซึ่งการเกิดลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกันน่าจะเป็นผลจากปัจจัยภายในที่แตกต่างกัน เช่น การสะสมธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งของชิ้นส่วน ความสัมพันธ์ระหว่างเนื้อเยื่อ ความสามารถของเซลล์ การแลกเปลี่ยนธาตุอาหารของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เป็นต้น (Moore, 1989; Attree and Fowke, 1991; Phillips *et al.*, 1995; Pierik, 1998)

ในพืชวนน้อย การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารที่เติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว หรืออาหารที่เติมไซโตไคนินความเข้มข้นสูงร่วมกับออกซินความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิด *nodule* ที่จะพัฒนาเกิดเป็นยอดโดยตรง สอดคล้องกับ Phillips *et al.* (1995); Pierik (1998) ที่พบว่า ในการชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดโดยตรง (*direct shoot organogenesis*) โดยทั่วไปทำได้โดยการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนบนอาหารที่เติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว หรืออาหารที่เติมไซโตไคนินความเข้มข้นสูง ร่วมกับออกซินความเข้มข้นต่ำ ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดยอดโดยตรงจากชิ้นส่วนใบของแอปเปิ้ล (*cv. McIntosh*) (Sarwar and Skirvin, 1997) และ หม่อน (Chitra and Padmaja, 2005) ใบเลี้ยงของแตงโม (Pirinc *et al.*, 2003) ใบเลี้ยงและไฮโปคอติลของ *Arnebia eachroma* (Jiang *et al.*, 2005)

การชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดโสมาคีเอ็มบริโอ โดยทั่วไปมักกระตุ้นโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติมออกซินเพียงอย่างเดียว หรือเติมออกซินร่วมกับไซโตไคนินแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารที่เติมไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำ ๆ เพื่อให้เกิดการพัฒนาของโสมาคีเอ็มบริโอ (Raemakers *et al.*, 1995) จากการรวบรวมของ Raemakers *et al.* (1995) พบว่าในพืชใบเลี้ยงคู่ 64 ชนิด มี 17 ชนิดที่เกิดโสมาคีเอ็มบริโอขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มี 31 ชนิดเกิดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมออกซินเพียงอย่างเดียว มี 31 ชนิดเกิดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมออกซินร่วมกับไซโตไคนิน และ 25 ชนิดเกิดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตในแต่ละพืช การที่ชิ้นส่วนใบ

ของพืชขนาดเล็กและพืชบางชนิดต้องการไซโตไคนินเพียงชนิดเดียว หรือต้องการปริมาณไซโตไคนินที่เติมลงในอาหารสูงกว่าออกซินมากเพื่อชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอ น่าจะเนื่องมาจากภายในชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวมีการสะสมออกซินอยู่ค่อนข้างมาก ซึ่งโดยมากมักพบในการนำเมล็ด หรือไซโกติกเอมบริโอของพืชมาเพาะเลี้ยงมากกว่าใช้ชิ้นส่วนอื่น (อัจฉริยา, 2538; Southworth and Kwiatkowski, 1991; Vyas and Bansal, 2004) นอกจากนี้ Vyas and Bansal (2004); Vila *et al.* (2003) พบว่าชนิดของไซโตไคนินก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอ เช่น ในการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอมบริโอของจิ้ง (Bombax ceiba) พบว่า BA ชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดไซมาติกเอมบริโอได้มากกว่า kinetin ขณะที่ TDZ ชักนำให้ชิ้นส่วนของเถียนเกิดไซมาติกเอมบริโอได้มากกว่า BA ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของไซโตไคนินต่างชนิดกันที่มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนใบของพืชขนาดเล็กเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน

นอกจาก nodule ที่จะพัฒนาเกิดเป็นยอดโดยตรงและไซมาติกเอมบริโอระยะ globular ที่พบได้บนชิ้นส่วนใบพืชขนาดเล็กแล้ว ยังพบโครงสร้างชั้นที่ 2 ลักษณะกลม กลี้ยง ผิวมีความวาว คล้ายไซมาติกเอมบริโอระยะ globular จำนวนมาก ซึ่งบางส่วนมีการพัฒนาขึ้นคล้ายระยะ heart shape คล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชหลายชนิดที่พบการพัฒนาของไซมาติกเอมบริโอชั้นที่ 2 เกิดขึ้นได้บนโครงสร้างแรก เช่น ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (Raemarkers *et al.*, 1993) และกุหลาบ (*Rosa hybrida* cv. Carefree Beauty) (Li *et al.*, 2002) และการเพาะเลี้ยงเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) (Nair and Gupta, 2006) เป็นต้น ในพืชขนาดเล็ก การเกิดโครงสร้างชั้นที่ 2 จำนวนมากน่าจะเป็นผลเนื่องจาก BA เพราะ BA มีผลกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพ (Lyndon, 1990; Taiz and Zeiger, 2002) แต่การได้รับไซโตไคนินในระดับความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลยับยั้งกระบวนการพัฒนา (Goodwin and Mercer, 1983; McCown and Sellmer, 1987; Moore, 1989) เป็นสาเหตุให้โครงสร้างชั้นที่ 2 ที่เกิดขึ้นไม่มีการพัฒนาต่อ