บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเพาะเลี้ยงเมล็ด

1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัส คือ 0.08 D1K ในที่มืด ส่วนเมล็ดที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัสเป็นเมล็ดที่แก่เต็มที่แล้ว สามารถเกิดแคลลัสได้เร็ว เมล็ดที่แก่เกินไปผลจะเละมีโอกาสติดเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย จึงยากแก่การทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เมล็ดที่อ่อนเกินไปจะไม่เกิดแคลลัส เช่น เมล็ดจากฝางซึ่งนำเมล็ดทั้งดอกมาทำการทดลอง จึงมีทั้งเมล็ดที่แก่และอ่อน เมล็ดที่แก่เต็มที่เท่านั้นที่เกิดแคลลัสซึ่งมีเพียง 1 – 2 เมล็ด จึงทำเมล็ดจากฝางเกิดแคลลัสได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนที่ทำการทดลอง แต่เมล็ดจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่นำมาทดลอง เป็นเมล็ดที่แก่เต็มที่ทั้งสิ้นจึงเกิดแคลลัสได้หมดทุกเมล็ด ลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์แคลลัสที่เกิดขึ้น น่าจะเกิดจากคัพภะ จากหลักฐานสนับสนุน 2 ประการ ประการแรกคือแคลลัสที่เกิดขึ้นเจริญเติบโตออกจากช่องไมโครพาย ซึ่งเป็นช่องที่คัพภะเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนต่อไป ประการที่สอง คือ เมล็ดจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1 เมล็ด สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนก่อนแล้วจึงเกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยต่อระหว่างต้นและราก

1.2 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

1.2.1 อิทธิพลของสภาพอาหาร แสงและความเข้มข้นของ BAP

สภาพอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัส คือ อาหารเหลว สามารถเลี้ยงแคลลัสให้เจริญเติบโตรวดเร็วกว่าอาหารแข็ง เนื่องจากพื้นที่ผิว

ทุกส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหารจึงได้รับอาหารมากกว่าอาหารแข็ง ซึ่งมีพื้นที่ผิวบางส่วนเท่านั้นที่สัมผัสกับอาหาร และแรงจากเครื่องเขย่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ทำให้เซลหรือกลุ่มเซลของแคลลัสซึ่งเกาะกันอย่างหลวม ๆ หลุดออกมา และเจริญเป็นแคลลัสต่อไป ทำให้เพิ่มเนื้อที่ผิวที่สัมผัสกับอาหารมากขึ้น จากผลการทดลองของ Pierik (7, 9) ก็ปรากฏผลเช่นเดียวกัน คือ แคลลัสในอาหารเหลวเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารแข็ง แต่ก็ขึ้นอยู่กับพันธุ์ด้วยเหมือนกัน เพราะบางพันธุ์เหมาะสมในอาหารแข็งมากกว่าอาหารเหลว

อิทธิพลของแสงเห็นความแตกต่างได้ชัด คือ สีของแคลลัสในที่มีแสงจะมีสีเขียว เนื่องจากมีการสร้างคลอโรฟิลขึ้น แคลลัสในที่มืดจะมีสีเหลือง และอิทธิพลของแสงยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส ซึ่งเกี่ยวข้องกับสภาพอาหารด้วย ในอาหารเหลวแสงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อมี BAP แต่จะเร่งการเจริญเติบโตเมื่อไม่มี BAP ดังนั้นแสดงว่าแสงมีผลยับยั้งการทำงานของ BAP ในอาหารเหลว แต่ในอาหารแข็งแสงช่วยเร่งการเจริญเติบโตของแคลลัสบ้างเล็กน้อย ทั้งอาหารแข็งที่มี BAP หรือไม่มี BAP อธิบายได้ว่า แคลลัสในที่มีแสงตรงบริเวณสัมผัสกับอาหารอาจได้รับแสงน้อยมากจนไม่มีผลต่อ BAP และแคลลัสที่ได้รับแสงจะมีสีเขียว สามารถสังเคราะห์แสงสร้างอาหารได้มากขึ้นอีก ทำให้แคลลัสในที่มีแสงเจริญได้ดีกว่าในที่ไม่มีแสง ปริมาณ BAP ที่เหมาะสมในอาหารเหลว คือ 1 ppm แต่ในอาหารแข็งมีช่วงความเหมาะสมกว้างกว่า คือ 1 – 2 ppm ถ้าความเข้มข้นมากขึ้น (3 ppm) ประสิทธิภาพในการทำงานของ BAP จะลดลง

1.2.2 อิทธิพลของน้ำตาล

สูตรอาหารทั่ว ๆ ไป ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน จากการศึกษาแคลลัสของ Scopolia japonica (10) พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุด รองลงมาคือ กลูโคส และจากการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณแคลลัสใน Camptothecin acuminata (10) พบว่าอาหารที่มีซูโครส เพิ่มปริมาณแคลลัสและ

ปริมาณเซลได้มากกว่ากลูโคส แต่ Pierik ศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัสของหน้าวัวในอาหารเหลว โดยใช้กลูโคส (9) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยใช้กลูโคสและซูโครส พบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสหน้าวัวในซูโครสดีกว่ากลูโคส และในการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลโดยวิธี Batch Culture พบว่าถ้าเลี้ยงในอาหารที่ขาดซูโครสจะทำให้ปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตภายในเซลลดลงอย่างเห็นได้ชัด (11) แสดงว่าซูโครสเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานมากกว่ากลูโคส

1.3 การเกิดต้นและราก

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดต้นเกิดราก คือ MS-1N1K ในที่มีแสง โดยแคลลัสจะเกิดต้นก่อนขณะเดียวกันก็มีการเพิ่มปริมาณแคลลัสไปด้วย ต่อมาภายหลังจึงเกิดราก Pierik ได้ให้เหตุผลว่า ปริมาณไซโตไคนินมีผลในการชักนำให้เกิดต้น ส่วนการเกิดรากไม่เกี่ยวข้องกับไซโตไคนิน ดังนั้นการเกิดรากจึงเกิดขึ้นภายหลังและปริมาณรากที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเติมออกซิน (NAA) ก็ได้ หรืออาจเกิดขึ้นเองโดยไม่ต้องเติมออกซินก็ได้เช่นกัน

2. การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ จากต้นอ่อน

2.1 การเกิดแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ

อวัยวะที่สามารถเกิดแคลลัสเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS-1N1K ในที่มีแสง คือ ใบ ก้านใบ และข้อจะเห็นว่า ใบ และก้านใบ เกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยตัด และที่ผิวถ้าสังเกตด้วยกล้อง 2 ตา จะเห็นว่าที่ผิวมีรอยบาดแผลเล็ก ๆ อยู่และเกิดแคลลัสตรงบริเวณรอยแผลนี้ แสดงว่าแคลลัสที่เกิดในใบและก้านใบอาจเกี่ยวข้องกับ Wound reaction (11) โดยบริเวณรอยตัดหรือรอยแผลจะมี wound hormone มาสะสม และสารชนิดนี้จะชักนำให้เกิดการแบ่งเซลขึ้น แต่การแบ่งเซลจะเกิดต่อเนื่องไปจนเป็นแคลลัส ต้องอาศัยสารที่ควบคุมการเจริญเติบโต

ซึ่ง street (11) ได้รวบรวมการทดลองของ Haberlandt ศึกษา wound reaction ในมันฝรั่ง พบว่า หลังจากตัดมันฝรั่งออกเป็นชิ้นจะเกิดการแบ่งเซลไประยะหนึ่งแล้วหยุด แต่เมื่อใส่ใน 2, 4-D และน้ำมะพร้าว ปรากฏว่าการแบ่งเซลจะเกิดต่อเนื่องจนกระทั่งได้แคลลัส และการทดลองของ Yeoman & Mitchell 1970 ศึกษาใน artichoke-tuber โดยเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี 2, 4-D พบว่าจะเกิดการสะสมของโปรตีนบางชนิด RNA และสารโพลีฟินโนลิค (polyphenolic) หลายชนิด แต่การแบ่งเซลเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่เกิดแคลลัส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2, 4-D จะเกิดการสร้างแคลลัสขึ้น เขาจึงสันนิษฐานว่าการเกิดแคลลัสอาจเกิดจากปฏิกริยาระหว่าง (interaction) wound hormone กับ 2, 4-D ในทำนองเดียวกันการเกิดแคลลัสในใบและก้านใบของหน้าวัว อาจเป็นปฏิกริยาระหว่าง (interaction) wound hormone กับ NAA และ Kinetin ก็ได้ส่วนแคลลัสที่เกิดจากข้อจะเกิดตรงบริเวณตาซึ่งมีเนื้อเยื่อเจริญและพร้อมที่จะแบ่งเซลเจริญเติบโตต่อไป ปริมาณ NAA และ Kinetin 1 ppm. เหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเกิดการแบ่งเซลจนเป็นแคลลัส ส่วนรากไม่เกิดแคลลัสเลย อาจเนื่องจากปริมาณของ NAA และ Kinetin ในอาหารไม่เหมาะสมที่จะชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายรากเกิดการแบ่งเซลเป็นแคลลัสได้

2.2 <u>การเกิดต้นและรากโดยตรง</u>

ข้อเป็นอวัยวะส่วนเดียวเท่านั้นที่สามารถเกิดต้นและรากได้โดยตรง และสูตรอาหารที่เหมาะสม คือ MS-1N1K ซึ่งเป็นสูตรอาหารเดียวกับการเกิดแคลลัส โดยจะทำให้เกิดต้นและรากได้ในปริมาณมาก อธิบายได้ว่า เป็นอิทธิพลของปฏิกริยาร่วมกันระหว่าง NAA และ Kinetin สามารถทำให้ตาที่มีอยู่แล้วมีการเจริญเติบโตเกิดเป็นต้นได้หลายต้นใน 1 ข้อ โดยไม่ต้องผ่านแคลลัส แต่ข้อบางข้อสามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ในอาหารสูตรเดียวกัน อาจเนื่องจากอายุของข้อซึ่งมีปริมาณออกซินและไซโตไคนินแตกต่างกัน จึงทำให้การตอบสนองของเซลเนื้อเยื่อเจริญ

แตกต่างกัน ในการเกิดรากจะเกิดภายหลังเกิดต้นแล้ว ด้วยเหตุผลเดียวกับการเกิดรากในหัวข้อ 1.3

2.3 การเกิดต้นและรากจากแคลลัส

แคลลัสที่เกิดจากใบ ก้านใบ และข้อ สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นเป็นรากได้ ในสูตรอาหารเดิม คือ MS-1N1K ในที่มีแสง ใบ ก้านใบ และข้อจะเกิดต้นก่อนราก แต่ในใบบางใบ เกิดรากก่อนต้น อาจเกิดจากอิทธิพลของอายุของใบก็ได้ ซึ่งทำให้ปริมาณออกซิน และไซโตไคนินแตกต่างกัน ใบอ่อนจะมีปริมาณออกซิน มากกว่าใบแก่ ดังนั้นอาจเกิดรากก่อนก็ได้

3. การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ จากต้นที่ปลูกในกระถาง

3.1 การศึกษาหาอวัยวะที่ปลอดเชื้อ

อวัยวะที่เหมาะสมในการนำไปเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาถึงสภาพปลอดเชื้อ คือ ใบอ่อน จานรองดอกอ่อน ก้านช่อดอกอ่อน และก้านใบอ่อน เพราะมีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อสูง แต่ถ้าพิจารณาถึงปริมาณของแต่ละอวัยวะที่นำมาทดลองแล้ว ใบอ่อนเป็นอวัยวะที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง เพราะใบอ่อนใบเดียวสามารถให้ปริมาณเนื้อเยื่อที่นำมาทดลองมากที่สุด และมีเปอร์เซนต์ทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อสูง รองลงมา คือ จานรองดอกอ่อน ก้านช่อดอกอ่อน ก้านใบอ่อนและราก ตามลำดับ อวัยวะที่ไม่เหมาะสม คือ ตา และช่อดอกอ่อน (Spadix) เป็นส่วนที่เชื้อแบคทีเรียและราติดอยู่มาก ทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้ยาก

ปัญหาอีกข้อหนึ่งที่มีผลต่อสภาพปลอดเชื้อ คือ ฤดูกาลซึ่งมีความสัมพันธ์กับความชื้นเป็นอย่างมาก ในฤดูฝนทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้ยาก แม้ว่าระยะนี้หน่อวัวมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว มีอวัยวะอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงได้มากก็ตาม แต่มีความชื้นสูง การแพร่ระบาดของโรคมีมาก จุลินทรีย์เจริญเติบโตดี จึงยากแก่การทำให้อยู่ในสภาพ

ปลอดเชื้อ ส่วนฤดูหนาวและฤดูร้อน ปัญหาการเกิดโรคของหน้าวัวมีน้อยทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้ง่ายกว่าในฤดูฝน

3.2 ความสามารถในการเกิดแคลลัสจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ

อวัยวะที่สามารถเกิดแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS-1D1B ในที่มืด คือ ใบอ่อน แคลลัสจะเกิดตรงบริเวณรอยตัด ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ wound Reaction (11) ดังได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.1 ก้านใบอ่อน ก้านช่อดอกอ่อน จานรองดอกอ่อน และปลายรากไม่เกิดแคลลัสในอาหารสูตรเดียวกัน อาจเนื่องจากปริมาณ 2, 4-D และ BAP ไม่สัมพันธ์กับ wound hormone ของอวัยวะเหล่านั้น หรืออวัยวะเหล่านั้นอาจไม่มี wound hormone มาสะสมก็ได้

3.3 การศึกษาสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อน

สูตรที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัสจากใบอ่อน คือ MS-1D1B ในที่มืด แสดงว่า 2, 4-D และ BAP ในปริมาณดังกล่าวในที่มืดเหมาะสมในการทำงานร่วมกันหรือทำงานต่อเนื่องกับ wound hormone ส่วนสูตรอาหาร MS-1N1K ในที่มีแสงไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อาจเกี่ยวข้องกับเหตุผล 2 ประการ คือ ปริมาณ NAA และ Kinetin ที่ไม่เหมาะสม หรืออิทธิพลของแสงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ NAA และ Kinetin ทำให้ไม่เหมาะสม ต่อการทำงานร่วมกันหรือทำงานต่อเนื่องกับ wound hormone ในการชักนำให้เกิดแคลลัส

3.4 ความสามารถในการสร้างแคลลัสจากหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

อาหารสูตร MS-1D1B ในสภาพมืดเหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปในการชักนำให้เกิดแคลลัส สามารถชักนำใบอ่อน 15 พันธุ์จากการทดลอง 16 พันธุ์ ให้เกิดแคลลัสได้ แต่เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสไม่เท่ากันอาจเนื่องจากอายุของใบที่นำมาทดลองเป็นประการแรก คือ ถ้าใบอ่อนที่มีอายุน้อยคือสภาพใบยังม้วนอยู่ จะเกิดแคลลัสได้มาก มีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูง แต่ถ้าใบอ่อนที่กางเต็มที่แล้วจะเกิดแคลลัสได้น้อย และมี

เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสต่ำ เหตุผลประการที่สอง คือ เนื้อเยื่ออาจได้รับอันตรายจากความร้อนของปากคีบขณะทำการทดลองก็ได้ แต่ความรวดเร็วในการเกิดแคลลัส ปริมาณแคลลัสขึ้นอยู่กับกรรมพันธุ์ และอายุของใบอย่างแน่นอน

3.5 ศึกษาอิทธิพลของ 2, 4- D และ BAP ในการเกิดแคลลัส

3.5.1 ในอาหารสูตร MS

การชักนำใบอ่อนให้เกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับอิทธิพลของ BAP เพียงอย่างเดียว จะเห็นว่าใบอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มี 2, 4- D แต่มี BAPสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (1, 2 ppm) แต่สูตรอาหารที่มี 2, 4- D อย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ความเข้มข้นของBAPที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดแคลลัส คือ 1 ppm ถ้ามากไปจะไม่เกิดแคลลัส (BAP 3, 4 ppm) ส่วนอิทธิพลของ 2, 4-D ช่วยส่งเสริมให้เกิดแคลลัสได้มากขึ้น ความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่เหมาะสม คือ 1 ppm ถ้าน้อยกว่านี้ปริมาณแคลลัสก็จะน้อยลงด้วย

แสดงว่าความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัส คือ 1 ppm และ BAP คือ 1 ppm เช่นกัน

3.5.2 ในอาหารสูตร PCI

การชักนำใบอ่อนให้เกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับอิทธิพลของ BAP เช่นกัน จะเห็นว่าเมื่อเลี้ยงใบอ่อนในอาหารที่มี BAP อย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่เมื่อมี 2, 4- D อย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ความเข้มข้นของ BAPที่เหมาะสมที่สุด คือ 1 ppm ถ้ามากไปจะไม่เกิดแคลลัส (BAP 3, 4 ppm) ส่วนอิทธิพลของ 2, 4- D ช่วยทำให้แคลลัสมีปริมาณมากขึ้น ความเข้มข้นของ 2, 4- D ที่เหมาะสมคือ 1 ppm ถ้าน้อยหรือมากกว่านี้การเกิดแคลลัสจะน้อยลง

เมื่อเปรียบเทียบอาหาร 2 ชนิด คือ MS และ PCI พบว่าความเข้มข้นของ BAP ที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดแคลลัสเท่ากันคือ 1 ppm แต่ปริมาณ 2, 4- D

ที่เหมาะสมแตกต่างกันไป ใน MS ความเข้มข้นของ 2, 4–D ที่เหมาะสมคือ 1 ppm แต่ใน PCI คือ 0.5 ppm เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างกันของ MS และ PCI ที่มีผลเกี่ยวข้องกับปริมาณ 2, 4– D อาจจะเป็นปริมาณ macronutrient ซึ่งใน PCI เป็นครึ่งหนึ่งใน MS หรืออาจจะเกี่ยวข้องกับชนิดของน้ำตาลก็ได้ใน MS ใช้ซูโครส 3% แต่ใน PCI ใช้กลูโคส 3% ก็ได้ แต่รายละเอียดในการทำงานสัมพันธ์กันนั้นไม่สามารถอธิบายได้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลลัสที่เกิดในอาหารสูตรที่เหมาะสมคือ MS-1D1B และ PCI-0.5 D1B พบว่าปริมาณพอกัน แต่ลักษณะใบใน PCI ทั่ว ๆ ไปขยายใหญ่มากกว่า MS อาจมีการดูดซึมสารต่าง ๆ ได้ดีกว่าก็ได้ ถ้าพิจารณาทุกการทดลองใน MS และ PCI แล้ว พบว่า PCI สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่า MS มีช่วงความเข้มข้นของ 2, 4– D และ BAP ในการเกิดแคลลัสได้กว้างกว่า ดังนั้นน่าจะมีการศึกษาต่อไป โดยเปรียบเทียบพันธุ์ต่าง ๆ ในการเกิดแคลลัสในสูตร PCI เทียบกับ MS เพื่อหาสูตรที่เหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

3.6 อิทธิพลของ BAP และชนิดของน้ำตาลในการเพิ่มปริมาณแคลลัส

ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสในสูตรอาหาร PCSS พบว่าซูโครสสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่ากลูโคส ด้วยเหตุผลดังกล่าวมาแล้วในข้อ 1.2.2 และอิทธิพลของ BAP พบว่าในอาหารที่มีกลูโคสถ้ามี BAP ปริมาณน้อย (1 ppm) เซลภายในแคลลัสเกาะกันแน่นกว่า BAP ปริมาณมาก (2, 4 ppm) ส่วนในอาหารที่มีซูโครสจะไม่เห็นความแตกต่างกันในการยึดเกาะของเซล แต่จะเห็นความแตกต่างในการเพิ่มปริมาณแคลลัส BAP 2 ppm สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากที่สุดและมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ความแตกต่างเหล่านั้นมีผลเกี่ยวเนื่องกับการเกิดต้นซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 3.8

3.7 ความสามารถในการเพิ่มปริมาณแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

3.7.1 สูตร MS-1D1B

สูตรนี้ไม่เหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปในการเพิ่มปริมาณแคลลัส เนื่องจากแคลลัสส่วนมากชงักการเจริญเติบโต และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อาจเป็นเพราะปริมาณ 2, 4-D สูงเกินไปจึงทำให้เกิดการสร้างลิกนิน (Lignin) ขึ้น ทำให้แคลลัสเป็นสีน้ำตาล (11) มีบางพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากเหตุผลทางกรรมพันธุ์ในการตอบสนองต่อปริมาณ 2, 4-D ต่างกัน

3.7.2 สูตร MS-1.5D2B

สูตรอาหารนี้เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแคลลัสพันธุ์ T_4, T_3, T_7, เป็นอย่างดี แต่ไม่เหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปเพราะแคลลัสพันธุ์ต่าง ๆ ส่วนมากไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งเหตุผลเช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 และเหตุผลอีกประการหนึ่งคือ ปริมาณ 2, 4-D(1.5 ppm) สูงมาก ถ้าเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานอาจเกิดการผ่าเหล่าได้ (11) ดังนั้นพันธุ์ดังกล่าวที่แคลลัสสามารถเจริญได้ดีนั้นก็เสี่ยงกับการเกิดการผ่าเหล่าด้วย

3.7.3 สูตร PCSS-S_2

สูตรอาหารนี้นอกจากเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัสพันธุ์ผกามาศในหัวข้อที่ 3.6 แล้ว ยังสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสพันธุ์ต่าง ๆ ได้มากพันธุ์อีกด้วย ดังนั้นจึงเหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณแคลลัส นอกเหนือจากเหตุผลดังกล่าวมาแล้วในข้อ 3.6 สูตรอาหารนี้ยังไม่มี 2, 4-D อีกด้วยจึงไม่ต้องคำนึงถึงเรื่องการผ่าเหล่า ซึ่งทำให้ต้นที่ได้ไม่เหมือนต้นเดิม

3.8 อิทธิพลของ BAP และชนิดของน้ำตาลในการเกิดต้นและราก

การชักนำให้เกิดต้นขึ้นกับอิทธิพลของ BAP ถึงแม้ว่าแคลลัสที่ไม่มี BAP สามารถเกิดต้นได้ก็ตาม แต่ระยะเวลาในการเกิดต้นและปริมาณต้นเป็นหลักฐานยืนยันได้เป็นอย่างดี แคลลัสที่นำมาทดลองมาจากอาหารสูตร MS-1D1B ซึ่งมี BAP ด้วยเช่นกัน สูตรนี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัสตลอดจนเกิดต้นและรากได้ในพันธุ์เดียวกันกับการทดลองนี้ ดังนั้นแคลลัสที่นำมาทดลองอาจถูกชักนำให้เกิดต้นอยู่ก่อนแล้ว (ข้อ 3.8.2) อาจมีการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลไปบ้าง แต่สังเกตด้วยตาไม่เห็น ดังนั้นเมื่อนำมาทดลองขั้นต่อไปโดยเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่มี BAPเซลที่เปลี่ยนแปลงจึงเจริญเติบโตต่อไป แต่ระยะเวลาในการเกิดต้นช้าและปริมาณต้นน้อยมากเมื่อเทียบกับแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มี BAP Pierik(9) ได้ให้เหตุผลว่าในการเกิดต้นต้องอาศัยไซโตไคนิน เมื่อพิจารณาถึงปริมาณ BAP ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันจะเกี่ยวข้องกับอิทธิพลของน้ำตาลด้วย จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัสในหัวข้อ 3.6 พบว่าในสูตรอาหารที่มีกลูโคสและมี BAP ความเข้มข้นต่ำ เซลของแคลลัสจะเกาะกันแน่นกว่า BAP ที่มีความเข้มข้นสูง การเกาะกันของเซลก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นด้วย ถ้าเซลเกาะกันแน่นปริมาณต้นเกิดน้อยแต่ถ้าเซลเกาะกันหลวมปริมาณต้นจะมากขึ้น (11) ดังนั้นปริมาณต้นที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลทางอ้อมจาก BAP ก็ได้ คือ ถ้า BAP มีความเข้มข้นต่ำ (1 ppm) การเกาะกันของเซลจะแน่นทำให้เกิดปริมาณต้นน้อย แต่ถ้า BAP มีความเข้มข้นสูงขึ้น (2, 4 ppm) การเกาะกันของเซลจะหลวมมากขึ้น ทำให้การเกิดต้นมีปริมาณมากขึ้นตามลำดับ หรือ BAP อาจมีอิทธิพลโดยตรงต่อการชักนำให้เกิดต้นปริมาณต่างกันก็ได้ ดังจะเห็นได้ชัดในสูตรอาหารที่ใส่ซูโครส ซึ่งแคลลัสมีลักษณะไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณต้นที่เกิดต่อปริมาณแคลลัสเท่า ๆ กันแล้ว พบว่า BAP ความเข้มข้นต่ำ (1 ppm) มีปริมาณต้นน้อยกว่า BAP ความเข้มข้นสูง (4 ppm) เนื่องจาก BAPความเข้มข้น 2 ppm มีการเพิ่มปริมาณแคลลัสมากที่สุด ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบปริมาณต้นทั้งหมดแล้ว BAP2 ppm สามารถให้ปริมาณต้นมากที่สุด ส่วนระยะเวลาในการ

เกิดต้นในอาหารที่มีกลูโค สจะเกิดต้นก่อนเมื่อ BA P มีความเข้มข้น 2 ppm และซูโครสจะเกิดต้นก่อนเมื่อ BAP มีความเข้มข้น 1 ppm แต่การเจริญเติบโตของต้นที่เกิดขึ้นในอาหารสูตรที่มีซูโครสและกลูโคสมีความเข้มข้นของ BAP เหมือนกัน คือ 1 ppm สามารถทำให้ต้นเจริญเติบโตเร็วที่สุด ดังนั้นจึงเหมาะที่จะเป็นอาหารขั้นต่อไปจากสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดต้นและปริมาณต้นมาก

3.9 ความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นและรากจากแคลลัสหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

3.9.1 สูตร MS-1D1B

สูตรนี้สามารถชักนำให้เกิดต้นและรากได้ในพันธุ์ผกามาศเพียงพันธุ์เดียวในจำนวน 3 พันธุ์ที่แคลลัสเพิ่มปริมาณได้ โดยจะเกิดต้นก่อนแล้วจึงเกิดรากในภายหลัง จึงไม่เหมาะเป็นสูตรทั่วไปในการชักนำให้เกิดต้นหรือราก

3.9.2 สูตร MS-1.5D 2B

แคลลัสพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารสูตรนี้ก็สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นและรากได้เช่นเดียวกัน แต่การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับกรรมพันธุ์ แคลลัสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นเป็นรากต้องเป็นแคลลัสที่มีอายุนานพอสมควรจึงจะเกิดการเปลี่ยนแปลง แคลลัสที่เกิดขึ้นใหม่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นได้ทันที ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปในการชักนำให้เกิดต้นและราก

3.9.3 สูตร MS-1.5D 2B + แสง

แคลลัสบางพันธุ์ เช่น พันธุ์ $ล_2$ แคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารสูตร MS-1.5D 2B ในที่มืดได้ แต่เมื่อเปลี่ยนสภาพทางฟิสิกส์บางอย่าง คือ นำมาไว้ในที่มีแสง แคลลัสซึ่งอยู่ในสภาพใกล้ตายจะสามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้น และเปลี่ยนแปลงเป็นต้นและราก เนื่องจากสูตรอาหารนี้มี MS-1.5D 2B มีปริมาณ 2, 4-D สูงมาก เสี่ยงต่อการเกิดการผ่าเหล่า และได้ทำ

การทดลองเพียงพันธุ์เดียวเท่านั้น จึงไม่เหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปในการชักนำให้เกิดต้นหรือราก

3.9.4 สูตร MS-1N1K

แคลลัสทุกพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นเป็นรากได้ทั้งที่สามารถชักนำให้ใบจากต้นอ่อนในหลอดทดลองเกิดแคลลัสและเปลี่ยนแปลงเป็นต้นและรากได้ สาเหตุอาจเกิดจากความแตกต่างทางกรรมพันธุ์เพราะพันธุ์ที่นำมาทดลองต่างกันกับพันธุ์ในหลอดทดลอง หรือปริมาณออกซินและไซโตไคนินในแคลลัสไม่เหมาะสมกับปริมาณ NAA และ Kinetin ในการชักนำให้เกิดต้นและราก

3.9.5 สูตร PCSS-S_2

สูตรอาหารนี้เหมาะสมเป็นสูตรทั่วไปในการเพิ่มปริมาณแคลลัสและยังสามารถชักนำให้เกิดต้นและรากด้วยและมีปริมาณมาก การเกิดต้นและรากของแคลลัสพันธุ์ต่าง ๆ คล้ายกับพันธุ์ผกามาศในหัวข้อ 3.8 แต่ปริมาณต้นที่เกิดขึ้นและขนาดของต้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างกันในทางกรรมพันธุ์

3.10 การสร้างคลอโรฟิล

หลังจากนำต้นอ่อนที่เลี้ยงไว้ในที่มืดมาไว้ในที่มีแสงจะเกิดสีเขียวซึ่งน่าจะเป็นคลอโรฟิลและแสงจะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลนี้ จากการศึกษาแคลลัสของพืชหลายชนิด (11) เกี่ยวกับการสร้างคลอโรฟิล สรุปได้ว่าแสงเป็นปัจจัยหนึ่งในการชักนำให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลซึ่งจะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของคลอโรพลาส (chloroplast) ซึ่งเหตุผลดังกล่าวนี้อาจเป็นเหตุผลเดียวกับการเกิดคลอโรฟิลในต้นอ่อนหน้าวัวด้วย การเกิดสีเขียวจะเกิดที่ใบก่อนอวัยวะอื่น เนื่องจากบริเวณนี้มีคลอโรพลาสปริมาณมากจึงเกิดคลอโรฟิลมากกว่าบริเวณอื่น นอกจากนี้แสงยังทำให้ใบเจริญเติบโตกางออกเป็นแผ่นใบที่สมบูรณ์

4. การย้ายมาปลูกในกระถาง

การย้ายมาปลูกในกระถางควรให้ต้นอ่อนโตพอสมควร ถ้าต้นเล็กไปจะเน่าตายได้ง่าย การล้างด้วยยาฆ่าเชื้อราก่อนมีผลดีในการป้องกันการเกิดเชื้อราในขณะที่พืชกำลังปรับตัว และวุ้นที่ล้างออกก็ไม่หมดเลยทีเดียว โอกาสที่เชื้อราจะเจริญเติบโตและเป็นอันตรายต่อต้นไม้

เครื่องปลูกที่ใช้เวอร์มิคูไลท์ดีกว่าอิฐมอญทุบละเอียด เพราะทำให้ต้นอ่อนที่ปลูกในระยะแรกตายน้อยกว่า แต่ข้อเสียคือเมื่อต้นอ่อนตั้งตัวแล้วต้องย้ายไปปลูกในเครื่องปลูกอื่นต่อไป ส่วนต้นอ่อนในอิฐมอญทุบละเอียดเมื่อตั้งตัวแล้วสามารถใช้อิฐมอญทุบละเอียดเป็นเครื่องปลูกต่อไปได้จึงไม่ต้องย้ายต้นอ่อนอีกครั้ง แต่อย่างไรก็ดีต้นอ่อนของหน้าวัวก็สามารถปลูกได้ทั้งในเวอร์มิคูไลท์และอิฐมอญทุบละเอียด