บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โป๊ยเซียนนับเป็นไม้ดอกที่ได้รับความนิยมและเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ดอกไม้ประดับในปัจจุบัน เนื่องจากโป๊ยเซียนเป็นไม้กระถางที่มีดอกงดงามมาก อย่างไรก็ตามการปลูกเลี้ยงโป๊ยเซียนให้มีต้นที่สมบูรณ์ แข็งแรง มีดอกที่สวยงามตามต้องการนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ปัจจุบันจึงมีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพมาใช้ในการปลูกเลี้ยงโป๊ยเซียน (อุไร, 2540)การผสมพันธุ์โป๊ยเซียนเพื่อให้ได้พันธุ์ลูกผสมใหม่ๆ ที่รวมลักษณะที่ดีต่างๆเอาไว้ เช่น ดอกใหญ่ สีสวย สด และบานทนนั้น ปกติจะใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการเสียบยอด ปักชำ และเพาะเมล็ด แต่ก็พบว่าต้องใช้เวลานาน ลักษณะดอกที่ได้จะมีขนาดเล็ก และมีดอกหลายชั้นซึ่งไม่เป็นที่นิยม นอกจากนี้ปัญหาโรคของโป๊ยเซียนที่ถูกทำลายจากเชื้อต่างๆ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และแมลงที่เป็นภัย คือ หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว ก็เป็นปัญหาที่สำคัญ (ไชยา-ลาวัลย์, 2534) เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาด การขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์โป๊ยเซียนจึงเป็นสิ่งจำเป็น

จากความก้าวหน้าทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดีและรวดเร็วขึ้นด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการชักนำให้โป๊ยเซียนเกิดเป็นต้นโดยผ่านแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมซึ่งประกอบไปด้วย ออกซิน และไซโทไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นอกจากนี้วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ก็เป็นวิธีที่ดีอีกวิธีหนึ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชจะทำให้ได้พันธุ์พืชใหม่ๆ โดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุ-วิศวกรรม (genetic engineering) มาประยุกต์ใช้กับโพรโทพลาสต์ได้อีกด้วย เช่น การตัดต่อยีน การนำยีนที่ต้องการใส่เข้าไปในโพรโทพลาสต์โดยวิธีการต่างๆ เช่น micro injection แล้วนำโพรโท-พลาสต์ไปเพาะเลี้ยง เมื่อได้ต้นใหม่ขึ้นมา ต้นที่ได้ก็จะแสดงลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิมโดยมีลักษณะตามที่ต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคการรวมตัวกันของโพรโทพลาสต์ (protoplast fusion) โดยใช้สารเคมี เช่น PEG (Polyetylene glycol) หรือใช้กระแสไฟฟ้า (Dixon, 1985)

ดังนั้นการศึกษาการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโป๊ยเซียนนับเป็นก้าวแรกของการนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์และศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียนเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์และสร้างพันธุ์โป๊ยเซียนพันธุ์ใหม่ๆ เพราะคาดว่าใน

อนาคตโป๊ยเซียนจะเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถนำมาเป็นไม้ตัดดอกขายได้ดังเช่นกล้วยไม้ เนื่องจากดอกโป๊ยเซียนมีสีที่สวย สด และบานทน

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

โป๊ยเซียนเป็นพืชในวงศ์ ยูฟอร์บิเอซิอี (Family Euphorbiaceae) ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่มาก โดยทั่วๆไปมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม พบอยู่ในหลายประเทศในเขตร้อน มีไม่ต่ำกว่า 300 สกุล (genus) แต่ละสกุล มีราว 6,550-7,650 ชนิด โป๊ยเซียนจัดอยู่ในสกุล ยูฟอร์เบีย (*Euphorbia*) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Euphorbia milii* Desmoulin และมีชื่อสามัญว่า Crown of Thorns ไม้ที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันนี้มีประมาณ 2,000 ชนิด รวมทั้งพวกสลัดได กระบองเพชร น้ำนมราชสีห์ และคริสต์มาส ลักษณะสำคัญของพืชในสกุลนี้คือ ลำต้นอวบ อมน้ำ มียางสีขาวซึ่งเป็นพิษ หากถูกผิวหนังที่เป็นแผลหรือเข้าตาจะเป็นอันตรายได้ บางชนิดมีหนามแหลมคม เป็นพืชที่ทนความแห้งแล้งได้ดี (ประเสริฐ, 2537) โป๊ยเซียน มีชื่อภาษาไทยว่า มงกุฎหนาม และมีชื่อเรียกหลายอย่างเช่น ว่านเข็มพญาอินทร์ พระเจ้ารอบโลก ระวิงระไว (เชียงใหม่) ว่านมุงเมือง ไม้รับแขก (ไชยา–ลาวัลย์, 2534) โป๊ยเซียนมีถิ่นกำเนิดในแถบเกาะมาดากัสการ์ (มาลากาซี) โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านตะวันตกของเกาะมีพันธุ์แปลกๆ หลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีในป่าแอฟริกาเหนือ เป็นไม้ในเขตร้อนแต่สามารถพบได้ในแถบอบอุ่น แถบแอฟริกานิยมปลูกกันตามบ้านเรือนทั่วไปและมักปลูกกันในกระถาง แม้ว่าโป๊ยเซียนมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแอฟริกาก็ตาม แต่โป๊ยเซียนที่ปลูกในเมืองไทยนั้นเชื่อว่ามาจากประเทศจีน โดยพ่อค้าจีนเป็นผู้นำเข้ามาปลูกกว่า 100 ปีแล้ว ซึ่งชาวจีนเชื่อกันว่า โป๊ยเซียนหมายถึง ผู้วิเศษทั้งแปดของจีน (อุไร, 2540)

พันธุ์โป๊ยเซียน

โป๊ยเซียนที่ปลูกกันอยู่ในประเทศไทยในปัจจุบัน เป็นพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งมีหลายชนิด ส่วนใหญ่คือ *Euphorbia milii* Desmoulin นอกจากนี้ก็มีชนิดอื่น ๆ อีกคือ *E. decaryi* Quill *E. didieroides* M.Denis *E. duranii* Ursch et Leandri *E. quillanminiaha* Boit *E. horombensis* Ursch et Leandri *E. isaloensis* Drake *E. leandriana* P.Bolt และ *E. lophogona* Lam

สำหรับ *E. milii* Desmoulin สามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีกเป็น *E. milii* var. bevilanienesis *E. milii* var. bevilaniensis f. rubrostriata *E. milii* var. breohi *E. milii* var. hislopii *E. milii* var. imperatae *E. milii* var. milii *E. milii* var. splendens *E.milii* var. splendens f. platyacantha *E. milii* var. tulearensis และ *E. milii* var. vulcanii (อุไร, 2540)

นอกจากนี้ยังมีพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับโป๊ยเซียนซึ่งจัดเป็นพืชสมุนไพรไทยประเภทไม้พุ่มยืน เช่น ขันทองพยาบาท *(Suregada multiflorum* Baill.) ลิ้นมังกร *(Sauropus changiana* S.Y. Hu) ว่านธรณีสาร *(Phyllanthus pulcher* Wall.Ex Muell. Arg.) ละหุ่ง (*Hura crepitans* Linn.) มะกา *(Bridelia ovata* Decne.) ส้มเช้า *(Euphorbia ligularia* Roxb.) มะขามป้อม *(Phyllanthus emblica* Linn.) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus caroliniensis* Linn.) พญาไร้ใบ *(Euphorbia tirucalli* Linn.) ไคร้หางนาค *(Phyllanthus taxodiifolius* Beille.) และเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) ซึ่งพบว่า เปล้าน้อยสามารถนำมาสกัดตัวยาเปลาโนทอล มีสรรพคุณรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ นอกจากพืชสมุนไพรแล้วยังมีพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่อยู่ในวงศ์เดียวกับโป๊ยเซียน คือ มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) และยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นต้น

การขยายพันธุ์

โดยธรรมชาติการขยายพันธุ์โป๊ยเซียนสามารถทำได้ดังนี้ คือ (ไชยา – ลาวัลย์, 2534)

1. การเพาะเมล็ด

เป็นการขยายพันธุ์เมล็ดที่ได้จากต้นที่ทำการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้โป๊ยเซียนต้นใหม่ซึ่งเรียกกันว่า ลูกไม้ หรือลูกผสมใหม่ที่มีลำต้น ดอก ก้านส่งดอก หนาม ใบ และลักษณะต่างๆ ที่อาจจะดีกว่าต้นเดิม การเพาะเมล็ดโป๊ยเซียนนี้ควรเพาะในกะบะเพาะโดยใช้วัสดุที่เป็นดินปนทรายหยาบปนแกลบดำที่จืดแล้ว หรือทรายผสมขุยมะพร้าวอย่างใดอย่างหนึ่งก็เพาะเมล็ดได้ เวลาเพาะเมล็ดไม่ควรวางให้ลึกจากดินมากนัก ไม่เกิน 1 $^{1}/_{2}$ เซนติเมตร รดน้ำพอควรแล้ววางไว้ในที่มีแสงแดดส่องรำไร ประมาณ 2 อาทิตย์ จะมีต้นโป๊ยเซียนเล็กๆ งอกขึ้นมาเมื่อมีใบประมาณ 5 – 7 ใบ จึงแยกไปปลูกได้โดยใช้กระถางเล็กๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว หรือ 5 นิ้ว สำหรับดินปลูกควรเป็นดินร่วนผสมแกลบดิน เปลือกมะพร้าวสับและปุ๋ยคอกคลุกเคล้าให้กระจายตัวเข้ากันดี ไม่ควรใช้ดินเหนียวปลูกเพราะดินเหนียวจะระบายน้ำไม่ดีทำให้เกิดรากเน่าได้ ส่วนการให้ปุ๋ยโป๊ยเซียนใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 16 – 16 – 16 เดือนละ 1 ครั้งโดยโรยรอบๆ กระถาง อัตราปุ๋ย 1 ช้อนชา ต่อกระถาง แล้วรดน้ำตาม หรือ นำปุ๋ยผสมในอัตรา 1 ช้อนแกงต่อน้ำ 1 ปี๊บ แล้วรดก็ได้ เมื่อปลูกได้ประมาณ 5 เดือน ก็คัดเอาเฉพาะต้นโป๊ยเซียนที่มีลำต้น อวบ ใบใหญ่ ใบกว้าง หนามโต ไปปลูกในกระถางตามต้องการ หรือถ้าจะให้ได้ผลจริงๆ จะต้องใช้เวลาประมาณ 8 เดือน ให้ออกดอกเสียก่อน จึงทำการคัดแยกเฉพาะต้นที่มีสีดอกที่ต้องการ

2. การปักชำกิ่ง

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะได้ต้นโป๊ยเซียนต้นใหม่ที่มีคุณลักษณะเหมือนต้นแม่เดิมทุกประการ ไม่ควรปักชำเมื่ออากาศร้อนจัดและมีฝนหนักควรทำการปักชำในฤดูหนาวประมาณเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคมจะได้ผลดีที่สุด สำหรับการปักชำควรเลือกกิ่งแขนงที่แข็งแรงไม่แก่หรืออ่อนเกินไปเพราะถ้าใช้กิ่งแก่จะออกรากยากหรือถ้ากิ่งอ่อนจะเน่าได้ง่าย การตัดต้องให้ชิดลำต้นและควรใช้มีดคมๆสะอาดเป็นพิเศษทำการตัด ถ้าแผลที่ตัดไม่เรียบควรใช้มีดคมๆปาดให้เรียบปล่อยทิ้งไว้ให้ยางแห้งเสียก่อน เมื่อยางแห้งแล้วก็ทารอยแผลที่ตัดด้วยปูนแดง หรือจะใช้วิธีการล้างด้วยน้ำที่สะอาดที่ปลายรอยตัดออกให้หมดก็ได้ นำด้านที่ตัดนี้ไปจุ่มยาเร่งรากอาจจะใช้เซราดิกเบอร์ 1 หรือจะเป็นเบอร์ 2 ก็ได้ เมื่อจุ่มยาแล้วทิ้งไว้สักครู่จึงนำไปปักชำ ซึ่งวัสดุปักชำนี้ จะใช้แกลบดำจืดสนิทผสมกับขุยมะพร้าว และทรายหยาบเล็กน้อย หรือใช้แกลบดำอย่างเดียวก็ได้ ปักชำลึกประมาณ 1 – 1 $^{1}/_{2}$ นิ้ว และรดน้ำให้ชุ่ม ถ้าจะปักชำจำนวนมากๆ ควรทำเป็นกะบะใหญ่ๆ หรือทำเป็นแปลงในเรือนเพาะชำ ข้อสำคัญที่ตั้งกะบะปักชำหรือเรือนเพาะชำจะต้องอยู่ในที่รำไร มีแสงแดดส่องพอสมควร และพยายามหลีกเลี่ยงอย่าให้ถูกฝนได้ หลังจากนั้นประมาณ 3 – 4 วัน ฉีดพ่นน้ำที่ใบเล็กน้อยอย่าให้ชุ่มนัก หากที่ปักชำแห้งก็ให้ใช้ฝักบัวฝอยละเอียดรด โดยผสมยาฆ่าเชื้อรากับน้ำรดทั้งต้นและทำเช่นนี้ทุกครั้งที่ปักชำแห้ง ประมาณ 45 วัน กิ่งที่ปักชำจะออกรากและแตกใบอ่อน เมื่อกิ่งชำเจริญแข็งแรงดีแล้วก็ย้ายไปปลูกในกระถางได้

3. การเสียบยอด

เป็นอีกวิธีหนึ่งของการขยายพันธุ์โดยเลือกกิ่งพันธุ์โป๊ยเซียนที่จะใช้เสียบยอดให้มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกับกิ่งของต้นพันธุ์ ตัดมาแล้วบากที่ต้นแม่ให้เป็นปากฉลาม นำกิ่งที่จะเสียบมาเสี้ยมปลายให้แบนเรียวเสียบเข้ากับต้นแม่ แล้วใช้เทปปันรอบให้แน่น หรืออาจจะใช้สลัดไดเป็นต้นตอ แล้วนำกิ่งโป๊ยเซียนมาเสียบยอด ปรากฏว่าได้ผลดีเช่นกัน

4. การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นอกจากการขยายพันธุ์โป๊ยเซียนโดยวิธีธรรมชาติแล้วนั้น อาจจะขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโพรโท-พลาสต์ของโป๊ยเซียน จะมีการศึกษาอยู่บ้างในพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน เช่น ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) กระบองเพชร (*Euphorbia esula* L.) *Euphorbia characias* L. subsp. *Characias* เปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) และลูกใต้ใบ (*Phyllanthus caroliniensis* Linn.) ซึ่งมีรายละเอียดของการศึกษาดังนี้

สมปอง และ อรุณี (2535) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆของต้นกล้ายางพารา (*Hevea brasiliensis*) พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ GT1 และพันธุ์ PB5/51 บนอาหารสูตร MS ร่วมด้วย NAA และ BA หรือ BA เพียงอย่างเดียว ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำยอดรวม พบว่าชิ้นส่วนปล้องให้ยอดเพียงยอดเดียวในอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ปลายยอดของยางทั้ง 3 พันธุ์ สามารถชักนำยอดรวมได้ในอาหารที่เติม BA เข้มข้น 4.50 - 5.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนข้อสามารถชักนำยอดรวมจากยางทั้ง 3 พันธุ์ ได้เช่นกัน เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 3.37 - 4.50 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำรากจากยอดรวมในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดยางทั้ง 3 พันธุ์สร้างรากได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการตัดส่วนยอดมาจุ่มแช่ในสารละลายของ NAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นเท่ากัน 5 ระดับ เป็นเวลาต่างๆ แล้วย้ายแต่ละยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสารละลายที่มี IBA และ NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน สามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พันธุ์ยางและระดับความเข้มข้นของ IBA และ NAA ไม่มีผลต่อความสามารถในการชักนำราก แต่ระยะเวลาการจุ่มแช่ยอดเป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการชักนำรากเพิ่มขึ้น

สมปอง และ เมฆา (2536) ศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติคเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเหนี่ยวนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส การทวีจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และพัฒนาการของโซมาติคเอ็มบริโอในระยะต่อมาเป็นไปได้ดี การงอกของเอ็มบริออยด์ทำได้โดยการย้าย เอ็มบริออยด์ในระยะสร้างใบเลี้ยงไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งเติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันปราศจากผงถ่านเติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

เพชรรัตน์ และคณะ (2546) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) โดยใช้ชิ้นส่วนของปล้องนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดยอดเปล้าน้อยจำนวนมาก

Biesboer และคณะ (1982) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของ *Euphorbia pulcherrima* โดยใช้ชิ้นส่วนของลำต้น ขนาด 1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2iP 1.0 x 10^{-5} โมลาร์ NAA 5.0 x 10^{-7} โมลาร์ Kinetin 5.1 x 10^{-6} โมลาร์ IAA 6.0 x 10^{-5} โมลาร์

พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์จะมีแคลลัสเกิดขึ้น หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุกๆ 28 วัน

Chagvardieff และคณะ (1988) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Euphorbia characias* L. โดยนำแคลลัสปริมาณเริ่มต้น 3 มิลลิกรัมไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 97 มิลลิลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบของอาหารคือ น้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร และมีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ให้แสง 18 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ เซลล์แขวนลอยมีอัตราความมีชีวิต เท่ากับ 85–90 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะทำการย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่ทุกๆ 14 วัน

Ferreira และคณะ (1989) ชักนำแคลลัสจากใบของ *Euphorbia characias* L. subsp. *Characias* โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 ดัดแปลงประกอบด้วย เคซีอีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate) 1 กรัมต่อลิตร กรดแอสคอบิค (ascorbic acid) 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ benzyladenine (BA) 0.0 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4 – D 0.0 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในที่มืด 8 ชั่วโมง และที่สว่าง 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 2 – 3 สัปดาห์เกิดแคลลัสสีเขียวในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4 –D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

Souissi และคณะ (1997) ชักนำแคลลัสจากใบและลำต้นของต้นกระบองเพชร (*Euphorbia esula* L.) โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ดัดแปลง ประกอบด้วย 2, 4 –D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พบว่า เกิดแคลลัสและทำการย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่ทุก ๆ 3 เดือน

Catapan และคณะ (2000) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus caroliniensis*) โดยใช้ข้อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้น 0 1.25 2.5 และ 5.0 ไมโครโมล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 50 วัน ในอาหารสูตรที่มี Kinetin 5 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด คือ 5.05 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช จากนั้นนำยอดไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA IBA และ IAA ในระดับความเข้มข้น 0 1.25 2.5 และ 5.0 ไมโครโมล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 วัน ที่ระดับความเข้มข้น NAA 1.25 ไมโครโมล และ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.25 - 5.0 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ 3.0 - 4.0 รากต่อชิ้นส่วนพืช อัตราการเกิดราก เท่ากับ 80 - 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่มี NAA ระดับความเข้มข้น 1.25 - 5.0 ไมโครโมล สามารถชักนำ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ 3.0 - 4.0 รากต่อชิ้นส่วนพืช อัตราการเกิดราก เท่ากับ 80 -

100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่มี NAA ระดับความเข้มข้น 1.25 - 5.0 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 2.0-2.6 รากต่อชิ้นส่วนพืช อัตราการเกิดรากเท่ากับ 72- 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อนำต้นลูกใต้ใบ ไปเพาะเลี้ยงในเรือนอนุบาลต้นกล้า พบว่ามีอัตรารอดเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนั้นประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ จะมีดอกเกิดขึ้น

นอกจากนี้ Catapan และคณะ (2000) ยังได้ศึกษาการเกิดแคลลัสของต้นลูกใต้ใบ โดยใช้ข้อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA 2 ,4 -D IAA และ IBAในระดับความเข้มข้นต่างๆเหล่านี้ คือ 0 1.25 2.5 5.0 10 20 และ 40 ไมโครโมล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วันในสูตรอาหารที่มี NAA และ 2,4 - D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยในสูตรอาหารที่มี 2,4 - D 5.0 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด มีน้ำหนักสดเท่ากับ 718 มิลลิกรัม รองลงมาคือ 2,4 -D 2.5 ไมโครโมล และ 1.25 ไมโครโมล (500 มิลลิกรัม และ 300 มิลลิกรัม ตามลำดับ) ส่วนในสูตรอาหารที่มี NAA 5 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด มีน้ำหนักสดเท่ากับ 270 มิลลิกรัม รองลงมาคือ NAA 2.5 ไมโครโมล และ NAA 1.25 ไมโครโมล (210 มิลลิกรัม และ 80 มิลลิกรัม ตามลำดับ)

Catapan และคณะ (2002) ศึกษาผลของออกซิน และ ไซโทไคนิน ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นลูกใต้ใบ โดยใช้ข้อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA kinetin 2iP 2,4-D IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1.25 2.5 และ 5.0 ไมโครโมล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน ในอาหารสูตรที่มี IBA 5.0 ไมโครโมล เกิดแคลลัสดีที่สุด แคลลัสมีน้ำหนักสดเท่ากับ 447 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ในสูตรอาหารที่มี NAA 5.0 ไมโครโมล (198 มิลลิกรัม) 2iP 2.5 ไมโครโมล (188 มิลลิกรัม) 2,4-D 5.0 ไมโครโมล (147 มิลลิกรัม) ตามลำดับ

Te-chato และ Chartikul (1993) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดของยางพารา โดยนำฝักอ่อนยางพาราอายุต่างๆ มาตัดแยกเมล็ดอ่อนภายในออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ผลอ่อนอายุ 8 สัปดาห์ ให้แคลลัสได้ดีที่สุด และการเก็บฝักอ่อนทุกพันธุ์แต่ละอายุในที่เย็นเป็นเวลานานมีผลทำให้การสร้างแคลลัสลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการชักนำเซลล์ซัสเพนชัน และ เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน โดยการย้ายแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สูตรอาหาร Nitsch และ Nitsch (NN) ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นเดียวกันสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้ แต่ไม่สามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้

Carron และ Enjalric (1982) ชักนำแคลลัสจากข้อของลำต้นอ่อนของยางพารา ที่เพาะเลี้ยงในเรือนอนุบาลต้นกล้าสายพันธุ์ GT1 PB5151 และ PRIM 623 โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย β- napthoxyacetic acid (NOA) 2 พีพีเอ็ม และ 6- benezylaminopurine (BAP) 2 พีพีเอ็มหลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปลงในอาหารที่มี 4- [3-indoly]butyric acid (IBA) 5 พีพีเอ็ม α- napthaleneacetic acid (NAA) 5 พีพีเอ็ม และเติมผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดต้นและชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

Ferriere และ Carron (1989) ศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส โดยใช้เมล็ดของยางพาราเลี้ยงบนอาหารสูตร MH1 (Medium for Hevea) ดัดแปลง และ สูตร MH3 ซึ่งสูตร MH1 ดัดแปลงประกอบด้วย ซูโครส 80 กรัมต่อลิตร 3,4- dichlorophenoxyacetic acid (3,4 – D) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ส่วน สูตร MH3 ประกอบด้วย ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร NOA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจาก 15 วัน ในอาหารสูตร MH3 จะมีแคลลัสเกิดขึ้น ส่วนสูตร MH1 ดัดแปลงจะเกิดแคลลัสหลังจาก 40 วัน

Auboiron และคณะ (1990) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดของยางพาราโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH1 และ MH3 ซึ่ง MH1 ประกอบด้วย ซูโครส 233 มิลลิโมล 2,4 – D 9 ไมโครโมล และ BAP 9 ไมโครโมล ส่วน MH3 ประกอบด้วย ซูโครส 58 มิลลิโมล 2,4 – D 2 ไมโครโมล และ BAP 2 ไมโครโมล พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 40 วัน สูตรอาหาร MH1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตร MH3 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้ มีสีเหลือง เรียบ และเกาะกันหลวมๆ

Ferriere และคณะ (1992)ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดของยางพาราบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ซึ่งเติม $AgNo_3$ 29.4 ไมโครโมล abscisic acid (ABA) 0.0 – 0.05 ไมโครโมล 3,4 – D 1.35 - 3.0 ไมโครโมล และ BA 1.35 - 3.0 ไมโครโมล โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด พบว่าหลังจาก 4 สัปดาห์จะมีแคลลัสเกิดขึ้นตรงชิ้นส่วนของเมล็ดที่โดนตัด และหลังจากนั้นจะทำการย้ายเลี้ยงทุกๆ 25 วัน

Montoro และคณะ (1993) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของยางพารา 5 สายพันธุ์ คือ PR107 PRIM600 PB260 PB235 และGT1โดยใช้เมล็ดเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส 351ไมโครโมล แคลเซียม 12 ไมโครโมล 3 ,4 – D 4.5 ไมโครโมล และไคเนติน 0.45 ไมโครโมล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 25 วัน สายพันธุ์ PR107 และ PRIM600 เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ สีขาว ส่วนสายพันธุ์ PB 260 PB 235 และ GT 1 แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะแบบ คอมแพค สีขาว หลังจากนั้นจะทำการย้ายเลี้ยงลงในอาหารใหม่ทุกๆ 50 วัน

Arokiaraj และคณะ (1994) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของยางพารา โดยใช้อับเรณู (anther) เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB ดัดแปลงซึ่งเติม อะดีนีนซัลเฟต (adenine sulphate) 100 ไมโครโมล และ ไลซีน (lysine) 620 ไมโครโมล พบว่าหลังจาก 4 สัปดาห์จะมีแคลลัสเกิดขึ้น

Veisseire และคณะ (1994) ศึกษาการชักนำแคลลัสของยางพาราโดยใช้เมล็ดพันธุ์ PB235 นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MH1 ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 234 มิลลิโมล BA 9 มิลลิโมล และ 3,4 – D 9 ไมโครโมล วุ้น 6.8 กรัมต่อลิตรโดยบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีแคลลัสเกิดขึ้น ลักษณะของแคลลัสที่ได้มีสีขาวและเกาะกันหลวมๆ

Blance และคณะ (1999) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของยางพาราโดยใช้เมล็ดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MH ประกอบด้วย แคลเซียมคลอไรด์ 6 ไมโครโมล $AgNo_3$ 30 ไมโครโมล 3,4 – D 1.34 ไมโครโมล BAP 1.34 ไมโครโมล ABA (abscisic acid) 0.5 ไมโครโมล ซูโครส 234 ไมโครโมล และ วุ้นไฟต้าเจล 2.3 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 โดยเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 150 x 25 มิลลิเมตร พบว่าหลังจาก 28 วันจะมีแคลลัสเกิดขึ้น ลักษณะของแคลลัสจะมีสีขาวและเกาะกันหลวมๆ

Martre และคณะ (2001) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดของยางพาราโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MH1 ประกอบด้วย ซูโครส 234 มิลลิโมล แคลเซียมคลอไรด์ 9 มิลลิโมล $AgNO_3$ 30 ไมโครโมล 3, 4 –D 1.34 ไมโครโมล BA 1.34 ไมโครโมล absciscic acid 0.5 ไมโครโมล และวุ้นไฟต้าเจล 2.3 กรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 20 วัน เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ จากนั้นจะทำการย้ายแคลลัสลงในอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์

Biggs และคณะ (1986) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) โดยใช้เมล็ดนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่มี IBA 1.23 ไมโครโมล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 2–3 วัน เมล็ดจะเจริญต่อไปเป็นรากและเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 5-7 วัน จะมียอดสีเขียวเกิดขึ้น หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ ยอดจะมีการขยายขนาดให้ยาวขึ้น และมีข้อ 2–3 ข้อ เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 1 เดือน จะย้ายต้นกล้าลงปลูกในดินต่อไป

Stamp และ Henshaw (1987) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลังโดยใช้ชิ้นส่วนของใบเลี้ยง นำเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2, 4 –dichlorophenoxyacetic acid (2,4 – D) 2-8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 3–4 วัน ใบเลี้ยงจะมีลักษณะ บวม และแวววาว และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24–30 วัน พบว่าเกิดแคลลัสสีเขียวอ่อน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ที่มี 2,4–D 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 40 วัน แคลลัสจะพัฒนาต่อไปเป็นยอดและรากที่สมบูรณ์ หลังจากนั้น

นำต้นมันสำปะหลังไปอนุบาลในเวอร์มิคูไลต์เป็นเวลา 40 วัน พบว่าต้นมันสำปะหลังมีใบที่สมบูรณ์ แข็งแรง และมีอัตรารอด 68 เปอร์เซ็นต์

Raemakers และคณะ (1993) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลัง 2 สายพันธุ์ คือ Tjurug และ M.col 22 โดยใช้ใบอ่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4 – D 0.5 1 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ Tjurug และ M.col 22 เกิดแคลลัสดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4 – D 1 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (29 เปอร์เซ็นต์ และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) จากนั้นชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4 –D 1.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BAP 0.1 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ zeatin ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.4 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สายพันธุ์ M.col 22 เกิดยอดได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4 –D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BAP 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการเกิดยอดเท่ากับ 10.2 ยอดต่อแคลลัส ส่วนสายพันธุ์ Tjurug พบว่าทั้งในอาหารที่มี 2,4-D zeatin และ BAP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีอัตราการเกิดยอดเท่ากับ 0.1– 0.2 ยอดต่อแคลลัส จากนั้นจะนำยอดไปชักนำให้เกิดเป็นรากในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

Konan และคณะ (1994) ศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสของมันสำปะหลัง 5 สายพันธุ์ คือ TMS30395 TMS30555 Tiegba84701 และ 85621โดยใบเลี้ยงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีออกซิน 4 ชนิดคือ 2,4–D methyl-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) P-chlorophenoxyacetic acid (PCPA) 2,4,5- trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5 T) ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บนอาหารสูตรที่มี 2,4 –D สายพันธุ์ TMS 30395 สามารถชักนำให้เกิด proembryogenic ได้ดีที่สุด คือ 44.4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะย้ายลงอาหารใหม่ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ gibberellic acid (GA_3) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ 25 เปอร์เซ็นต์

Sofiari และคณะ (1997) ศึกษาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสจากใบอ่อนของมันสำปะหลังโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BM (Basal medium) ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D 4.5 – 36.2 ไมโครโมล และ NAA 0.5 – 215.1 ไมโครโมล หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน จะทำการย้ายเลี้ยงไปบนอาหารแข็งสูตรที่มี BA 0.4 ไมโครโมล พบว่าสามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 40 วัน

Mussio และคณะ (1998) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลังโดยใช้ใบนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4 –D ในระดับความเข้มข้น 18 27 และ 36 ไมโครโมล

พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 2,4 – D 18 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด คือ 30.4 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะแคลลัสมีสีขาว และเกาะกันหลวมๆ หลังจากนั้นจะย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4 –D 0.045 ไมโครโมล ร่วมด้วย zeatin 4.5 14 และ 23 ไมโครโมล พบว่าหลังจาก 1 สัปดาห์ แคลลัสจะเกิดเป็นปุ่มสีเขียวรอบๆ แคลลัส จากนั้นปุ่มสีเขียวจะพัฒนาต่อไปเป็นยอดซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของ zeatin 23 ไมโครโมล สามารถชักนำ ให้เกิดเป็นยอดได้สูงสุด คือ 4.8 ยอดต่อแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถให้จำนวนยอดรวมเท่ากับ 121 ยอด จากนั้นชักนำยอดให้เกิดเป็นรากบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA 0.54 ไมโครโมล และ ผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์

Zok และคณะ (1998) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลังโดยใช้ตา นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นมันสำปะหลังได้ 80 เปอร์เซ็นต์

Fregene และคณะ (1999) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลังโดยใช้เมล็ดนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจาการเพาะเลี้ยง 30 วัน เมล็ดจะงอกออกมาเป็นต้น ซึ่งอัตราการงอกเท่ากับ 32 เปอร์เซ็นต์ และมีรากเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นด้วย

Groll และคณะ (2001) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังสายพันธุ์ M.col 22 โดยใช้ใบนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4 –D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร piclorram 12 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เกิดแคลลัสที่มีลักษณะสีขาวเหลือง และเกาะกันหลวมๆ จากนั้นจะย้ายแคลลัสลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์

Zhang และคณะ (2001) ศึกษาผลของ $AgNO_3$ ต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นของมันสำปะหลังโดยใช้ใบเลี้ยงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0 1 2 4 8 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจาการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้น $AgNO_3$ 4-12 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 80- 88 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็พบว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวจะยับยั้งการเกิดแคลลัส

Ma และ Xu (2002) ศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นยอดของมันสำปะหลังสายพันธุ์ Nanzhi 188 โดยใช้ชิ้นส่วนของตาข้างนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4–D 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน มีแคลลัสเกิดขึ้น ลักษณะของแคลลัส

จะเกาะกันหลวมๆ หลังจากนั้นจะย้ายแคลลัสลงบนอาหาร ใหม่ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งก็พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ 26.1 ยอดต่อแคลลัส

5. การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

โพรโทพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ไม่มีผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์ถูกเอาออกโดยวิธีกลหรือโดยไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) (Cocking , 1972) และในการแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่เหมาะสม ได้แก่ แรงดันออสโมติก เอนไซม์และความเข้มข้น แหล่งโพรโทพลาสต์ การทำโพรโทพลาสต์ให้สะอาด วิธีการเพาะเลี้ยง ความหนาแน่นโพรโทพลาสต์ที่ใช้เพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์และสารควบคุมการเจริญเติบโต การตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ เป็นต้น ตัวอย่างการแยกโพร-โทพลาสต์ในพืชชนิดอื่นๆ เช่น

Cocking (1972) เป็นคนแรกที่คิดหาวิธีการแยกเอาโพรโทพลาสต์ออกมา โดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส มาย่อยเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช โดยย่อยรากของต้นกล้ามะเขือเทศ

Shahin และ Shepard (1980) ทำการแยกโพรโทพลาสต์จากใบของมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์ มาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลส อาร์เทน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ ซูโครส 0.3 โมลาร์ พีเอช 5.7 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด เท่ากับ 5.6×10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิตเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่มี BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ แมนนิทอล 2.46 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความหนาแน่นเริ่มต้น $1.0 - 3.0 \times 10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-12 วัน โพรโทพลาสต์เริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ และมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น หลังจากนั้น 3 สัปดาห์เซลล์จะเกิดเป็นโคโลนี จากนั้นจะทำการย้ายลงอาหารใหม่เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งพบว่าหลังจาก 2 สัปดาห์จะได้แคลลัสที่มีสีเขียว หลังจากนั้นชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดในอาหารสูตร MS ที่มี BAP 0.045 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และGA_3 0.014 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำยอดไปชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่มี GA_3 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

Wilson และ Power (1989) ทำการแยกโพรโทพลาสต์จากลำต้นของยางพารา โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ และ อีสทิดีน (histidine) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะใช้ลำต้นของยางพารา 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นบ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 2.0×10^5

โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวและเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร K8P พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โพรโทพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ ความมีชีวิต 70 – 97 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากวันที่ 8 โพรโทพลาสต์เริ่มตาย และความมีชีวิตเริ่มลดลง เนื่องจาก toxic compound ของโพรโทพลาสต์เองที่ปล่อยออกมา

Cazaux และ Auzac (1995) เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของยางพารา โดยใช้ลำต้นอ่อนของยางพารา มาทำการแยกโพรโทพลาสต์ในเอนไซม์เซลลูเลส อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอ-โรไซม์ อาร์เทน 0.1 เปอร์เซ็นต์ MES 3 มิลลิโมล BSA (bovine serum albumin) 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WPM (Woody Plant Medium) พบว่า หลังจาก 24 ชั่วโมง โพรโทพลาสต์เริ่มสร้างผนังเซลล์ และหลังจากนั้นอีก 1 วัน โพรโทพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์ จาก 1 เป็น 2 เซลล์ แต่ไม่พบการสร้างเป็นโคโลนี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโป๊ยเซียน
2. ศึกษาวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน