บทที่ 4

การอภิปรายผลการวิจัย

การที่ตายอดและตาข้างเจริญเติบโตเป็นหน่อได้ดีและเร็ว อาจจะเนื่องจากว่าในสูตรอาหาร MMS มีสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตอย่างเพียงพอ เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วตายอดกับตาข้างเจริญเติบโตและเกิดขึ้นได้รวดเร็วในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน การทำลาย apical dominance ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ตาข้างเจริญได้งอกงาม ในแต่ละกิ่งของส้มโอที่นำมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงนั้น จะมีตายอดเพียงหนึ่งตาจึงเจริญเป็นหน่อได้เพียงหนึ่งหน่อ จำนวนหน่อจึงน้อยกว่าหน่อที่เจริญจากตาข้าง ซึ่งมีจำนวนหน่อมากมาย ถ้าใช้กิ่งส้มโอที่ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร จะมีตาข้างที่เจริญมาเป็นหน่อได้ถึง 2-3 หน่อ จึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาต่อไป การเกิดหน่อของตาข้างนี้เกิดมาจากตาข้างที่มีอยู่แล้ว แต่อยู่ในสภาพพักตัวยังไม่เจริญเป็นหน่อ มีไม้เนื้ออ่อนหลาย ๆ ชนิดที่สามารถเจริญเป็นตาข้างจำนวนมากแล้วเจริญเป็นหน่อได้ เมื่อนำเอาส่วนของลำต้นมาเพาะเลี้ยง พืชพวกนี้ได้แก่ ต้นกำมะหยี่, ฤาษีผสม, ผักเป็ดแดง ซึ่งสามารถจะนำวิธีการนี้ไปใช้ในการขยายพันธุ์พืชได้ ดังเช่น Boxus (1974) ได้นำเอาส่วนของต้นสตรอเบอรี่มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MMS โดยเพิ่ม 6-benzylaminopurineจะเกิดตาข้างเป็นจำนวนมากและรวดเร็วด้วย โดยที่ตาข้างจะเกิดที่ฐานใบแก่ที่สุดประมาณ 2-3 ตาก่อนแล้วต่อ ๆ มาก็เกิดขึ้นได้อีกเรื่อย ๆ และเจริญเป็นหน่อได้ทั้งหมด การเกิดหน่อนี้ไม่ได้ผ่านขบวนการเกิดแคลลัสเลย แต่บริเวณรอยตัดนั้นอาจจะเกิดแคลลัสได้ด้วยเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงตายอดตาข้างส้มโอ จะพบว่าบริเวณรอยตัดจะมีแคลลัสเกิดขึ้นได้ แต่มีปริมาณน้อยมาก และการเพิ่มปริมาณแคลลัสนี้ก็ทำได้ช้ามาก การที่เกิดแคลลัสได้ เนื่องจากในสูตรอาหาร MMS มีสารเคมีและฮอร์โมนที่เหมาะสมและเพียงพอในการแบ่งเซล ดังเช่น cytokinin ในน้ำมะพร้าว (Steward and Caplin, 1951; Steward, Mapes and Smith, 1958) thiamine (Linsmaier and Skoog, 1965), auxin, nitrogen-base

มีรายงานว่า พืชส่วนมากสามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ถ้ามีอาหารที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับพืชนั้น ๆ ไม่ว่าจะนำส่วนไหนของพืชมาเพาะเลี้ยงก็ตาม มันอาจจะสร้าง embryoid หรือหน่อขึ้นโดยตรงจากส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง หรืออาจจะเกิดเป็นแคลลัสก่อนก็ได้ จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ประสบความสำเร็จในการทำให้เกิดแคลลัสแล้ว ได้แก่ embryo, stem, leaf, mesophyll, root, cotyledon, hypocotyl, epicotyl, flower, anther, microspore, ovule, endosperm, nucellus, megagametophyte, pericarp, epidermis และ phloem แต่รายงานเกี่ยวกับการเกิดแคลลัสของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นหรือตายอด ตาข้างของส้มโอยังไม่พบ การเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างมีเปอร์เซนต์ contamination ค่อนข้างสูง เนื่องจากลักษณะของกิ่งส้มโอเป็นร่องและนูน มักจะมีขนปกคลุมอยู่ทั่ว ๆ ไป ทำให้การทำความสะอาดเป็นไปได้ยาก จะมีสปอร์ของราเกาะติดอยู่เสมอ วิธีการแก้ไขนั้นควรจะเช็ดผิวนอกของกิ่งส้มโอด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ หลาย ๆ ครั้งก่อนที่จะนำมาฟอกฆ่าเชื้อ หรือจะใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่เรียกว่า ultrasonic cleaner ทำลายแบคทีเรียหรือราในระหว่างที่ฟอกฆ่าเชื้อ จะทำให้ contamination ลดลงได้

โดยปกติ auxin ช่วยกระตุ้นให้เกิดรากและเพิ่มจำนวนรากให้มากด้วย โดยเฉพาะ IBA นอกจาก auxin แล้ว เชื่อกันว่ามีสารอีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการเกิดรากของพืช เช่น thiamine, pyridoxine, nicotinic acid และอื่น ๆ อีก จากการศึกษา in vivo ของส้มโอ ปรากฏว่า มีรากเกิดขึ้นได้ แต่ในการเพาะเลี้ยงตาข้างส้มโอเมื่อเกิดเป็นหน่อแล้วใช้ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0, 1, 5, 10, 15 ppm เพื่อกระตุ้นให้เกิดราก แต่ภายในเวลา 8 สัปดาห์ ก็ยังไม่สามารถทำให้เกิดราก แสดงว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโดย in vitro การทำให้หน่อส้มโอที่เจริญจากตาข้างที่รากได้นั้นยังต้องการสารอื่น ๆ และองค์ประกอบอื่น ๆ ด้วย อาจจะเป็นระยะเวลาที่ยาวนานกว่านี้ แสงสว่าง สารเคมีอื่น ๆ หรือเนื่องจาก cofactor อื่น ๆ ที่ทำให้เกิดราก Dutcher and Loyd (1972) ได้เพาะเลี้ยงตาข้างของแอปเปิลสามารถทำให้เกิดหน่อได้งอกงามดี แสงสว่างเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของหน่อ ถ้าไม่มี abscissic acid ก็จะไปยุติการเจริญเติบโตยองหน่อด้วย แต่อย่างไรก็ตาม เขาก็ไม่สามารถ

ทำให้หน่อนึ้งอกรากได้ แม้จะชักนำโดยใช้ IAA เขาเชื่อว่าการทำให้เกิดรากต้องมีองค์ประกอบอีกหลายอย่าง การชักนำให้หน่อที่เจริญจากตายอดและตาข้างของส้มโอ โดยใช้ IBA ในการศึกษานี้ก็ไม่สามารถทำให้เกิดรากภายใน 8 สัปดาห์เช่นเดียวกัน

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของส้มโอนี้ จะเห็นว่ามีบางส่วนสร้างแคลลัสขึ้นได้และเพิ่มปริมาณได้ดี โดยเฉพาะเมื่อนำส่วนใบเลี้ยง, epicotyl, hypocotyl มาเพาะเลี้ยง เมื่อนำส่วนที่เกิดแคลลัสไปตัดแบ่งเพื่อเปลี่ยนย้ายอาหารใหม่ ๆ ก็จะมีแคลลัสเกิดเพิ่มจำนวนได้ดีและเร็วขึ้น เนื่องจากบริเวณรอยตัดหรือมีบาดแผลจะมีฮอร์โมนเกิดขึ้นหรือมีการสะสมสารที่รอยตัดหรือที่มีบาดแผล เท่าที่ทราบขณะนี้คือ traumatic acid [$HOOC.CH = CH (CH_2)_8 . COOH$] ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกิดจากบาดแผลของพืช และที่พบว่าใบเลี้ยงที่อยู่ติดกับ epicotyl จะจะมีการสร้างแคลลัสได้ดีและเร็วกว่าบริเวณอื่น อาจจะเป็นได้ว่าบริเวณนั้นมีฮอร์โมนและมีสารที่เหมาะสมในการแบ่งเซล

นอกจากนี้ในอาหารสูตร MMS ก็มีส่วนประกอบของสารที่เพียงพอ เช่น เกลือแร่ธาตุต่าง ๆ สารอินทรีย์ น้ำตาล การเติมน้ำมะพร้าวจะช่วยให้มีการแบ่งเซลได้มาก (Steward and Caplin, 1951; Steward, Mapes and Smith, 1958) และในอาหารยังมี thiamine ช่วยในการแบ่งเซลด้วย (Linsmaier and Skoog, 1965) การกระตุ้นให้เกิดแคลลัสอาจทำได้โดยการเติมน้ำส้มคั้นลงในอาหารด้วย (Murashige and Tucker, 1969)

สารประกอบที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตอีกหลายตัวก็เติมลงไปในอาหารสูตร MMS คือ NAA 2.5 มก./ล., 2,4-D 2.5 มก./ล., kinetin 0.25 มก./ล. ซึ่งสารเหล่านี้มีส่วนทำให้เกิดแคลลัสและทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ ได้มีผู้ทำการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชให้เกิดแคลลัสและประสบความสำเร็จแล้ว ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ดังเช่น Ibrahim (1969) ได้ใช้ส่วนของ secondary phloem ของรากแครอทมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยอาหารที่มีเกลือแร่ธาตุต่าง ๆ แล้วเติม M-isonitol NAA 2.5 มก./ล., kinetin 0.05 มก./ล. จะทำให้เกิดแคลลัสได้ภายใน 4 สัปดาห์ Meyer, et al. (1964) ใช้อาหารสูตร MMS แล้วเพิ่ม NAA 2.5 มก./ล.

kinetin 0.5 มก./ล. มาเพาะเลี้ยงก้านดอกของต้น Tall Bearded Irises โดยผัด เป็นแว่นหนา 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นก้านดอกบนกระดาษกรองที่ชุ่มชื้นด้วยกรดน้ำส้ม 0.1 เปอร์เซนต์ และ ascorbic acid 0.1 เปอร์เซนต์ ซึ่งอยู่เหนืออาหารวุ้นสูตร MMS ดังกล่าวแล้ว การวางแผ่นก้านดอกนี้วางโดยกลับ polarity จะเกิดแคลลัสได้ภายใน 6-12 สัปดาห์ เมื่อนำไปเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส แต่ถ้านำไปไว้ในที่สว่างจะไม่เกิดแคลลัส

Caponetti, et al. (1971) ใช้สูตรอาหารของ Wetmore and Rier (1963) โดยการเติมน้ำมะพร้าว, casein hydrolysate และ 2,4-D จะทำให้เกิด cambial zone จากกิ่งของต้น black cherry เกิดแคลลัสได้และเจริญเติบโตได้เร็วภายใน 4-6 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงต้องนำไปไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 27-32 องศาเซลเซียส

Gupta (1972) ใช้ส่วนของ hypocotyl จากต้น jenugreek มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็งสูตรของ White โดยเติมน้ำมะพร้าว จะเกิดแคลลัสได้ดีในบริเวณ pericycle มากกว่าบริเวณ cortex และ vascular parenchyma

Simonsen and Hildebrandt (1971) ใช้ cormel stem tip ของ Gladiolus sp. มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารของ MMS โดยเติมน้ำมะพร้าวและ kinetin 0.04 มก./ล. จะเกิดแคลลัสได้ดี

Intuwong and Sagawa (1974, 1975) ได้ใช้ตายอดและตาข้างของ Phalaenopsis และ Dendrobium Golden wave มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went จะเกิด protocorm - like body ภายในเวลา 1-2 เดือน

ดังนั้น ในการชักนำให้เกิดแคลลัสมีองค์ประกอบที่สำคัญหลายอย่าง เช่น อาหารที่มีแร่ธาตุที่สมบูรณ์ น้ำตาล สารอินทรีย์อีกหลายอย่าง น้ำมะพร้าว, thiamine, สารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช ฮอร์โมนพืชอีกหลายชนิด เช่น 2,4-D, NAA, kinetin ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชบางอย่างอาจจะต้องการน้ำส้มคั้นในอาหารด้วย บางชนิดต้องการน้ำมะเขือเทศ อุณหภูมิ ความมืด มีความสำคัญต่อพืชบางชนิด โดยเฉพาะอุณหภูมิค่อนข้างสูงและ

ความมืด (Winton, 1968) มีความสำคัญที่ทำให้เกิดแคลลัสมาก สูตรอาหารที่นิยมใช้กันมาก ในการทำให้เกิดแคลลัส คือ สูตรอาหาร MMS โดยการเพิ่มน้ำมะพร้าวและน้ำตาล อาจจะเพิ่ม kinetin ด้วย เพราะ kinetin มีอิทธิพลต่อการสร้าง RNA และทำให้มีการแบ่งเซลมาก (Guttman, 1957; Patau, et al., 1957; Thorpe and Murashige, 1970) ถ้ามีการเพิ่ม auxin ก็จะทำให้มีการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย (Patau, et al., 1957)

การเพาะเลี้ยงส่วนอื่นของส้มโอ เช่น ตายอด, ใบ ไม่ปรากฏว่ามีแคลลัสเกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงไปช่วงระยะหนึ่งมักจะตาย การเพาะเลี้ยงรากนั้นจะเจริญเติบโตเป็นรากได้เรื่อย ๆ โดยไม่มีการเกิดแคลลัส ผู้ศึกษาทางด้านชีวเคมีพบว่า ในรากไม่มีวิตามิน, thiamine, nicotinic acid ซึ่งปกติรากจะได้รับวิตามินเหล่านี้จากส่วนต้น เมื่อนำรากแต่เพียงอย่างเดียวมาเพาะเลี้ยง ถึงแม้ว่าจะได้สารเหล่านี้จากอาหารที่ใช้เลี้ยง แต่การทำงานภายในเซลอาจจะไม่ปกติจึงไม่สามารถเกิดเป็นแคลลัสได้

การเพาะเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ของส้มโอนี้ ปรากฏว่า ใบเลี้ยงเกิดแคลลัสได้ดี จึงนำมาขยายเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารวุ้นสูตร MSII ซึ่งมีปริมาณ kinetin เป็น 2 เท่า คือ เพิ่มเป็น 0.5 มก./ล. การเปลี่ยนย้ายอาหารบ่อย ๆ ก็ทำให้มีการเพิ่มจำนวนแคลลัสได้รวดเร็ว เพราะมีส่วนประกอบอาหารที่เพียงพออยู่เสมอ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วนำไปวางบน เครื่องเขย่า จะทำให้เพิ่มปริมาณได้มาก มีพืชหลายชนิด เช่น Daucus carota, Chicorium endiva, Asparagus officinalis ที่นำมาเพิ่มจำนวนแคลลัสหรือนำมาเพิ่มปริมาณของหน่อ โดยใช้อาหารเหลวและเครื่องเขย่า การใช้อาหารเหลวแล้ววางบนเครื่องเขย่าโดยใช้อัตราการเขย่าช้า ๆ จะช่วยทำให้เพิ่มปริมาณและเกิด embryogenesis ได้เป็นอย่างดีด้วย (Steward, et al., 1958, 1963 1966; Vasil and Hildebrandt, 1963; Wilmar and Hellendorn, 1968) ส่วนพืชในพวกตระกูลส้มมีความเหมาะสมในการเลี้ยงบนอาหารวุ้น หรืออาหารเหลวที่อยู่บนเครื่องเขย่าในอัตราเร็ว 1 รอบต่อนาที (Esan, 1972) เนื่องจากแคลลัสจากใบเลี้ยงส้มโอ หลังจากที่เพาะเลี้ยงนาน 2 ปี จะเพิ่มปริมาณได้ช้า (Chaturvedi, et al., 1974)จึงต้องมีการเปลี่ยนย้ายอาหารบ่อย ๆ

พืชสามารถเกิด regeneration จากอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น หน่อ, ราก, ใบ หรือแม้กระทั่งกลุ่มเนื้อเยื่อพวกแคลลัส ให้เป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ โดยเฉพาะแคลลัสนั้นมีการแบ่งเซลเกิดขึ้นอย่างไม่มีระเบียบแบบแผน และเกิดขึ้นได้ทุกทิศทาง จะได้กลุ่มของเซลมากมาย เชื่อว่าไม่มี polarity ที่แน่นอนในแคลลัส สำหรับ meristem ของหน่อและรากจะมีการรวมกลุ่มเนื้อเยื่ออย่างมีระเบียบ มีการแบ่งเซลที่เป็นแบบฉบับ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมแล้วแคลลัสจะสร้าง meristem ที่จะเป็นหน่อและราก แล้วเกิด regeneration เป็นต้นใหม่ได้

Skoog (1957) ศึกษาและสังเกตพบว่า auxin และ cytokinin เมื่อมีปฏิกริยาร่วมกัน จะทำให้เกิดการแย่งเซลแล้วยังกระตุ้นให้เกิดการสร้าง meristem อีกด้วย อัตราส่วนที่เหมาะสมของ auxin และ cytokynin จะเปลี่ยนแปลงไปตามแบบฉบับของการสร้าง meristem ของพืช ถ้าอัตราส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin ค่อนข้างสูง แคลลัสจะเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงเป็น root primordia ถ้าปริมาณ cytokinin มีมากกว่า auxin จะสร้าง shoot apical meristem โดยการเปลี่ยนแปลงให้ cytokinin และ auxin อยู่ในสภาวะที่สมดุลย์ จะทำให้มีหน่อและรากเกิดขึ้นได้ การที่จะใช้ auxin และ cytokinin ในการกระตุ้นให้แคลลัสเกิดหน่อและรากนี้ต้องเลือกฮอร์โมนที่เหมาะสมและถูกต้องกับชนิดของพืช อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอื่น ๆ ในสูตรอาหารด้วย เช่น น้ำตาล, phosphate, source of nitrogen และอื่น ๆ ให้เหมาะสมด้วย

ได้มีผู้ศึกษา regereration ของพืชที่ประสพความสำเร็จแล้ว เช่น Pillai and Hildebrandt (1969) ได้ศึกษาการชักนำแคลลัสของต้น geranium ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์พบว่า NAA 0.1 มก./ล. และ kinetin 10 มก./ล. ในสูตรอาหาร MMS จะทำให้แคลลัสมีหน่อและมีรากได้ ภายใน 8-10 สัปดาห์ ถ้ามีการย้ายอาหารแคลลัสนานถึง 6 ครั้ง จะไม่มีการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นหน่อและราก Fonnesbech (1974) ใช้แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงก้านดอกของ Begonia มาทำให้เกิดหน่อและราก ภายใน 10 สัปดาห์ โดยเติม NAA 0.01 มก./ล. และ BA 0.5 มก./ล. ลงในสูตรอาหารของ White เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

Meyer et al. (1975) นำเอาแคลลัสของมันฝรั่งมาเลี้ยงในอาหาร MMS ไม่เกิดเป็นหน่อและราก ถ้าเลี้ยงใน Modified White media จะเกิดเป็นต้นพืชเล็ก ๆ ได้

Isbrahim (1969) ได้นำเอาแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากของแครอท มาชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช โดยใช้ NAA และ kinetin ปริมาณที่เหมาะสม คือ NAA 2.5 มก./ล. และ kinetin 0.20 มก./ล. ถ้าใช้ปริมาณ kinetin สูงเกินไป จะทำให้เกิดเป็นต้นที่ผิดปกติ

มีพืชบางชนิด เช่น กล้วยไม้บางสกุลสามารถทำให้เกิดเป็นต้นได้ โดยการย้าย protocorm - like bodies จากอาหารเหลวไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง ได้มีผู้ประสพความสำเร็จในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้อย่างมากมาย เช่น Sagawa et al (1966) ได้เพาะเลี้ยง meristem ของกล้วยไม้สกุล Cymbidiums Scully (1967) ได้เพาะเลี้ยง meristem ของ Cattleya Alliance, Kunisaki et al. (1972) ได้เพาะเลี้ยงตายอด Vanda Intuwong (1974) ได้เพาะเลี้ยงตายอดของ Phalaenopsis

แต่จากการเพาะเลี้ยงพืชตระกูลส้ม ถ้าเพาะเลี้ยงจาก nucellus จะเกิดเป็น adventive embryo ได้มากมาย โดยไม่ผ่านขบวนการเกิดแคลลัสหรือ pseudobulbil (Rangan et al., 1968) หรือการเพาะเลี้ยง embryo จากเมล็ดก็ทำให้เกิดเป็นพืชต้นเล็ก ๆ ได้ Yuda et al. (1975) แต่อย่างไรก็ตาม ส้มบางพันธุ์เท่านั้นที่เพาะเลี้ยงทำให้เกิดเป็น adventive embryo ได้ ไม่ใช่ทุกชนิดหรือทุกสายพันธุ์ (Bitters et al., 1970)

สำหรับพืชพวกส้มนั้นการชักนำให้เกิด regeneration ใช้ NAA และ BA โดยมีการเติม malt extract ด้วย จากแคลลัสใบเลี้ยงส้มโอถ้าใช้ NAA อย่างเดียวสามารถทำให้เกิดรากได้ เมื่อมีปริมาณ NAA 0.01 มก./ล. ถ้าปริมาณ NAA มีมากเพิ่มขึ้น เช่น 0.20, 0.40 มก./ล. ก็จะมีรากเกิดจำนวนมากขึ้นด้วย แสดงว่า NAA ชักนำให้เกิดรากได้ เมื่อมีปริมาณ NAA เพิ่มขึ้นก็จะเกิดรากได้มาก การเพิ่มปริมาณของแคลลัสก็เป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของ NAA

ด้วย การใช้ BA ในอาหาร MMS จะชักนำให้เกิดเป็นหน่อได้ เมื่อในสูตรอาหาร MMS มีปริมาณ BA 0.40 มก./ล. และเมื่อศึกษา combination ของ NAA และ BA พบว่า การชักนำที่ทำให้เกิดหน่อและรากได้ดีที่สุด คือ สูตรอาหาร MMS มีปริมาณ NAA 0.10 มก./ล. กับ BA 0.40 มก./ล. โดยมีการเพิ่ม malt extract 500 มก./ล. ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Chaturvedi and Mitra (1974) จาก stem-callus ของส้ม จะชักนำให้เกิดหน่อและรากได้ดีในอาหารที่มี NAA 0.10 มก./ล. กับ BA 0.25 มก./ล. เติม malt extract 500 มก./ล. ส่วน Grinblat (1972) ได้ใช้แคลลัสที่ได้จากส่วนต้นของกล้าส้มมาชักนำให้เกิดหน่อและรากโดยใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของ NAA 0.10 มก./ล. กับ BA 0.25 มก./ล. และชักนำให้เกิดรากเพียงอย่างเดียว ใช้อาหารที่มีปริมาณ NAA 0.1 มก./ล. และ 0.5 มก./ล. แต่เพียงอย่างเดียว ถ้าหากเพาะเลี้ยงแคลลัสนาน ๆ จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นหลายอย่าง เช่น การยึดติดกันของเซลในแคลลัส ลักษณะแคลลัส สีของแคลลัส อัตราการเจริญเติบโต ความต้องการสารเพื่อการเจริญเติบโต และ morphogenesis จะเห็นได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแครอท แคลลัสจะเปลี่ยนจาก friable type เป็น compact type และมีอัตราการเจริญเติบโตต่างกัน ถ้าเพาะเลี้ยงแคลลัสของส้มโอนาน ๆ ก็อาจจะเกิดการสูญเสียคุณลักษณะในการเกิด organogenesis ดังนั้น ถึงแม้จะใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วให้ฮอร์โมนที่ถูกต้อง ก็ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดหน่อและรากได้ อย่างเช่นงานวิจัยของ Chaturvedi, et al. (1974) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของส้มโอเป็นเวลานาน 2 ปี ปรากฏว่า แคลลัสจะเปลี่ยนจากลักษณะที่เซลเกาะกันแน่นเป็นแบบที่อยู่กันหลวม ๆ และแคลลัสที่มีเซลอยู่อย่างหลวม ๆ นี้จะสูญเสียความสามารถทาง regeneration แม้จะใช้สูตรอาหารและฮอร์โมนที่เหมาะสม จากการศึกษาทางเคมีวิเคราะห์พบว่า สารประกอบภายในเซลเปลี่ยนแปลงไปดังเช่นกรดอะมิโนบางตัวจะไม่พบได้แก่ l-glutamic acid, l-proline, l-serine, l-tyrosine และปริมาณของไนโตรเจน, โปรตีน และน้ำตาล จะมีน้อยกว่าแคลลัสที่เซลเกาะกันแน่น จึงทำให้แคลลัสที่เซลเกาะกันหลวม ๆ เสียความสามารถทาง regeneration แต่งานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้มีแคลลัสที่เซลเกาะกันหลวม ๆ เกิดขึ้น เพราะใช้เวลาเพิ่มปริมาณแคลลัสเพียง 4 เดือน ดังนั้น จึงพบแคลลัสที่มีเซลเกาะกันแน่น และยังมีความ

สามารถ regeneration ได้

องค์ประกอบของอาหารที่สำคัญและถือว่าจำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของส้ม คือ การเติม malt extract ลงไปในสูตรอาหารด้วย (Bitters et al., 1970) เชื่อว่า malt extract จะช่วยทำให้หน่อส้มที่เกิดจากการชักนำแคลลัสโดยฮอร์โมนนั้นมีความแข็งแรงมาก (Chaturvedi and Mitra, 1974) ซึ่งในงานวิจัยโดยใช้ใบเลี้ยงส้มโอมาเพาะเลี้ยงก็มีการเติม malt extract ในอาหารด้วย สภาพสิ่งแวดล้อมก็มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 27 องศาเซลเซียส (Esan, 1972) แสงสว่าง, ความชื้นสัมพัทธ์ก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ก็ได้ให้สภาพสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย เช่น ห้องที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโอนี้มีอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส มีความชื้นสัมพัทธ์ 34.5 เปอร์เซนต์ ความเข้มของแสง 3000 ลักซ์ และได้รับแสงสว่าง 15 ชั่วโมงต่อวัน และมืด 9 ชั่วโมงต่อวัน ด้วย

ในการย้ายส้มโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงส้มโอ และชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นหน่อและราก จากหลอดแก้วมีจุกเกลียวไปปลูกในดินที่อบฆ่าเชื้อ ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการเจริญเติบโต เพราะส้มโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแม้จะมีขนาดเล็ก แต่มีความแข็งแรงเพียงพอ สามารถปรุงอาหารได้ มีระบบรากที่แข็งแรงสามารถนำอาหารจากดินมาใช้ได้อย่างต่อเนื่อง เมื่อมีการรดน้ำอย่างสม่ำเสมอและมีอาหารในดินพอเพียง ส้มโอก็จะเจริญงอกงามต่อไป

แนวทางการศึกษาวิจัยสำหรับผู้ที่มีความสนใจ การขยายพันธุ์พืชพวกส้มก็คือการศึกษาค้นคว้าหาสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อจะเพิ่มปริมาณของแคลลัสให้รวดเร็วขึ้น และการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างแคลลัสจากส่วนอื่นของต้น เช่น ตายอด, ตาข้าง ของส้มหรือพืชตระกูลอื่น ก็ยังเป็นงานวิจัยที่ต้องการศึกษาต่อ ๆ ไป

ในการเกิดแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง จะมีตำแหน่งที่เกิดต่าง ๆ กัน สำหรับการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงส้มโอนี้มีการเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดทุกรอย การที่แคลลัสสามารถเกิด vascular tissue ได้นั้น เพราะเซลมี redifferentiation แล้วมีการเปลี่ยนแปลงเป็น tracheid - like cell ซึ่งมีลักษณะหัวท้ายเซลสักษณะเสี้ยมแหลม และ

ผนังด้านข้างเป็นร่างแห ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของส้มโอจะพบว่าแคลลัสจะมี vascular tissue เป็นกลุ่ม ๆ ซึ่งเหมือนกับการศึกษาของ Steward et al. (1958) ซึ่งได้เพาะเลี้ยงเซลเดี่ยวของรากแครอทก็พบว่าแคลลัสมี vascular tissue เกิดเป็นกลุ่ม ๆ ใน vascular tissue นั้น พบทั้ง phloem และ xylem ใน xylem พบ tracheid ซึ่งเป็นเซลมีลักษณะปลายเสี้ยมและ vessel member ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Ball (1950) ระหว่าง xylem และ phloem จะเห็น cambium zone อย่างชัดเจน

จากการศึกษาที่ผ่านมา การเกิดรากและหน่ออาจจะมีกำเนิดจากเนื้อเยื่อได้หลายแห่ง ดังเช่น การทดลองของ Steward et al. (1958) พบว่ารากเกิดมาจาก cambium เมื่อเพาะเลี้ยงเซลเดี่ยวของรากแครอทแล้วค่อย ๆ เจริญเติบโต เมื่อเกิดเป็นปมของรากแล้ว ถ้าย้ายไปเลี้ยงในอาหารชนิดพิเศษก็จะเกิดเป็นหน่อได้ โดยมี vascular tissue ติดต่อถึงกัน แต่ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของส้มโอ (C. grandis) พบว่า หน่อจะเกิดขึ้นได้ก่อนราก ซึ่งตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Grinblat (1972) ได้รายงานการเพาะเลี้ยง C. madurensis ว่ามีการเกิดรากขึ้นก่อนหน่อ แต่ Ball(1950) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง Sequoia sempervirens รายงานว่ามีการเกิดหน่อก่อนรากและบางครั้งจะมีแต่หน่อไม่มีราก Camus (1949) ได้สังเกตพบว่า หน่อจะมี vascular tissue ติดต่อกับ cambium โดยตรง ถ้ามีการเกิดรากจึงจะมีแนวของ vascular tissue จากหน่อเจริญเปลี่ยนแปลงมาสู่ราก เขาเชื่อว่า polarity ของ vascular tissue มีการเปลี่ยนแปลงจะเจริญเติบโตจากหน่อมายังราก Chaturvedi et al. (1974) รายงานว่าเมื่อเกิดหน่อแล้วจะชักนำให้เกิดรากโดยการเปลี่ยนย้ายอาหารบ่อย ๆ แสดงว่าหน่อเกิดก่อนราก จากการสุ่มตัวอย่างแคลลัสจากใบเลี้ยงส้มโอมาศึกษาทางกายวิภาคครั้งนี้ไม่สามารถจะยืนยันว่าหน่อและรากมีจุดกำเนิดมากจาก cambium แต่ตำแหน่งที่พบการเกิดหน่อและราก เกิดจากเนื้อเยื่อบริเวณลึกจากผิวของแคลลัส และไม่พบแนวต่อระหว่าง vascular tissue ของหน่อและราก เนื่องจากแคลลัสส่วนใหญ่สร้างแต่ราก บางแคลลัสสร้างแต่หน่อ ส่วนแคลลัสที่สร้างทั้งรากและหน่อมีน้อย