บทที่ 4

บทวิจารณ์

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว

ขั้นตอนแรกที่สำคัญที่จะนำไปสู่ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ต้องการนำมาเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อ การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืชจะได้ผลดีเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับการเตรียมชิ้นส่วนพืช การเลือกใช้สารเคมี ความเข้มข้นของสารเคมี และเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ สารเคมีที่เคยมีรายงานว่าใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน เช่น เมอร์คิวริกคลอไรด์ (Rajesh และคณะ, 2003) โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Teixeira และคณะ, 1993) คลอรอกซ์ (วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน, 2332 ; Te-chato, 1993) การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวให้ได้ผลเต็มที่นั้น อาจทำได้โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเอนโดสเปิร์มก่อน จากนั้นแซะเอ็มบริโอออกจากส่วนเอนโดสเปิร์ม และฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งก่อนนำไปเพาะเลี้ยง แต่ในทางปฏิบัติแล้วมักเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง เช่น นำส่วนเอนโดสเปิร์มที่มีเอ็มบริโออยู่ภายในมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน จากนั้นแซะเอ็มบริโอออกมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เตรียมไว้ (Rohani and Paranjothy, 1985; Alang and Fadzillah, 1986) วิธีนี้สามารถใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงและเวลาที่ยาวนานได้ เพราะเอ็มบริโอที่อยู่ภายในไม่ได้สัมผัสกับสารฟอกฆ่าเชื้อโดยตรง หรืออีกวิธี คือ แซะเอ็มบริโอออกจากเอนโดสเปิร์ม แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (Hodel, 1977) วิธีนี้สารที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อจะสัมผัสกับเอ็มบริโอโดยตรง จึงไม่สามารถใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงและเวลาที่ยาวนานได้ เพราะอาจกระทบต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอได้ อย่างไรก็ตามการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอส่วนใหญ่จะเลือกใช้วิธีแรก เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ของเนื้อเยื่อที่ไม่ปนเปื้อนสูง และไม่กระทบต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโออีกด้วย เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ มีการเตรียมเมล็ดปาล์มก่อนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว คือ การตัดเอาส่วนเนื้อปาล์มออก จากนั้นเอาเมล็ดปาล์มไปอบที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การอบนอกจากจะทำให้เมล็ดปาล์มแห้งเพื่อสะดวกในการทุบเอาชั้นกะลาออกแล้วยังเป็นการทำลายการพักตัวของเมล็ดปาล์มน้ำมันอีกด้วย หลัง จากทุบเอาชั้นกะลาออกเหลือแต่ส่วนเมล็ดในจะมีการตัดเอาส่วนเอนโดสเปิร์มออกบางส่วนเพื่อความสะดวกในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวและแซะเอ็มบริโอออกจากส่วนเอนโดสเปิร์ม นอกจากนี้ยังเป็นการตัดเอาส่วนที่

อาจติดเชื้อและไม่ต้องการออกอีกด้วย โดยจะตัดเป็นรูปลูกบาศก์ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อในการทดลองนี้ คือ แช่ชิ้นส่วนพืชในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาทีก่อน ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อและละลายไขมันบางส่วนออกจากชิ้นส่วนพืช เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชสัมผัสกับสารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อมากที่สุด จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรด์เป็นสารออกฤทธิ์ผสมอยู่ โดยใช้คลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ตามที่วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน (2532) เคยรายงานไว้ว่าที่สภาวะนี้ให้เปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่ไม่ปนเปื้อนและอัตรารอดสูงที่สุด (95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และทำการฟอกซ้ำอีกครั้งด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ชิ้นส่วนจะถูกแช่ค้างคืนไว้ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ก่อนจะถูกแซะออกจากเอนโดเสปิร์มไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันในแต่ละชุดการทดลองมีความไม่สม่ำเสมอ แม้จะใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิววิธีการเดียวกัน ทำให้ทราบว่านอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาในตอนต้นแล้ว เปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อของเนื้อเยื่อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน ยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บเมล็ดปาล์มน้ำมันก่อนนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย

การชักนำต้นจากไซโกติกเอ็มบริโอ

เอ็มบริโอของพืชบางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในธรรมชาติ การเอาเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถนำมาช่วยแก้ปัญหานี้ได้ นอกจากนั้นยังช่วยย่นระยะเวลาได้ด้วย เช่น เมล็ดของพืชบางชนิดมีเปลือกแข็งทำให้เอ็มบริโองอกออกมาจากเมล็ดได้ยาก จะต้องเสียเวลาจนกว่าเปลือกจะแตกออก แต่ถ้าแยกเอาเฉพาะเอ็มบริโอมาเลี้ยงก็จะช่วยย่นระยะเวลาได้ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540)

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อ เป็นการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาที่ปกติของเอ็มบริโอ เนื่องจากปัญหาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมักจะมีการพัฒนาของรากไม่ดีหรือไม่พัฒนาให้เกิดราก การเจริญเติบโตที่ปกติของเอ็มบริโอมักขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร ผงถ่านและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ Alang และ Fadzillah (1986) ได้ทดลองเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหาร 4 สูตร โดยใช้อาหารสูตร MS เป็นสูตรอาหารพื้นฐาน พบว่าการ

เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของอาหารไม่ทำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตแตกต่างกันในสูตรอาหารที่ใช้ทั้ง 4 สูตร กล่าวคือ เอ็มบริโอเจริญเติบโตได้ดีในอาหารทุกสูตร จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่มีการเติม BA ร่วมกับผงถ่านมีการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติม BA ร่วมกับผงถ่านอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ ในสูตรอาหารที่ไม่เติม BA ร่วมกับผงถ่าน เอ็มบริโอจะมีการพัฒนาของรากไม่ดีหรือไม่มีรากเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Paranjothy และ Otman (1982) และ Rohani และ Paranjothy (1985) ซึ่งรายงานไว้ว่า การเติมผงถ่านลงในอาหารช่วยให้การเจริญของรากดียิ่งขึ้น อาหารที่ไม่เติมผงถ่านมักไม่ปรากฏการเจริญของรากหรือเจริญไม่ดี Wang และ Huang (1976) ได้ทดลองเกี่ยวกับการใช้ผงถ่านเช่นกัน พบว่าเอ็มบริโอเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีผงถ่านอยู่ด้วย โดยทำให้ยอดและรากมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และกล่าวว่าผงถ่านเป็นตัวช่วยดูดซับสารพิษและป้องกันการเปลี่ยนสีของอาหารอันเนื่องมาจากสารที่ปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่ออีกด้วย

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชร่วมด้วยในสูตรอาหาร ช่วยให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตได้ดีเช่นกัน โดย Jones และ Dethan (1973) รายงานว่าเอ็มบริโอที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจะเจริญให้เห็นเฉพาะส่วนยอดเท่านั้น ไม่พัฒนาให้เกิดราก และพบว่าเอ็มบริโอที่เลี้ยงในอาหารที่มี IAA และ kinetin ความเข้มข้นต่ำ มีการพัฒนาของยอดและรากที่สมดุล จะเห็นได้ว่านอกจากสูตรอาหารและผงถ่านแล้ว การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในสูตรอาหารช่วยให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่มีการเติม BA ลงไปด้วย พบว่าเอ็มบริโอเจริญเติบโตดี ให้ความสูงของต้นและความยาวของรากดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่มี BA ซึ่งเป็นไปตามการทดลองของวิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน (2532) ที่พบว่าในสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่างชนิดกัน BA ให้การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอดีที่สุด รองลงมาคือ 2,4-D, kinetin และ NAA ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการชักนำต้นโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารเหลวให้การเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งโดยมีการเจริญที่ดีกว่าทั้งในส่วนของต้นและราก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพืชสามารถรับสารอาหารได้เต็มที่กว่า

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากไซโกติกเอ็มบริโอ

จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชตระกูลปาล์มอาจมีการใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว (วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน, 2532 ; บุญสนอง ช่วยแก้ว, 2534 ; Te-chato, 1993) ออก-ซินร่วมกับไซโทไคนิน (Omar, 1990 ; Veramendi, 1996 ; Huong, 1999 ; Rajesh, 2003) ออกซินร่วมกับผงถ่าน (Teixeira และคณะ, 1993 ; Chan และคณะ, 1998) หรือ ออกซินร่วมกับไซโทไคนินและผงถ่าน (Gabr และ Tisserat, 1985 ; Veramendi และ Navarro, 1996 ; Al-Khayri และ Al-Bahrany, 2001) Teixeira และคณะ (1993) กล่าวว่า ถึงแม้การเกิดเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของปาล์มน้ำมันจะแสดงให้เห็นว่าเกี่ยวข้องกับแหล่งของชิ้นส่วนที่ใช้มากกว่าสภาวะในการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม การใช้ 2,4-D ก็ยังคงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการชักนำแคลลัสและการรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ในการทดลองครั้งนี้มีการชักนำแคลลัสในอาหารที่มีออกซิน คือ 2,4-D dicamba และ 2,4-D ร่วมกับ 2iP ในระดับความเข้มข้นต่ำ (12.5 μM) และอาหารที่มี 2,4-D ระดับความเข้มข้นสูง (500 μM) ร่วมกับผงถ่าน โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด เนื่องจากการเลี้ยงในที่มืดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเลี้ยงในที่มีแสง (ทานตะวัน พูลสวัสดิ์, 2531) จากผลการทดลองพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอได้จากอาหารทุกสูตร โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะแข็งและมีการเจริญเติบโตช้าตามรายงานของ Smith & Thomas (1973) ซึ่งแคลลัสมีขนาดใกล้เคียงกันในอาหารที่มีระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในระดับต่ำ ๆ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารแต่ละสูตร พบว่า dicamba สามารถชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอได้ดีกว่า 2,4-D เล็กน้อย ซึ่งคล้ายกับที่อาสลัน หิเล (2545) เคยรายงานไว้ว่า dicamba มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันได้สูงกว่า 2,4-D และ NAA ตามลำดับ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน อัดกันแน่น สีเหลืองอ่อน ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่มักพบในอาหารที่มี 2,4-D ไม่ว่าชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงจะเป็นใบอ่อน รากหรือเอ็มบริโอ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Smith และ Thomas (1973) ; Martin และ Rabechault (1976) ; Lioret (1981) ; Paranjothy และ Otman (1982) ; Nwankwo และ Krikorian (1983) ; Thomas และ Roa (1985) Smith และ Thomas (1973) กล่าวว่าลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสขึ้นกับชนิดของออกซินที่ใช้ แคลลัสที่เกิดจากอาหารที่มี NAA มีสีจางกว่า และมีแนวโน้มที่จะเกิดรากมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D ส่วนในสูตรอาหารที่มีระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสูง ๆ ร่วมกับผงถ่าน พบว่าแคลลัสที่ได้มีขนาดเล็กกว่า ลักษณะเป็นกลุ่มก้อน อัดกันแน่น มีสีเหลืองเข้ม ตามที่ Paranjothy และ Otman

(1982) กล่าวว่า การเติมผงถ่านลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน แต่ปริมาณออกซินที่ใช้จะต้องเพิ่มขึ้น ในการทดลองครั้งนี้ ยังพบว่าปริมาณของ 2,4-D และผงถ่านที่เติมร่วมกันจำเป็นต้องมีสัดส่วนที่สมดุลกัน จึงจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ตามต้องการ กล่าวคือ ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มี 2,4-D 500 μM ร่วมกับผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำเอ็มบริโอให้เกิดแคลลัสขนาดเล็กได้ แต่เมื่อมีการเติมผงถ่านเพิ่มเป็น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอจะเจริญกลายเป็นต้นแทน ซึ่งอาจเนื่องจากการเติมผงถ่านที่มากขึ้นอาจดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตได้มากขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของ 2,4-D ลดลง จนมีระดับความเข้มข้นไม่มากพอที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอได้อีก ในอาหารแข็งสูตรที่มี 2iP พบว่ามีการปล่อยสารสีน้ำตาลออกมาในอาหาร เป็นไปตามที่ Martin และ Rabechault (1976) เคยรายงานไว้ว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน ไซโทไคนินและวุ้นมีผลทำให้เกิดสีน้ำตาลขึ้นในพืช การทดลองครั้งนี้ ใช้วิธีการย้ายแคลลัสลงอาหารขวดใหม่ทุก 1 เดือน ซึ่งสามารถลดการเกิดปัญหาดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารสูตรเดียวกัน การชักนำแคลลัสโดยการเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารเหลวให้น้ำหนักแคลลัสมากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งมีเนื้อที่จำกัดในการสัมผัสกับอาหารทำให้ดูดซับพวกธาตุอาหารไม่ดีเท่าที่ควร และเกิด gradient ในการรับสารอาหาร ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลวแคลลัสสามารถได้รับสารอาหารได้เต็มที่กว่า และอาจมีน้ำหนักของน้ำรวมอยู่ด้วย

การเพิ่มปริมาณแคลลัส

Lioret (1981) ได้จำแนกแคลลัสปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 ชนิดคือ แคลลัสเจริญเติบโตช้า (โตประมาณ 50 เปอร์เซนต์ของก้อนแคลลัสเดิมในเวลา 2 เดือน) มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนอัดกันแน่น มีสีเหลืองครีม และแคลลัสเจริญเร็ว (โตเป็น 2 เท่าในระยะเวลา 10-30 วัน) มีลักษณะเป็นเม็ด ๆ ไม่อัดแน่น และมีสีเหลืองอ่อน แคลลัสเริ่มต้นที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณออกซินสูงจะเจริญเติบโตช้า แต่หลังจากย้ายแคลลัสเหล่านี้ลงในสูตรอาหารที่เหมาะสม แคลลัสจะเจริญต่อไปอย่างรวดเร็ว Parthasrathy และคณะ (2001) กล่าวว่า การทำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในปาล์มน้ำมันสามารถชักนำและเก็บรักษาในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซินและไซโทไคนินจากนั้นย้ายไปยังอาหารที่ลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ เติบโตลงเพื่อให้เกิดการแสดงออกด้านศักยภาพในการเกิดเอ็มบริโอเจนิคเกิดการพัฒนาของเอ็มบริโอและสามารถเปลี่ยน เป็นพืชต้นใหม่ โดย 2,4-D เป็นออกซินที่ถูก

ใช้มากที่สุดในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (Rajesh และคณะ, 2003) การลดระดับ 2,4-D ลงช่วยให้การเจริญเติบโตของแคลลัสดียิ่งขึ้น (Martin and Rabechault, 1976 ; Thomas and Roa, 1985) การเติมผงถ่านลงในอาหารที่มี 2,4-D เป็นการลดระดับ 2,4-D ลงทางหนึ่งเช่นกัน (Paranjothy and Otman, 1982) การทดลองในครั้งนี้ แคลลัสเริ่มต้นที่ชักนำได้จะถูกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยคำนวณจากน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น พบว่าสูตรอาหารที่มีผงถ่านมีการเจริญเติบโตของแคลลัสดีกว่าสูตรที่มี ascorbic acid โดยแคลลัสมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว คือ โตประมาณ 2-3 เท่าของก้อนแคลลัสเดิม ลักษณะแคลลัส มีสีเหลืองอ่อน เป็นเม็ดไม่อัดแน่น เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะสูตรอาหารที่มีการเติมผงถ่านด้วยกัน พบว่าแม้จะมีการเพิ่มปริมาณ BA ก็ไม่ได้มีผลในการเพิ่มปริมาณแคลลัส ส่วนในสูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไม่ได้แสดงผล) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากกว่าสูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้คาดได้ว่าในการเพิ่มปริมาณของแคลลัสไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนในอาหารสูตรที่มีการเติม ascorbic acid ร่วมกับออกซิน พบว่าสูตรอาหารที่มี NAA สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่าสูตรที่เติม dicamba และ 2,4-D ตามลำดับ ส่วนสูตรที่มี 2,4-D ร่วมกับ kinetin และ ABA ซึ่ง Huong และคณะ (1999) เคยรายงานไว้ว่าเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณและรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ Canary Island date palm แต่ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้น้อยที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากพืชต่างชนิดกัน และเลือกใช้ชิ้นส่วนต่างกัน ทำให้มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญของพืชต่างกัน และอาจเนื่องมาจากการมี ABA ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช

การเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

Hanower และ Pannetier (1982) กล่าวว่าการชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์สามารถทำได้ 2 ทางคือ การทำให้ได้แคลลัสเจริญเร็วแล้วชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Lioret (1981) และการชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์โดยตรงจากแคลลัสเริ่มต้น

ในการทดลองครั้งนี้ แคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสจะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี ABA ร่วมกับการมีหรือไม่มีออกซิน คือ 2,4-D, dicamba, NAA หรือไซโทไคนิน คือ 2iP, kinetin, BA เมื่อย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลวเพื่อชักนำให้เกิดเอ็มบริ-

ออยด์ พบว่าในสูตรอาหารที่มีไซโทไคนิน คือ 2iP, BA และ kinetin แคลลัสจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และสารละลายเป็นสีเหลืองน้ำตาล เช่นเดียวกันกับในสูตรที่มีเฉพาะ ABA แต่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เพียงแต่มีการเปลี่ยนแปลงที่ช้ากว่าสูตรที่มีไซโท-ไคนินร่วมอยู่ด้วย ส่วนสูตรที่มีออกซิน คือ 2,4-D, dicamba และ NAA แคลลัสยังคงมีสีเหลือง และสารละลายใสหรือขุ่นเล็กน้อย ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่เติม NAA ให้ผลดีที่สุดคือ แคลลัสยังมีสีขาวเหลือง บวม สารละลายขุ่นเล็กน้อย

ถึงแม้ว่าสูตรที่มีผงถ่านจะเป็นสูตรที่ดีในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแคลลัส แต่จากผลการทดลองย้ายเลี้ยงแคลลัสจากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสลงในอาหารเหลวที่มี NAA ร่วมกับ ABA เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าแคลลัสที่มาจากสูตรที่มี 2,4-D ร่วมกับ ascorbic acid ให้ลักษณะเซลล์แขวนลอยดีกว่าสูตรอื่น ๆ โดยแคลลัสยังคงมีสีเหลือง ในขณะที่แคลลัสที่มาจากสูตรที่มีผงถ่าน หรือสูตรที่มี 2,4-D ร่วมกับ kinetin และ ABA เมื่อเลี้ยงไปเรื่อย ๆ แคลลัสจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเมื่อทดลองย้ายเลี้ยงแคลลัสไปยังอาหารใหม่ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเกิดการสร้างรากขึ้นในแคลลัสที่มาจากสูตรที่มีผงถ่านในช่วงการเพิ่มปริมาณแคลลัส

Verdeil และคณะ (1994) รายงานว่า ในการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสของมะพร้าว การได้รับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ในอาหาร ต่อด้วยการเติม BA เป็นสิ่งจำเป็นในการเกิดเป็นไบโพลาร์ที่สมบูรณ์ของเอ็มบริโอ Aberlenc-Bertossi และคณะ (1999) กล่าวว่าการให้ BA ในระหว่างการพัฒนา ช่วยกระตุ้นการเกิดปลายยอดและเพิ่มอัตราการงอกของปาล์มน้ำมันถึง 70 เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอดรวมเป็นผลมาจากการได้รับไซโทไคนินเป็นระยะเวลานานในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ การเลี้ยงบนอาหารที่มี BA เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ในตอนต้น ๆ ของการพัฒนาของเอ็มบริโอ ให้ผลในการผลิตยอดเดี่ยว ๆ

เอ็มบริออยด์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริออยด์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีการย้ายเลี้ยงไปยังอาหารใหม่เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเกิดเอ็มบริออยด์ลักษณะต่าง ๆ จากแคลลัสที่มาจากสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสสูตร Y_3 + 2,4-D 10 μM ร่วมกับ ascorbic acid 250 มก/ล และ Y_3 + dicamba 10 μM ร่วมกับ ascorbic acid 250 มก/ล ที่ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเอ็มบริออยด์สูตร Y_3 + NAA μM ร่วมกับ ABA 2 μM จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอเริ่มต้นและ

เอ็มบริออยด์ของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทดลองไปศึกษาลักษณะทางกายวิภาค ด้วยการตัดเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Johansen (1968) พบลักษณะของเอ็มบริออยด์ในระยะรูปกลม (globlar stage) และรูปหัวใจ heart stage) ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใกล้เคียงกันขนาดเล็ก อัดตัวกันแน่นอย่างเป็นระเบียบ คล้ายกับกลุ่มของเนื้อเยื่อเจริญที่พบในเอ็มบริโอเริ่มต้น แต่ไม่มีการพัฒนาให้เห็นเป็นเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดหรือปลายราก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของความเป็นโพลาร์ของเอ็มบริออยด์ เมื่อย้ายเอ็มบริออยด์ที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้น พบว่าเอ็มบริออยด์มีการเจริญกลับเป็นแคลลัสหรือมีการสร้างเป็นรากขึ้นมาแทน ซึ่งอาจเนื่องมาจากเอ็มบริออยด์ดังกล่าวยังไม่แก่ (mature) พอ รวมทั้งการเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีออกซินเป็นระยะเวลานานในช่วงของการชักนำแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ในอาหารเหลว ทำให้มีการกระตุ้นการเจริญเฉพาะส่วนที่จะเจริญไปเป็นรากมากกว่าส่วนที่จะเจริญไปเป็นยอด

ซึ่งเป็นลักษณะของเนื้อเยื่อเจริญที่พบใน เอ็มบริโอเริ่มต้น โดยกลุ่มเซลล์นี้มีโครงสร้างที่ค่อนข้างกลม ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริออยด์ในระยะรูปกลม (globular stage) ยังไม่มีการพัฒนาให้เห็น ซึ่งอาจเกิดจาก