บทที่ 3

ผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียมโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช 3 ชนิด ได้แก่ แครอท ยาสูบ และหน่อไม้ฝรั่ง แบ่งการรายงานผลการทดลองของพืช 3 ชนิด เรียงตามลำดับดังนี้ คือ

ก. แครอท (Daucus carota Linn.)

ข. ยาสูบ (Nicotiana rustica Linn.)

ค. หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus officinalis Linn.)

ก. แครอท (Daucus carota Linn.)

การศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียมของแครอทโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แบ่งการรายงานผลการทดลองออกเป็น 7 หัวข้อใหญ่ดังนี้ คือ

1. ผลการชักนำให้เกิดแคลลัส
2. ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์
3. ผลการทำ synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation
4. ผลการผลิตเมล็ดพืชเทียม
5. ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมในสภาพปลอดเชื้อ
6. ผลทางกายภาพที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม
7. ผลการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพืชเทียม

1. ผลการชักนำให้เกิดแคลลัส

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิล (hypocotyl) ก้านใบ ใบ และรากของต้นกล้าแครอทที่เพาะในสภาพปลอดเชื้ออายุ 2 สัปดาห์ และส่วนโพรแคมเบียม (procambium) ของหัวแครอทในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารพื้นฐานของ MS (1962) โดย Halperin and Wetherell (1964) ตามภาคผนวก ก. ข้อ 1. ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด สังเกตผลการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.1 เนื้อเยื่อส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอท

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนใบของต้นกล้าแครอทที่นำมาเลี้ยงในที่สว่าง มีการเจริญเป็นแคลลัสเกิดขึ้นจากชิ้นส่วนของพืช เมื่อศึกษาลักษณะภายนอกของแคลลัสด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบลักษณะของแคลลัสแตกต่างกัน 2 แบบ ตามลักษณะของผิวเนื้อหรือสีของแคลลัสดังนี้

1. แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว เป็นแคลลัสที่มีเนื้อประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันแน่น (ภาพที่ 2A) บางแคลลัสมีกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้ม ลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ค่อนข้างกลมเกาะกันอย่างหนาแน่นเจริญอยู่บนแคลลัสสีเขียว แคลลัสลักษณะนี้เจริญมาจากเนื้อเยื่อโดยรอบทุกด้านของก้านใบที่นำมาเลี้ยง

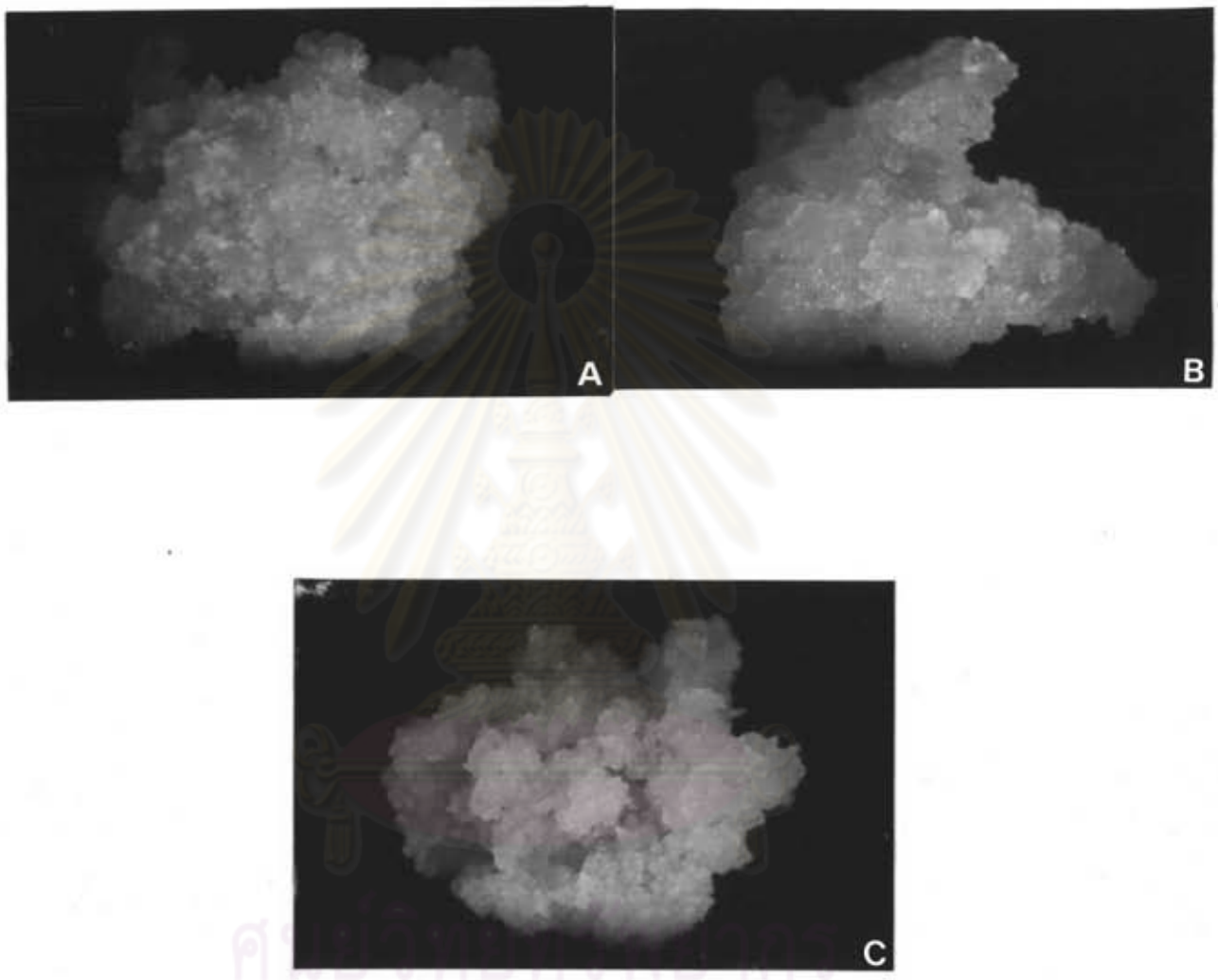
2. แคลลัสสีเหลือง เป็นแคลลัสที่ประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 2B) เจริญแผ่ออกไปบนอาหารหรือจับกันเป็นก้อน มีกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้มเจริญอยู่บนแคลลัสสีเหลืองเช่นเดียวกันกับที่พบในแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว แคลลัสสีเหลืองเจริญมาจากเนื้อเยื่อโดยรอบทุกด้านของก้านใบที่นำมาเลี้ยงเช่นกัน

สำหรับการชักนำแคลลัสจากส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอทในที่มืดพบแคลลัสเนื้อแน่นสีเหลืองนวล ประกอบไปด้วยเซลล์หรือกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ เกาะกันอย่างหนาแน่น มีลักษณะเหมือนกันกับแคลลัสที่ชักนำในที่มีแสงสว่าง โดยที่แคลลัสมีการเจริญจากเนื้อเยื่อโดยรอบทุกด้าน (ภาพที่ 2C)

ข. ปริมาณและขนาดของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอทที่ชักนำแคลลัสในที่มีแสงสว่าง ให้แคลลัสได้ดีที่สุดและดีกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของต้นกล้าแครอทที่ชักนำในที่มีแสงสว่าง (กราฟที่ 1 และ 3) มีคะแนนเฉลี่ย 4.12 คะแนน จากคะแนนเต็ม 5.00 คะแนน สำหรับการชักนำแคลลัสจากส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอทในที่มืด แคลลัสสามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกันกับการชักนำในที่มีแสงสว่าง (กราฟที่ 1 และ 3) โดยมีคะแนนเฉลี่ยเป็น 3.66 คะแนน (ตารางที่ 1) จากการวัดผลคะแนนเฉลี่ยของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 8 เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำแคลลัสส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอทในที่มีแสงสว่างกับในที่มืด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

1.2 เนื้อเยื่อส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอท

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอทที่นำมาเลี้ยงมีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกันกับเนื้อเยื่อส่วนก้านใบ ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำในที่มีแสงสว่างเป็นแคลลัสสีเขียวเข้ม ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 3A) เมื่อ



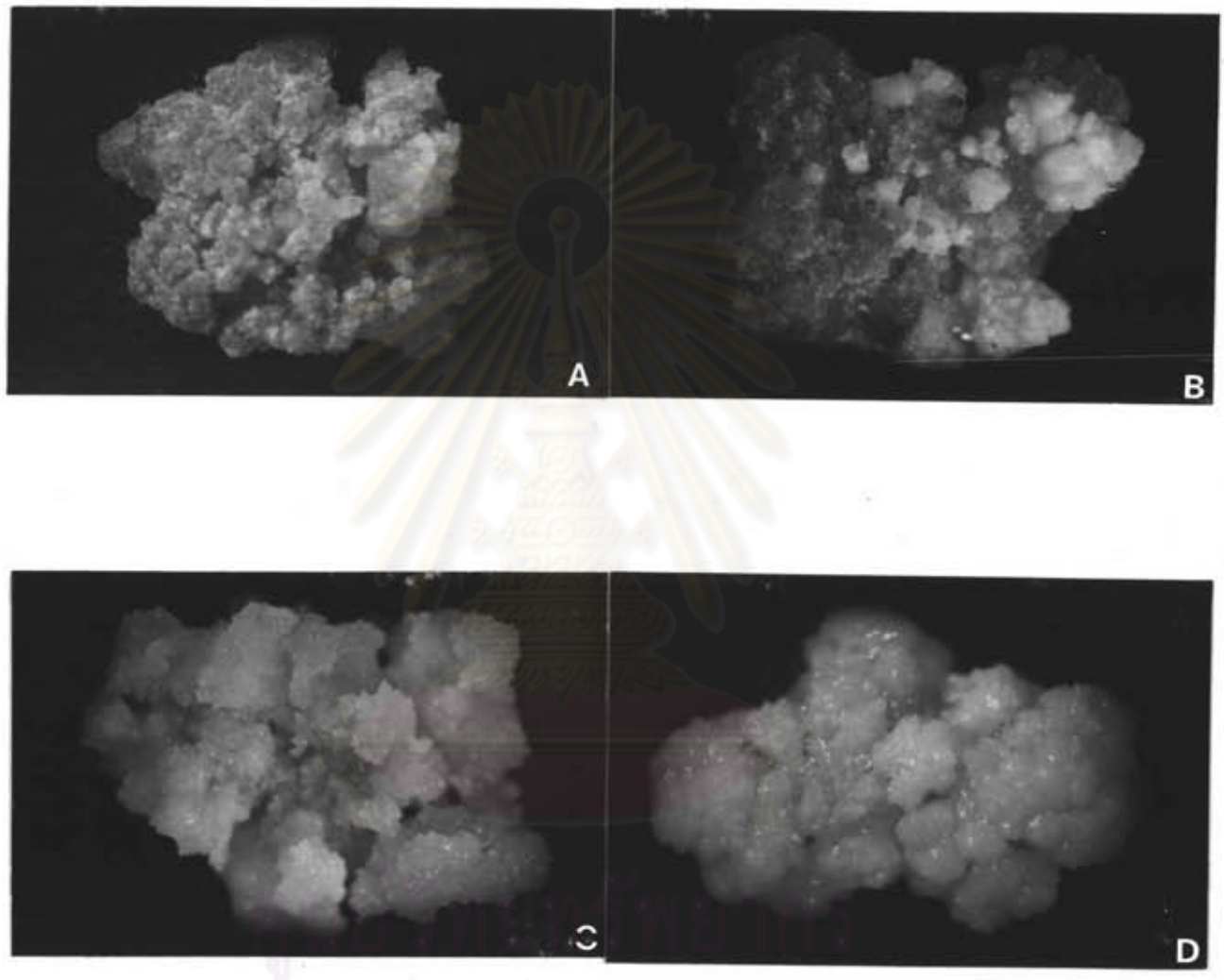
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอท ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน (ภาพ A และ B) และในที่มืด (ภาพ C) กำลังขยาย 3 เท่า

A : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว

B : แคลลัสสีเหลือง

C : แคลลัสสีเหลืองนวล



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอท กำลังขยาย 3 เท่า

A : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว ชักนำในที่มีแสงสว่าง

B : แคลลัสสีเขียว มีกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้มเจริญอยู่บนแคลลัสสีเขียว ชักนำในที่มีแสงสว่าง

C : แคลลัสสีเหลืองนวล ชักนำในที่มืด

D : กลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้ม ชักนำในที่มืด

แคลลัสมีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ เริ่มมีกลุ่มเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลมสีเหลืองเข้มเจริญอยู่บนแคลลัสสีเขียว (ภาพที่ 3B) กลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้มนี้คล้ายกับที่พบบนแคลลัสที่ชักนำจากส่วนก้านใบของต้นกล้าแครอท

แคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอทในที่มืด พบแคลลัสสีเหลืองนวล ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 3C) และพบกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้มเจริญอยู่บนแคลลัสสีเหลืองนวล ซึ่งเหมือนกับที่พบบนแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิลที่ชักนำในที่มีแสงสว่าง (ภาพที่ 3D)

ข. <u>ปริมาณและขนาดของแคลลัส</u> จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำแคลลัสส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอทในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวันกับในที่มืด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) คะแนนเฉลี่ยของแคลลัสในที่มีแสง 3.95 คะแนน และคะแนนเฉลี่ยของแคลลัสที่ชักนำในที่มืด 3.70 คะแนน จากคะแนนเต็ม 5.00 คะแนน (ตารางที่ 1 และกราฟที่ 3)

1.3 <u>เนื้อเยื่อส่วนใบของต้นกล้าแครอท</u>

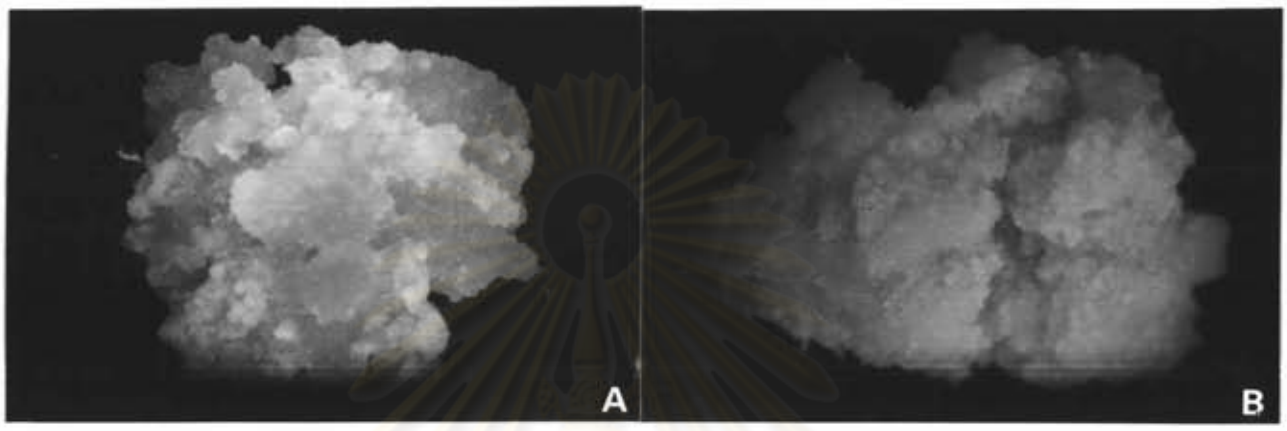
ก. <u>ลักษณะของแคลลัส</u> เนื้อเยื่อส่วนใบของต้นกล้าแครอทที่นำมาเลี้ยงเจริญให้แคลลัสเช่นกัน และพบว่าแคลลัสจากส่วนใบในที่มีแสงสว่างพบแคลลัสที่มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ

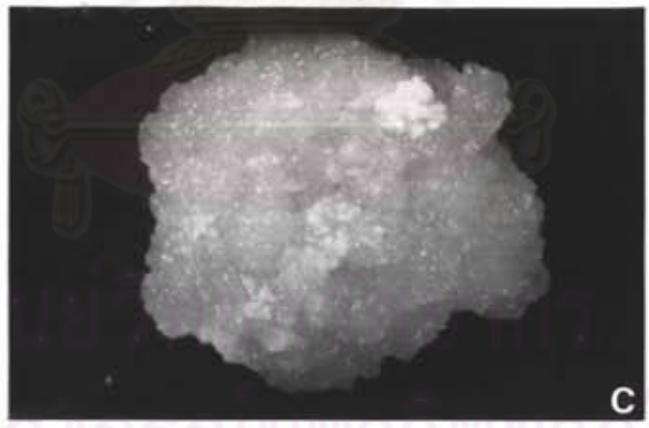
1. แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันแน่น มีสีเขียวใส แคลลัสลักษณะนี้จะพบได้ตามบริเวณรอยตัดระหว่างก้านใบกับตัวใบ (ภาพที่ 4A)

2. แคลลัสสีเหลืองเข้ม เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหลวม ๆ โดยแคลลัสเหล่านี้เกิดจากส่วนของแผ่นใบและบริเวณปลายขอบใบ (ภาพที่ 4B)

การชักนำแคลลัสจากส่วนใบของต้นกล้าแครอทในที่มืด พบแคลลัสที่มีลักษณะใสสีเหลืองเข้ม และสีน้ำตาล เป็นแคลลัสที่ประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 4C) แคลลัสลักษณะนี้เกิดจากส่วนของแผ่นใบและบริเวณปลายขอบใบ

ข. <u>ปริมาณและขนาดของแคลลัส</u> การชักนำแคลลัสจากส่วนใบของต้นกล้าแครอทในที่มีแสงสว่าง เมื่อสังเกตด้วยตาพบว่าแคลลัสเจริญได้ดีกว่าการชักนำแคลลัสในที่มืด (กราฟที่ 3) โดยมีคะแนนเฉลี่ยของการชักนำแคลลัสในที่มีแสงสว่าง 3.58 คะแนน และ 3.12 คะแนนสำหรับการชักนำแคลลัสในที่มืด (ตารางที่ 1 และกราฟที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบของต้นกล้าแครอท กำลังขยาย 3 เท่า

A : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว ชักนำในที่มีแสงสว่าง

B : แคลลัสสีเหลืองเข้ม ชักนำในที่มีแสงสว่าง

C : แคลลัสสีเหลืองเข้ม ชักนำในที่มืด

1.4 เนื้อเยื่อส่วนรากของต้นกล้าแครอท

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนรากของต้นกล้าแครอทที่นำมาเลี้ยงมีการเจริญเป็นแคลลัสน้อยมาก บางชิ้นส่วนของพืชไม่เกิดแคลลัสเลย ไม่ว่าจะชักนำแคลลัสในที่มีแสงสว่างหรือในที่มืดก็ตาม แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นแคลลัสสีขาวใส ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันค่อนข้างหลวม โดยแคลลัสเกิดจากบริเวณรอยตัดและบริเวณโดยรอบทุกด้านของชิ้นส่วนราก

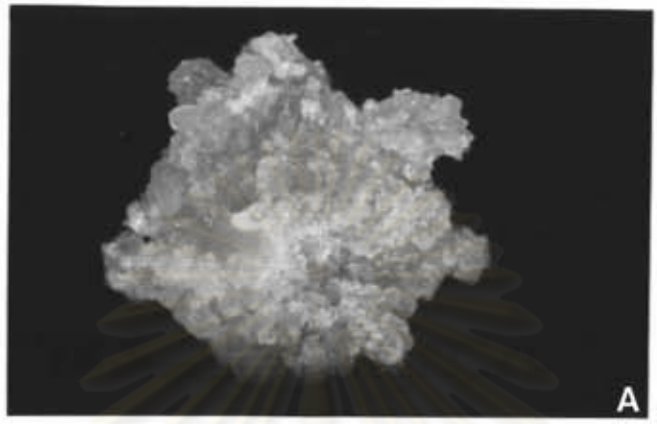
ข. ปริมาณและขนาดของแคลลัส แคลลัสที่ชักนำจากส่วนรากของต้นกล้าแครอทที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ปริมาณแคลลัสเกิดน้อยมาก คะแนนเฉลี่ยของแคลลัสที่ชักนำในที่มืดเท่ากับ 1.20 และคะแนนเฉลี่ยของแคลลัสในที่สว่างคือ 1.37 จากคะแนนเต็ม 5.00 (ตารางที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสส่วนรากต้นกล้าแครอทในที่มีแสงสว่างและที่มืด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2 และกราฟที่ 3)

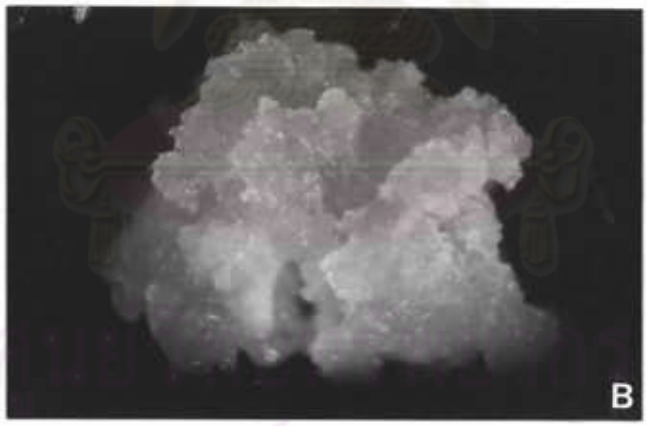
1.5 เนื้อเยื่อจากส่วนโพรแคมเบียมของหัวแครอท

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนโพรแคมเบียมของหัวแครอทที่นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสมีการเจริญเป็นแคลลัสได้ดีเช่นกัน แคลลัสที่ชักนำในที่มีแสงเป็นแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว มีเนื้อประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันแน่น (ภาพที่ 5A) แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวนี้ในการเจริญของแคลลัสระยะแรก ๆ (สัปดาห์ที่ 2) แคลลัสจะมีสีส้ม สีส้มเหลือง และสีเหลืองอ่อน ในระยะต่อมาจึงเริ่มมีสีเขียวเกิดขึ้น โดยแคลลัสเหล่านี้เกิดจากรอยตัดและโดยรอบทุกส่วนของพืช

ส่วนแคลลัสที่ชักนำในที่มืดนั้น พบแคลลัสสีเหลืองส้มและสีเหลืองเป็นแคลลัสที่มีเนื้อประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 5B) แคลลัสลักษณะนี้มีกำเนิดมาจากบริเวณรอยตัดและโดยรอบทุกด้านของส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง

ข. ปริมาณและขนาดของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนโพรแคมเบียมของหัวแครอทสามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด โดยเฉพาะการชักนำแคลลัสส่วนโพรแคมเบียมในที่มืด (กราฟที่ 2 และ 3) โดยมีคะแนนเฉลี่ย 4.66 คะแนน และคะแนนเฉลี่ยของแคลลัสในที่มีแสงสว่างเท่ากับ 4.12 คะแนน (ตารางที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำแคลลัสในที่มืดและที่สว่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

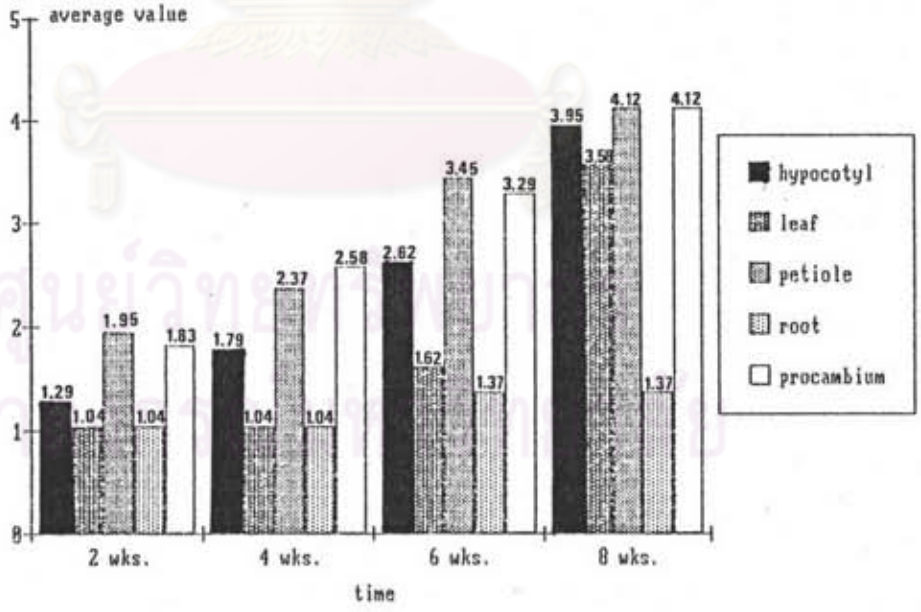
ภาพที่ 5 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท กำลังขยาย 3 เท่า

A : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว ชักนำในที่มีแสงสว่าง

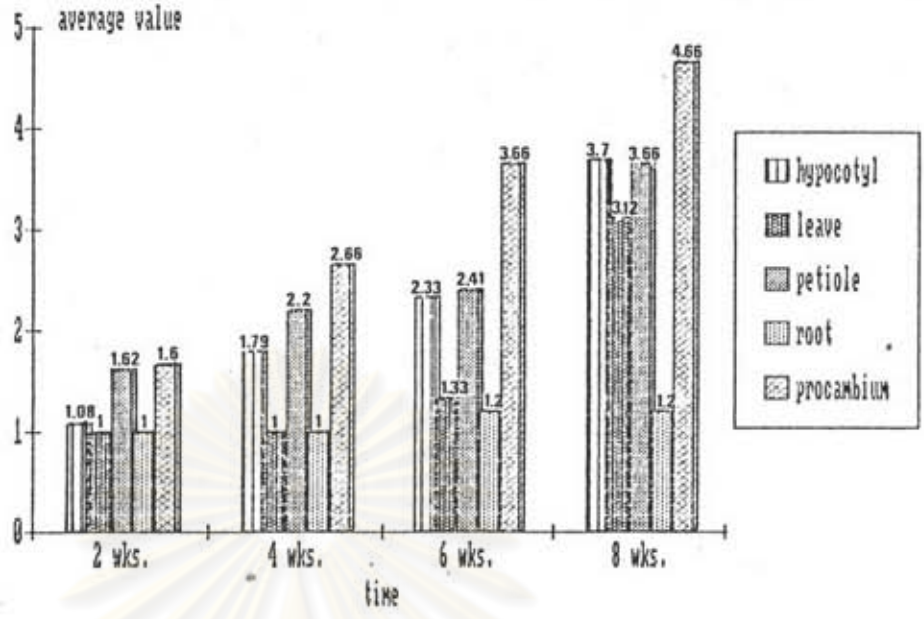
B : แคลลัสเนื้อแน่นสีเหลืองใส ชักนำในที่มืด

ตารางที่ 1 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิล ก้านใบ ใบ และราก ของต้นกล้าแครอทและส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8 จากคะแนนเต็ม 5.00 คะแนน

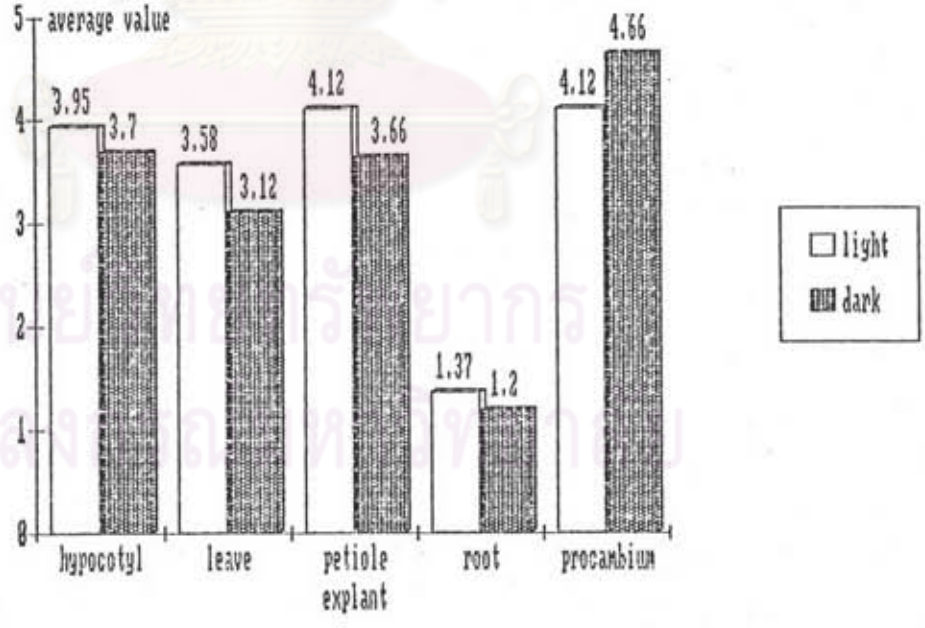
ส่วนของพืช	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	คะแนนเฉลี่ยของแคลลัส							
		สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 8	
		ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด	ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด	ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด	ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด
โพรแคมเบียม	120	1.83	1.66	2.58	2.66	3.29	3.66	4.12	4.66
ส่วนไฮโปโคทิล	120	1.29	1.08	1.79	1.54	2.62	2.33	3.95	3.70
ก้านใบ	120	1.95	1.62	2.37	2.20	3.45	2.41	4.12	3.66
ใบ	120	1.04	1.00	1.04	1.00	1.62	1.33	3.58	3.12
ราก	120	1.04	1.00	1.04	1.00	1.37	1.20	1.37	1.20



กราฟที่ 1 เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิล ใบ ก้านใบ และราก ของต้นกล้าแครอท และส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8



กราฟที่ 2 เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิล ใบ ก้านใบ และราก ของต้นกล้าแครอท และส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท ในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8



กราฟที่ 3 เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิล ใบ ก้านใบ และราก ของต้นกล้าแครอท และส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน กันในที่ไม่มีแสงสว่าง วัดผลในสัปดาห์ที่ 8

ตารางที่ 2 Duncan's multiple-range test ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิล ก้านใบ ใบ และรากของต้นกล้าแครอท และส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวันกับในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 8

ส่วนของพืช	จำนวนแคลลัส - ทั้งหมด	ชักนำแคลลัสในที่มีแสงสว่าง คะแนนเฉลี่ย	DMRT	ชักนำแคลลัสในที่มืด คะแนนเฉลี่ย	DMRT
โพรแคมเบียม	120	4.12	a	4.66	a
ส่วนไฮโปโคทิล	120	3.95	a	3.70	a
ก้านใบ	120	4.12	a	3.66	a
ใบ	120	3.58	a	3.12	a
ราก	120	1.37	b	1.20	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 3 Duncan's multiple-range test ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าแครอทและหัวแครอท ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 8

สภาพแสงที่ใช้ในการชักนำแคลลัส	ส่วนของพืชที่ใช้ในการชักนำแคลลัส									
	โพรแคมเบียม		ส่วนไฮโปโคทิล		ก้านใบ		ใบ		ราก	
	คะแนนเฉลี่ย	DMRT	คะแนนเฉลี่ย	DMRT	คะแนนเฉลี่ย	DMRT	คะแนนเฉลี่ย	DMRT	คะแนนเฉลี่ย	DMRT
มีแสงสว่าง	4.12	a	3.95	a	4.12	a	3.58	a	1.37	b
ไม่มีแสงสว่าง	4.66	a	3.70	a	3.66	a	3.12	a	1.20	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนก้านใบ ส่วนไฮโปโคทิล ใบ และราก ของต้นกล้าแครอท และส่วนโพรแคมเบียมของหัวแครอท โดยสังเกตและประมาณด้วยสายตาแล้วให้คะแนนขนาดของแคลลัส พบว่าส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอทจะชักนำแคลลัสได้ดีที่สุดทั้งในที่มืดและที่สว่าง (กราฟที่ 3) รองลงมาได้แก่ส่วนไฮโปโคทิล ก้านใบ ใบ และราก ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของแครอทในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าส่วนโพรแคมเบียม ส่วนไฮโปโคทิล ก้านใบ และใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นส่วนของรากเท่านั้นที่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 2) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของแครอทในที่มืด พบส่วนของรากมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ สำหรับส่วนอื่น ๆ จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

2. ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ในการศึกษาและการรายงานผลดังต่อไปนี้

2.1 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

2.3 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสลักษณะต่าง ๆ ที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าแครอทและหัวแครอท

2.4 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์และการศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis

2.1 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

แคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าแครอทและหัวแครอท เมื่อนำมาแบ่งเป็นก้อน ๆ แต่ละก้อนหนักประมาณ 1.0 มิลลิกรัม นำมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสขวดละก้อน และย้ายลงอาหารใหม่ ๆ ทุก 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการเจริญโดยการเพิ่มขนาดมากขึ้น แคลลัสมีลักษณะแข็งแรง ทำการเพิ่มปริมาณแคลลัสจนได้แคลลัสจำนวนมากเพียงพอสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อ ๆ ไป

2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ย้ายแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารวุ้นสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีน้ำหนักประมาณ 1.0 มิลลิกรัม มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสบนเครื่องเขย่า เพื่อเขย่าให้กลุ่มเซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนอย่างทั่วถึงและแยกกลุ่มเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสออกจากกันให้เป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์กลุ่มเล็ก ๆ อีกทั้งยังเป็นการ

เพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้น พร้อมที่จะนำไปศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ต่อไป

2.3 <u>ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสลักษณะต่าง ๆ ที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าแครอทและหัวแครอท</u>

เพื่อเป็นการศึกษาอย่างคร่าว ๆ ว่าแคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของแครอทและหัวแครอท แคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนใดและแคลลัสลักษณะอย่างไรที่มีศักยภาพสูงในการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ โดยการนำแคลลัสลักษณะต่าง ๆ เหล่านั้นมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสบนเครื่องเขย่า (จากข้อ 2.2 ของบทเดียวกัน) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำมากรองด้วยตะแกรงและผ้ากรองที่มีรูขนาด 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 และ 0.1 มิลลิเมตร แต่เลือกเอมเฉพาะเซลล์ที่ค้างที่บนตะแกรงที่มีรูขนาด 0.1 มิลลิเมตร เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ตามวิธีการของ Warren and Fowler (1977) โดยใส่เซลล์ที่กรองได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดที่บรรจุอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 20 มิลลิลิตร ต่อขวด สังเกตผลการเกิดเอมบริออยด์ด้วยตาเปล่า นับจำนวนเอมบริออยด์ในระยะ torpedo ที่เกิดขึ้นต่อ 1 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกันในแต่ละขวดและแต่ละลักษณะของแคลลัส นับผลในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ นับจำนวน torpedo เฉลี่ยจาก 3 ขวดต่อ 1 ลักษณะแคลลัส ว่าแคลลัสลักษณะใดให้เอมบริออยด์ได้ดีที่สุด เพื่อที่จะได้นำแคลลัสลักษณะดังกล่าวมาศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์และกระบวนการเกิด somatic embrogenesis โดยละเอียดต่อไป

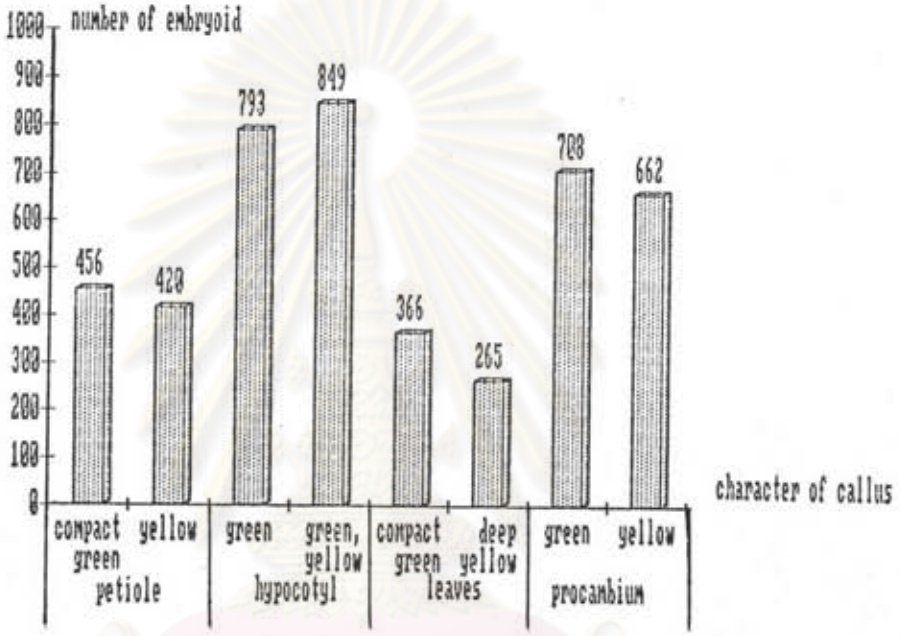
ผลการศึกษาการชักนำเอมบริออยด์จากแคลลัสลักษณะต่าง ๆ ที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนไฮโปโคทิล ก้านใบและใบของต้นกล้าแครอท และส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอท จากตารางที่ 4 พบว่าแคลลัสสีเขียวที่มีกลุ่มเซลล์รูปร่างกลมสีเหลืองเข้มที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากส่วนไฮโปโคทิลในที่สว่าง ให้เอมบริออยด์ได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนเอมบริออยด์เฉลี่ย 849 เอมบริออยด์ต่อขวด รองลงมาได้แก่แคลลัสสีเขียวที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนเดียวกัน มีจำนวนเอมบริออยด์ต่อขวดเท่ากับ 793 เอมบริออยด์ แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test พบว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิลทั้ง 2 ลักษณะ และแคลลัสที่ชักนำจากส่วนโพรแคมเบียมจากหัวแครอททั้ง 2 ลักษณะเช่นกัน ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5) ให้เอมบริออยด์สูงในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากส่วนก้านใบและใบของต้นกล้าแครอท ให้เอมบริออยด์ได้ไม่ดีนัก (ตารางที่ 4 และกราฟที่ 4)

จากผลการศึกษาการชักนำเอมบริออยด์จากแคลลัสสีเขียวและแคลลัสสีเขียวมีกลุ่มเซลล์รูปร่างกลมสีเหลืองเข้มเจริญอยู่บนแคลลัสสีเขียวที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอทให้ผลดีที่สุด การศึกษาในขั้นตอนต่อ ๆ ไปจึงเลือกใช้เฉพาะแคลลัสทั้ง 2 ลักษณะที่ชักนำจากส่วนไฮโปโคทิลของต้นกล้าแครอท ในที่สว่างเท่านั้น

ตารางที่ 4 จำนวนเอมบริออยด์ในระยะ torpedo ที่ชักนำจากแคลลัสลักษณะต่าง ๆ ในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ เฉลี่ยจากจำนวน 3 ขวดต่อ 1 ลักษณะของแคลลัส นับผลในสัปดาห์ที่ 3

จำนวนซ้ำที่ใช้ในการทดลอง	จำนวนเอมบริออยด์ที่นับได้ต่อขวด							
	ก้านใบ		ส่วนไฮโปโคทิล		ใบ		โพรแคมเบียม	
	แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว	แคลลัสสีเหลือง	แคลลัสสีเขียว	แคลลัสสีเขียวและกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้ม	แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวเข้ม	แคลลัสสีเหลือง	แคลลัสสีเขียว	แคลลัสสีเหลือง
1	357	435	699	988	416	258	758	576
2	428	332	915	746	361	316	630	667
3	583	492	764	812	322	220	735	742
รวม	1,368	1,259	2,378	2,546	1,099	794	2,123	1,985
เฉลี่ย	456	419.6	792.6	848.6	366.3	264.6	707.6	661.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนเอมบริออยด์ในระยะ torpedo ที่ชักนำจากแคลลัสลักษณะต่าง ๆ วัดผลในสัปดาห์ที่ 3 เฉลี่ยจากจำนวน 3 ขวดต่อ 1 ลักษณะแคลลัส

ก้านใบ	แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว
	แคลลัสสีเหลือง
ไฮโปโคทิล	แคลลัสสีเขียวกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้ม
	แคลลัสสีเขียว
ใบ	แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว
	แคลลัสสีเหลืองเข้ม
โพรแคมเบียม	แคลลัสีเขียว
	แคลลัสสีเหลือง

ตารางที่ 5 Duncan's multiple-range test ของจำนวนเอมบริออยด์ที่ชักนำจากแคลลัสลักษณะต่าง ๆ ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ นับผลในสัปดาห์ที่ 3 เฉลี่ยจาก 3 ขวดต่อ 1 ลักษณะแคลลัส

ส่วนของพืชที่ชักนำให้เกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส	จำนวนเอมบริออยด์เฉลี่ยต่อ 1 ขวด	DMRT
ไฮโปโคทิล	แคลลัสสีเขียวมีกลุ่มเซลล์สีเหลืองเข้มเจริญอยู่บนแคลลัสสีเขียว	849	a
ไฮโปโคทิล	แคลลัสสีเขียว	793	a
โพรแคมเบียม	แคลลัสสีเขียว	708	a
โพรแคมเบียม	แคลลัสสีเหลือง	662	a
ก้านใบ	แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว	456	b
ก้านใบ	แคลลัสสีเหลือง	420	b
ใบ	แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว	366	b
ใบ	แคลลัสสีเหลืองเข้ม	265	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.2 การชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

นำเซลล์แต่ละกลุ่มที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 2 สูตรที่แตกต่างกันบนเครื่องเขย่า โดยใส่เซลล์ที่ได้จากการกรองประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 200 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว 20 มิลลิลิตรต่อขวด จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่างๆ ในอาหารทดลอง 2 สูตร โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ ผลปรากฏดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ก. ขนาดของเซลล์ จากการสังเกตและการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ทุกๆ 2 วัน พบว่าขนาดของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุดได้แก่ กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุดที่ได้จากการกรองคือมีขนาดของเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร โดยการนับจำนวนเอมบริออยด์ในวันที่ 14 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ สำหรับกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตรพัฒนามาเป็นเอมบริออยด์ได้บ้างเล็กน้อย แต่เอมบริออยด์ไม่สามารถพัฒนาได้จากกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่า 1 มิลลิเมตร กลุ่มเซลล์กลุ่มนี้มักมีการเจริญและการเพิ่มขนาดของเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งเซลล์กลุ่มนี้สามารถนำกลับมากรองเพื่อแยกเอาเซลล์เดียวหรือกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กๆได้อีกหลายๆครั้ง

ข. ผลของสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

เอมบริออยด์สามารถพัฒนาได้ดีในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ตามวิธีการของ Fujimura and Komamine (1984) ที่เติม zeatin 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนเอมบริออยด์เฉลี่ยต่อขวดเท่ากับ 6,983 เอมบริออยด์ ในขณะที่เอมบริออยด์ที่ชักนำในอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่เติมฮอร์โมน มีจำนวนเอมบริออยด์เท่ากับ 5,537 เอมบริออยด์ต่อขวด (ตารางที่ 6) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบผลของสูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 จำนวนเอมบริออยด์ที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 2 สูตร นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2 (เฉลี่ยจากจำนวน 3 ขวดต่อชุดการทดลอง)

ขนาดของกลุ่มเซลล์ที่แยกได้จากการกรอง (มม.)	Murashige and Skoog (1962)			Fujimura and Komamine (1984)		
	จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด		
	globular shape	heart shape + torpedo shape	total	globular shape	heart shape + torpedo shape	total
1.5	-	-	-	-	-	-
1.0	-	-	-	-	-	-
0.5	143	218	361	187	295	482
0.1	864	4673	5537	891	6092	6983

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 Duncan's multiple-range test ของจำนวนเอมบริออยด์ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ที่แตกต่างกัน 2 สูตร เฉลี่ยจากสูตรละ 3 ขวด นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2

สูตรอาหารชักนำให้เกิดเอมบริออยด์	จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			รวมทั้งหมด	เฉลี่ยต่อขวด	DMRT.
	1	2	3			
Murashige and Skoog (1962)	5947	5245	5419	16611	5537	a
Fujimura and Komamine (1984)	7314	6737	6898	20949	6983	a

หมายเหตุ : DMRT.= Duncan's multiple-range test
ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.3 การศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis

เมื่อศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่างๆที่ได้จากการกรอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอทุก ๆ 2 วันเพื่อศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis ผลปรากฏว่ากลุ่มเซลล์ที่แยกได้จากการกรองที่ค้างอยู่บนตะแกรงที่มีรูขนาด 0.1 มิลลิเมตรนั้น มีทั้งเซลล์เดียวและกลุ่มเซลล์ปนกันอยู่เป็นจำนวนมาก ในชั้นกรองนี้กลุ่มเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ได้สูง

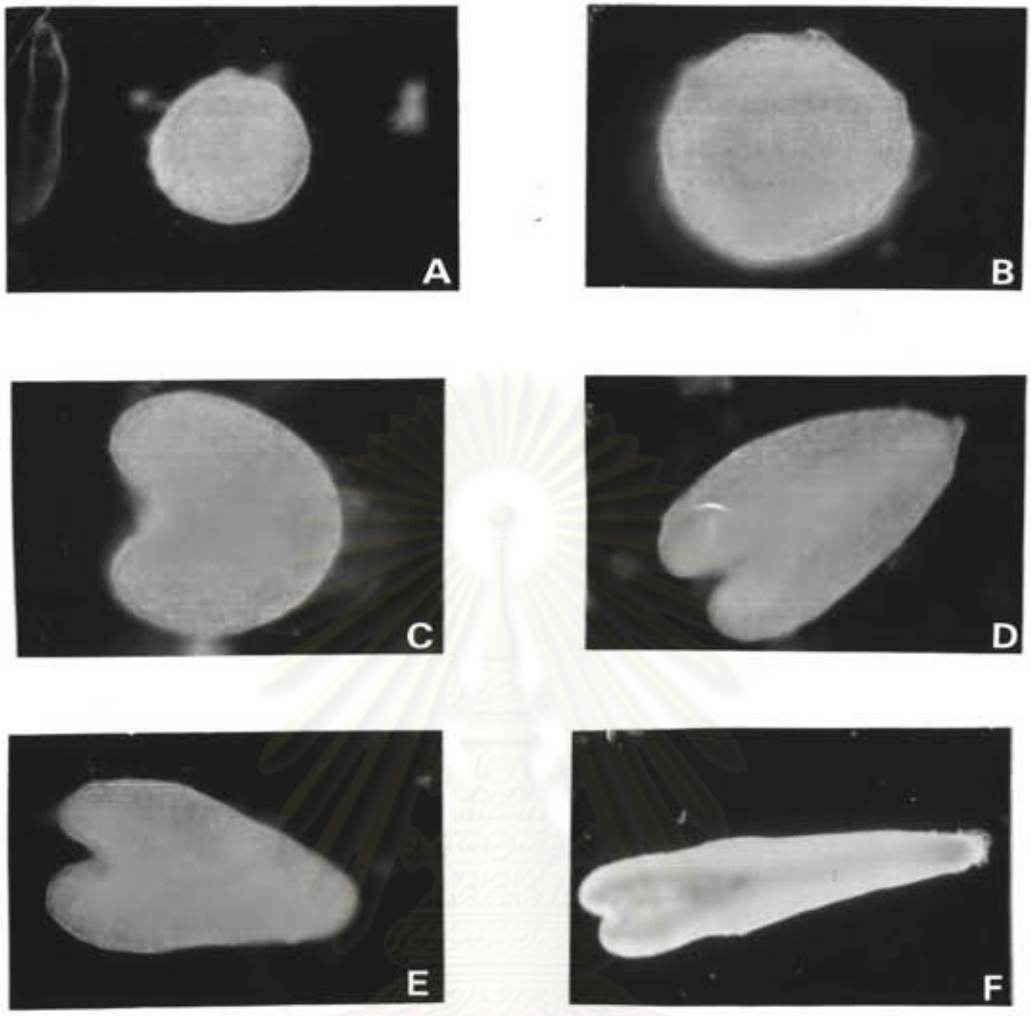
กลุ่มเซลล์ที่พบมากที่สุดเป็นกลุ่มเซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.015 มิลลิเมตร (15 u) ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยไซโตพลาสซึมเข้มข้น (ภาพที่ 6 A) พบได้ในวันที่ 2 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ประมาณวันที่ 4 และ 6 เริ่มพบเอมบริออยด์ในระยะ globular shape และพบจำนวนมากขึ้นในวันที่ 8 globular shape มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือกลมรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.05 ถึง 0.2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 6 B) หลังจากนั้นพบว่าจำนวนเอมบริออยด์ในระยะ globular ลดน้อยลง เนื่องจาก globular shape บางเอมบริออยด์ได้พัฒนาเป็นเอมบริ-ออยด์ในระยะ heart shape มีรูปร่างคล้ายหัวใจ โดยมีบริเวณที่พร้อมจะพัฒนาไปเป็นส่วนของใบเลี้ยงและรากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 6 C,D,E) เอมบริออยด์ในระยะ heart shape นี้พบรูปร่างของเอมบริออยด์ที่พอจำแนกได้ 3 ระยะด้วยกันคือ

early-heart shape เป็นเอมบริออยด์ที่พัฒนามาเป็นอันดับแรกจาก globular shape มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 6C) โดยมีบางบริเวณของเอมบริออยด์เว้าเข้าไปเล็กน้อย

heart shape เป็นพัฒนาการในระยะต่อมาของเอมบริ-ออยด์ ซึ่งเอมบริออยด์ในระยะนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.5-1.0 มิลลิเมตร

หลังจากนั้นมีพัฒนาการต่อมาเป็นเอมบริออยด์ในระยะ late-heart shape โดยเริ่มมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มขนาดของเอมบริออยด์ให้ยาวขึ้น กลายเป็นเอมบริออยด์ในระยะ torpedo shape ซึ่งมีรูปร่างคล้ายตอร์ปิโด (ภาพที่ 6F) torpedo มีขนาดแตกต่างกันมากมาย เอมบริออยด์ในระยะนี้พร้อมที่จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ และมีอัตราการเจริญค่อนข้างสูงมาก เอมบริออยด์ในระยะ heart shape และ torpedo shape มีจำนวนมากที่สุดประมาณวันที่ 12 ถึง 14 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์บนเครื่องเขย่า

เพื่อศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis โดยละเอียดมากขึ้น จึงได้ทำการศึกษาจากเซลล์เดี่ยวที่มีความสม่ำเสมอสูง โดยการทำ synchronization ด้วยวิธี discontinuous density gradient centrifugation



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเกิด embryogenesis ระยะต่างๆในแครอท

A. กลุ่มเซลล์รูปร่างกลมกำลังขยาย 200 เท่า
B. glubular shape กำลังขยาย 60 เท่า
C. early-heart shape กำลังขยาย 40 เท่า
D. heart shape กำลังขยาย 40 เท่า
E. late heart shape กำลังขยาย 40 เท่า
F. torpedo shape กำลังขยาย 10 เท่า

3. ผลการทำ synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation

ประชากรเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแครอทในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำเซลล์แขวนลอยมากรองบนผ้ากรองที่มีรูขนาด 161, 81, 47, 31, และ 26 ไมครอน ตามลำดับ เก็บเซลล์แขวนลอยที่ค้างอยู่บนผ้ากรอง

แต่ละขนาด แยกมาศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ในอาหารเหลวที่เติม zeatin 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีการของ Fujimura and Komamine (1984) เพื่อเปรียบเทียบหาขนาดของเซลล์ที่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ได้ดีที่สุด และศึกษาหาลักษณะของเซลล์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุด เพื่อนำเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดและลักษณะที่ให้เอมบริออยด์ดีที่สุดมาศึกษาในกระบวนการต่อๆไป

3.1 ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์

การกรองเซลล์ด้วยผ้ากรองที่มีรูขนาดเล็ก เซลล์ที่ผ่านรูกรองส่วนใหญ่จึงเป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กเช่นกัน เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการกรองมีรูปร่างแตกต่างกันมาก จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ สามารถแยกรูปร่างลักษณะของเซลล์เดี่ยวออกได้เป็น 3 แบบ ได้แก่

ก. เซลล์รูปทรงกลม (Spherical cells) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 ไมครอน เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่และมีไซโตพลาสซึมข้น เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ประมาณ 14 วัน พบว่าเซลล์รูปทรงกลมเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในขณะเดียวกันก็มีเอมบริออยด์เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก

ข. เซลล์รูปไข่ (Oval cells) มีความยาวของเซลล์ประมาณ 14-15 ไมครอน เป็นเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมข้น แต่จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ พบว่าเซลล์กลุ่มนี้มักเกิดการแบ่งเซลล์จนกระทั่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดโตขึ้นมากกว่าจะพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์

ค. เซลล์รูปร่างยาว (Elongate cells) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างยาว คดงอไปมา มีแวคิวโอมาก จากการทดลองพบว่าเซลล์ชนิดนี้ไม่มีพัฒนาการในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอมบริออยด์

3.2 ผลการศึกษาขนาดของเซลล์

จากการกรองเซลล์ด้วยผ้ากรองที่มีรูขนาดต่างๆ สามารถแยกเซลล์เดี่ยวออกได้เป็น 4 ขนาด ดังนี้ คือ

ก. เซลล์เดี่ยวที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 81 ไมครอน (0.08 มิลลิเมตร)

ข. เซลล์เดี่ยวที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 47 ไมครอน (0.04 มิลลิเมตร)

ค. เซลล์เดี่ยวที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 31 ไมครอน (0.03 มิลลิเมตร)

ง. เซลล์เดี่ยวที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 26 ไมครอน (0.02 มิลลิเมตร)

เมื่อนำเซลล์แต่ละขนาดมาชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 จากการนับจำนวนเซลล์ในระยะ torpedo พบว่า เซลล์เดี่ยวที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 26 ไมครอน ให้จำนวนเอมบริออยด์มากที่สุดถึง 4.275×10^{4} เซลล์ต่อขวด (เฉลี่ยจาก 3 ขวด) รองลงมาได้แก่เซลล์เดี่ยวที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 31 ไมครอน มีจำนวนเอมบริออยด์เฉลี่ย 2.889×10^{4} เซลล์ต่อขวด สำหรับเซลล์ที่มีขนาดโตกว่า 47 และ 81 ไมครอน พัฒนามาเป็นเอมบริออยด์ได้ในปริมาณมากเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบกับการชักนำเอมบริออยด์ที่ได้จากการกรองด้วยรูกรองที่มีขนาด 0.1 มิลลิเมตร (100 ไมครอน)

เมื่อทดสอบค่าทางสถิติเปรียบเทียบขนาดต่างๆของเซลที่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ พบว่าเซลล์เดี่ยวทั้ง 4 ขนาดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำเอมบริออยด์จากเซลล์เดี่ยวขนาดต่างกัน 4 ขนาดที่ได้จากการกรอง นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2 (เฉลี่ยจาก 3 ขวด)

ขนาดของเซลล์เดี่ยว (ไมครอน)	จำนวนเอมบริออยด์ที่นับได้ในแต่ละซ้ำ ($\times 10^3$)			รวม	เฉลี่ย	DMRT.
	1	2	3			
> 81	1.023	1.341	0.992	3.356	1.118	a
> 47	1.672	1.926	2.218	5.816	1.938	a
> 31	2.956	3.281	2.432	8.669	2.889	a
> 26	3.951	4.243	4.632	12.825	4.275	a

หมายเหตุ : DMRT. = Duncan's multiple-range test

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การทำ discontinuous density gradient centrifugation

การเพิ่มอัตราการเกิด embryogenesis จากเซลล์เดี่ยว สามารถทำได้โดยการกรองเซลล์แขวนลอยให้ได้เป็นเซลล์ที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน จากการทดลองได้นำเอาเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มากรองผ่านผ้ากรองที่มีรูขนาด 31 และ 26 ไมครอนแล้วนำเซลล์ที่ค้างอยู่บนรูกรองขนาด 26 ไมครอนมาทำ discontinuous density gradient centrifugation ในสารละลายฟิคอลล์ที่มีความเข้มข้น 10 ถึง 18 เปอร์เซนต์ และมีซูโครส 2 เปอร์เซนต์เป็นออสโมติคัมตามวิธีการดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3 เพื่อศึกษาอัตราเกิดเอมบริออยด์ และเปรียบเทียบเซลล์เดี่ยวที่ได้ในแต่ละชั้นของสารละลายฟิคอลล์ ว่าเซลล์เดี่ยวที่ตกตะกอนอยู่ในสารละลายฟิคอลล์ความเข้มข้นเท่าใดที่สามารถพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 9 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากเซลล์เดี่ยวที่ได้จากการทำ discontinuous density gradient centrifugation ในสารละลายฟิคอลล์ความเข้มข้น 10 ถึง 18 เปอร์เซนต์ ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ (นับจำนวนเซลล์ทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์) จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 74.36×10^4 เซลล์

ความเข้มข้นของสารละลายฟิคอลล์ (เปอร์เซนต์)	จำนวนของเซลล์เดี่ยวในแต่ละชั้น ($\times 10^4$)	จำนวนเอมบริออยด์ ($\times 10^2$)	อัตราการเกิดเอมบริออยด์ (เปอร์เซนต์)
<10	31.0	0	0
10-12	30.0	0	0
12-14	8.9	0	0
14-16	3.8	17.1	4.5
16-18	0.41	4.5	11.1
>18	0.15	2.8	18.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

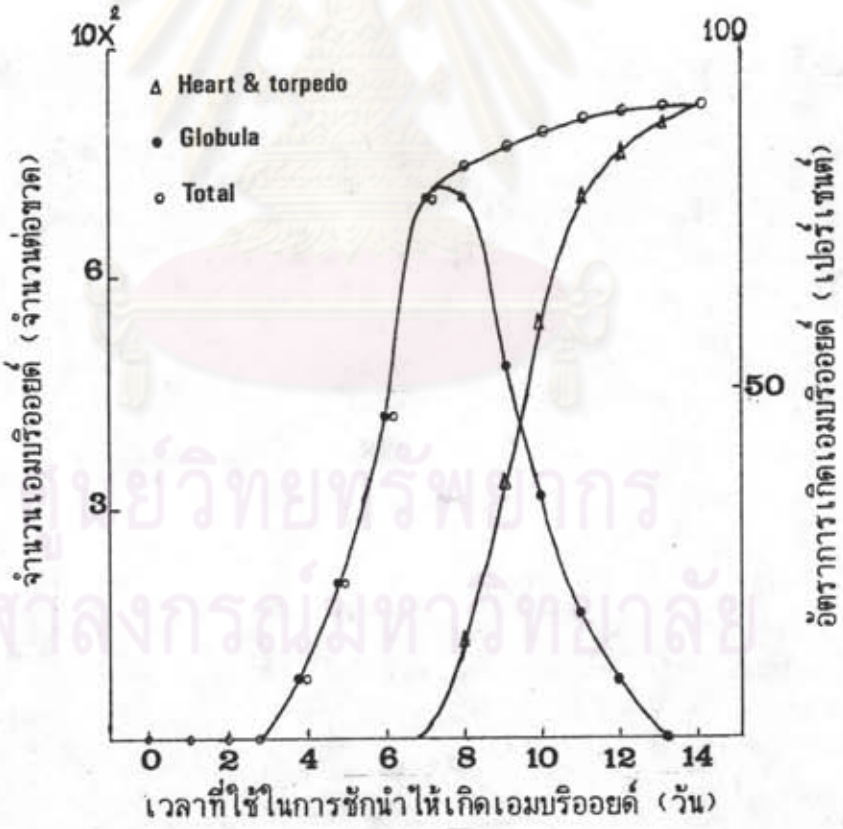
ตารางที่ 10 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากเซลล์เดี่ยวในแต่ละชั้นของสารละลายฟิคอลล์ ความเข้มข้น 18 เปอร์เซนต์ ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ เฉลี่ยจาก 3 ขวด (นับจำนวนเซลล์ทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์) จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 912 เซลล์

วันที่นับจำนวนเอมบริออยด์	จำนวนเอมบริออยด์ที่นับได้ต่อขวด			อัตราการเกิดเอมบริออยด์จากจำนวนเอมบริออยด์ทั้งหมด (เปอร์เซนต์)
	globular	heart and torpedo	รวมทั้งหมด	
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	68	0	68	7
5	170	0	170	19
6	456	0	456	50
7	784	0	784	86
8	754	58	812	89
9	704	116	820	90
10	556	283	839	92
11	257	591	848	93
12	206	642	848	93
13	95	762	857	94
14	0	857	857	94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 9 จำนวนทั้งหมดของเอมบริออยด์และอัตราการเกิดเอมบริออยด์ จากการปั่นแยกในแต่ละชั้นของสารละลายฟิคอลล์จากการทำ discontinuous density gradient centrifugation พบว่าไม่มีเอมบริออยด์เกิดขึ้นในชั้นของสารละลายฟิคอลล์ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 14 เปอร์เซนต์ แต่ในขณะเดียวกันพบว่ามากกว่า 90 เปอร์เซนต์ ของเซลล์เดี่ยวที่ได้จากการปั่นแยกในชั้นที่มีความเข้มข้นของสารละลายฟิคอลล์ 18 เปอร์เซนต์ มีอัตราการเกิดเอมบริออยด์ได้สูงที่สุด

เมื่อย้ายกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการปั่นแยก มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ พบกลุ่มเซลล์หรือเซลล์เดี่ยวจำนวนมากที่เป็นเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมข้น จากตารางที่ 10 แสดงถึงระยะเวลาต่างๆในการเกิดเอมบริออยด์ พบว่าเอมบริออยด์ในระยะ globular เกิดก่อน หลังจากเลี้ยงเซลล์ประมาณ 4 วัน และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 7 หลังจากนั้นจะมีจำนวนลดลง ในวันที่ 7 นี้เริ่มมีเอมบริออยด์ในระยะ heart shape เกิดขึ้นปะปนกับ globular shape หลังจากนั้นจำนวนของheart shapeและ torpedo shape ก็จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 14 หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ (กราฟที่ 5)



กราฟที่ 5 อัตราการเกิดเอมบริออยด์และจำนวนเอมบริออยด์ในระยะต่างๆ วัดผลเป็นเวลา 14 วัน หลังการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 912 เซลล์

4. ผลการศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียม

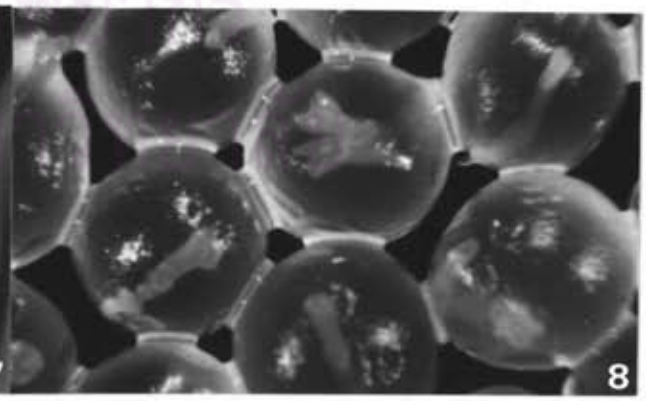
เมื่อกลุ่มเซลล์พัฒนาเป็นเอมบริออยด์ในระยะ torpedo พบว่ารูปร่างของ torpedo ที่เกิดขึ้นมีขนาดแตกต่างกัน วัดความยาวของ torpedo shape โดยเฉลี่ยประมาณ 1.5 ถึง 6.0 มิลลิเมตร และความกว้างของส่วนที่กว้างที่สุดโดยเฉลี่ยประมาณ 0.5 ถึง 2.0 มิลลิเมตร นำเอมบริออยด์ระยะ torpedo มากรองบนตะแกรงที่มีรูขนาด 2.0, 1.0, 0.5 และ 0.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ เพื่อแยกเอมบริออยด์ที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน

จากการทดลองสามารถแยกเอมบริออยด์ระยะ torpedo ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความยาวของเอมบริออยด์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 รูปร่าง torpedo มีความยาวมากกว่า 4.0 มิลลิเมตร
กลุ่มที่ 2 รูปร่าง torpedo มีความยาวน้อยกว่า 4.0 มิลลิเมตร
กลุ่มที่ 3 รูปร่าง torpedo มีความยาวน้อยกว่า 2.0 มิลลิเมตร

นำเอมบริออยด์ที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มมาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม เมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้มีลักษณะกลม ใส มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8.0 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดพืชเทียมประกอบไปด้วย 1, 2 หรือ 3 เอมบริออยด์ (ภาพที่ 8) โดยมีอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962) ทำหน้าที่เป็นเอนโดสเปิร์มเทียมซึ่งเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเอมบริออยด์ภายในเมล็ดพืชเทียม และในขณะที่เมล็ดพืชเทียมกำลังงอก เปลือกเมล็ดพืชเทียมมีลักษณะอ่อนนุ่มเป็นเจลที่ค่อนข้างแข็ง และสามารถรักษาสภาพความคงตัวได้ดี โดยมี calcium alginate ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง sodium alginate กับ calcium nitrate ทำหน้าที่เสมือนเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดพืชเทียม

7


8

ภาพที่ 7 เอมบริออยด์ในระยะ torpedo ของแครอท ที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน กำลังขยาย 10 เท่า
ภาพที่ 8 เมล็ดพืชเทียมแครอท

5. ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้มาเพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเมล็ดพืชเทียมชุดการทดลองละ 8 ขวด ๆ ละ 50 เมล็ด รวมจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่ใช้ทดสอบความงอก 400 เมล็ดต่อหนึ่งชุดการทดลอง นับจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่งอกในแต่ละขวดตามวิธีมาตรฐานของ ISTA เพื่อหาเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียม

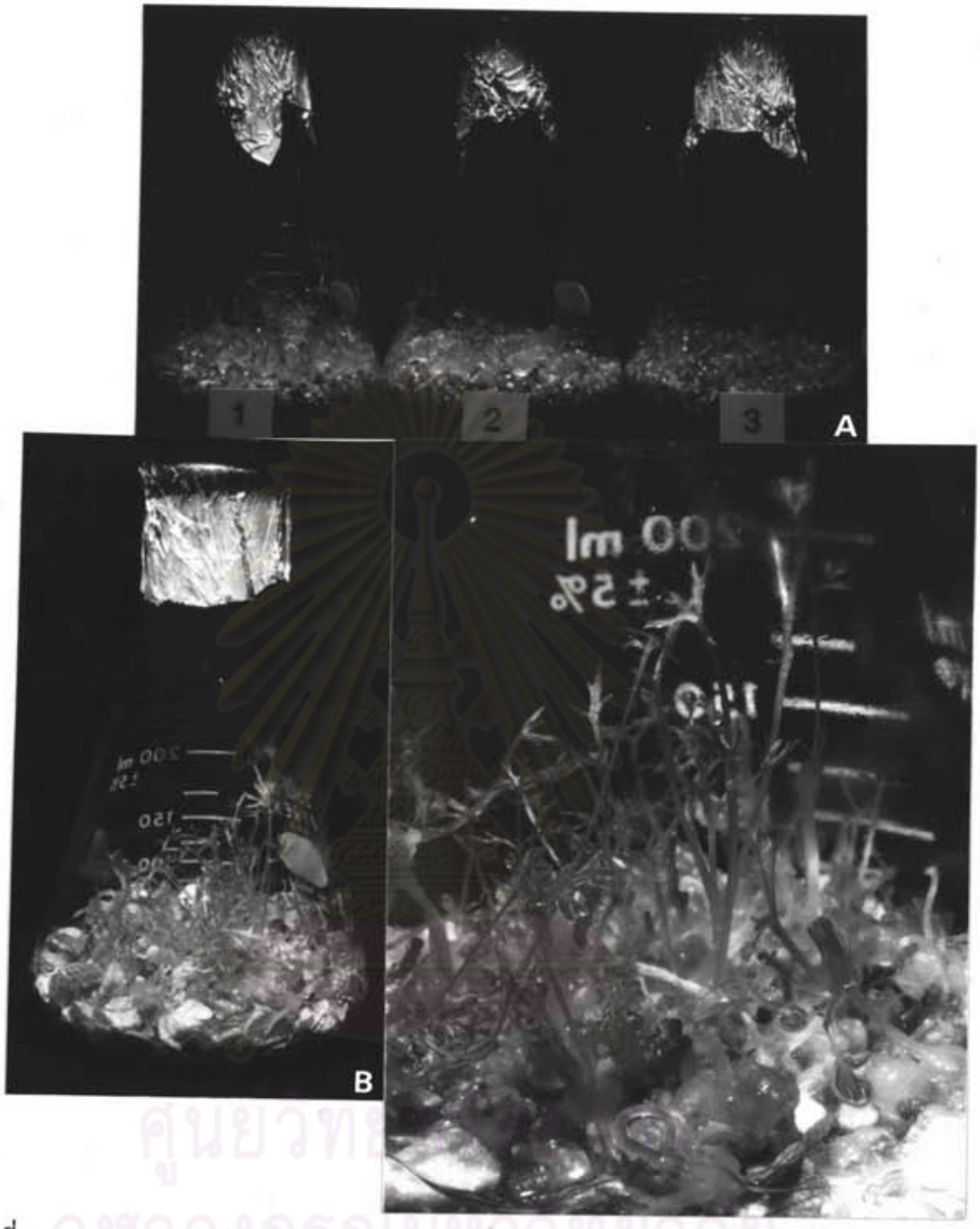
จากการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแคลลัสที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน และการเพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแคลลัสในสูตรอาหารทดลองที่ผสมลงในวัสดุเพาะ มีผลการทดลองดังนี้ คือ

5.1 ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแคลลัสที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กันในสภาพปลอดเชื้อ

เมล็ดพืชเทียมแคลลัสที่ภายในบรรจุเอมบริออยด์ที่มีขนาดต่าง ๆ กัน 3 กลุ่มตามความยาวของ torpedo shape ที่ได้จากการกรองและการผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม นำมาเพาะทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ vermiculite เป็นวัสดุเพาะ เติมปุ๋ย WP ลงไปในขวดเพื่อใช้เป็นแหล่งของอาหารสำหรับการเจริญของเมล็ดพืชเทียมที่กำลังงอก

ผลการศึกษาเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียม ที่มีเอมบริออยด์ขนาดแตกต่างกัน 3 กลุ่มตามความยาวของเอมบริออยด์ระยะ torpedo พบว่าเมล็ดพืชเทียมแคลลัสกลุ่มที่ 1 ที่มีเอมบริออยด์ขนาดความยาวมากกว่า 4.0 มิลลิเมตร เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 98.75 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 11) รองลงมาได้แก่กลุ่มที่ 2 ที่มีเอมบริออยด์ขนาดความยาว 2.0 ถึง 4.0 มิลลิเมตร มีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย 90.25 เปอร์เซนต์ ส่วนกลุ่มที่ 3 ที่มีเอมบริออยด์ขนาดความยาวน้อยกว่า 2.0 มิลลิเมตร เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยต่ำมาก คือเท่ากับ 33 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 11 และกราฟที่ 6) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple-rang test เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมแคลลัสที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน พบว่าแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 12)

จากผลการทดลองความงอกของเมล็ดพืชเทียมแคลลัสที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน 3 กลุ่มนี้ เมล็ดพืชเทียมแคลลัสกลุ่มที่ 1 ที่มีเอมบริออยด์ขนาดความยาวมากกว่า 4.0 มิลลิเมตร ให้เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยสูงที่สุด ดังนั้นสำหรับการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เอมบริออยด์ที่มีขนาดความยาวมากกว่า 4.0 มิลลิเมตร มาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียมแคลลัสเพราะจัดว่าเป็นขนาดที่ให้ผลดีที่สุด



ภาพที่ 9 A : แสดงการงอกและการเจริญของเมล็ดพืชเทียมแครอทที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน 3 ขนาด

1 = เอมบริออยด์ที่ยาวมากกว่า 4.0 มิลลิเมตร

2 = เอมบริออยด์ที่ยาวมากกว่า 2.0 มิลลิเมตร

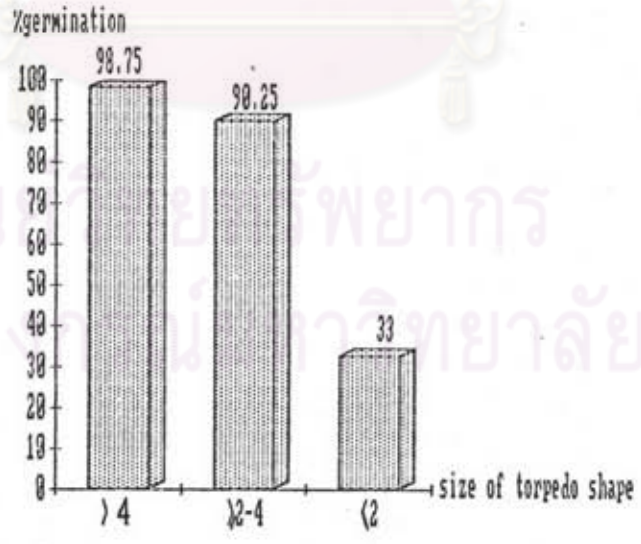
3 = เอมบริออยด์ที่ยาวน้อยกว่า 2.0 มิลลิเมตร

B : เมล็ดพืชเทียมที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ

C : การเจริญของเมล็ดพืชเทียมแครอท

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน 3 ขนาด จากจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่เพาะทดสอบความงอก 400 เมล็ด

ขนาดของเอมบริออยด์ที่นำมาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม(มม.)	จำนวนต้นที่นับทั้งหมด ซ้ำที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	รวมเมล็ดพืชเทียมที่งอกทั้งหมด	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย
กลุ่มที่ 1 ขนาดของเอมบริออยด์ >4.0	50	50	49	49	50	49	50	48	395	98.75
กลุ่มที่ 2 ขนาดของเอมบริออยด์ >2.0 ถึง 4.0 มม.	41	44	45	45	48	48	44	46	361	90.25
กลุ่มที่ 3 ขนาดของเอมบริออยด์ <2.0 มม.	15	14	12	16	20	21	18	16	132	33.00



กราฟที่ 6 เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน 3 ขนาด ที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ เฉลี่ยจากกลุ่มละ 400 เมล็ด

ตารางที่ 12 Duncan's multiple-range test ของการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่มีเอมบริออยด์ขนาดต่าง ๆ กัน 3 ขนาด จากจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่เพาะทดสอบความงอก 400 เมล็ด

ขนาดของเอมบริออยด์ที่นำมาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม(มม.)	รวมเมล็ดพืชเทียมที่งอกทั้งหมด	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT
กลุ่มที่ 1 ขนาดของเอมบริออยด์ >4.0	395	98.75	a
กลุ่มที่ 2 ขนาดของเอมบริออยด์ >2.0 ถึง 4.0	361	90.25	b
กลุ่มที่ 3 ขนาดของเอมบริออยด์ <2.0	132	33.00	c

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอทในสภาพปลอดเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของสูตรอาหารที่เติมลงไปในวัสดุเพาะ ได้แก่ MS และ WP โดยมีน้ำประปาเป็นชุดการทดลองควบคุม ผลการทดสอบความงอกดังแสดงไว้ในตารางที่ 13

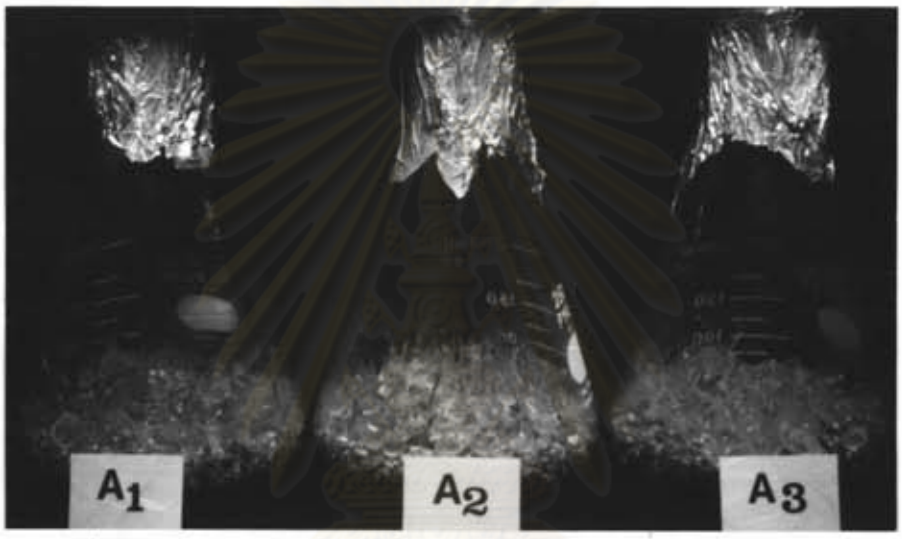
เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมแครอทที่เพาะในสูตรอาหารทดสอบ 2 สูตร และน้ำประปา ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 13) เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมที่เพาะในสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร และน้ำประปา ใกล้เคียงกันมาก (กราฟที่ 7) โดยมีชุดการทดลอง A_2 ที่เติม WP ลงไปในวัสดุเพาะ มีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 98.75 เปอร์เซนต์

ลักษณะการงอกของเมล็ดพืชเทียมเหมือนกับการงอกของเมล็ดพืชในธรรมชาติโดยทั่ว ๆ ไป เอมบริออยด์ภายในเมล็ดพืชเทียมจะงอกส่วนของรากและยอดออกมาพ้นเปลือกเมล็ดพืชเทียมภายในวันที่ 2 ของการเพาะเมล็ดพืชเทียมแครอท พบส่วนของรากพัฒนาได้เร็วกว่าส่วนของยอดในระหว่างการงอก ต้นพืชใหม่ที่งอกจากเมล็ดพืชเทียมประกอบไปด้วยส่วนของราก ส่วนไฮโปโคทิล ใบเลี้ยง ก้านใบ และใบ มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงเช่นเดียวกับต้นพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดจริง (ภาพที่ 9C)

6. การศึกษาผลทางกายภาพที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมแครอท

ปัจจัยทางกายภาพที่ใช้ในการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมแครอท ได้แก่ อุณหภูมิ และสภาพของแสง โดยเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมแครอทที่ผลิตได้ไว้ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่รองก้นขวดด้วยกระดาษกรอง เพื่อช่วยให้มีการดูดซับอาหารและความชื้นได้ดีขึ้น เก็บเมล็ดพืชเทียมแครอท 50 เมล็ดต่อขวด ไว้ในอุณหภูมิ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง หลังจากนั้นนำเมล็ดพืชเทียมออกมาเพาะทดสอบความงอกเพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมแครอทที่เก็บไว้ในสภาวะต่าง ๆ กัน ทุก 1 สัปดาห์ เก็บเมล็ดพืชเทียมเป็นเวลา 2 สัปดาห์

เมล็ดพืชเทียมแครอทที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง สัปดาห์แรกพบว่าไม่มีการงอกของเมล็ดพืชเทียมเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำเมล็ดพืชเทียมแครอทนั้นมาทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อ ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส พบว่าเมล็ดพืชเทียมแครอทงอกได้ไม่ดีนัก (ภาพที่ 11A) มีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 10 ผลของสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท

A_1 ได้แก่ สูตรอาหาร MS (1962)

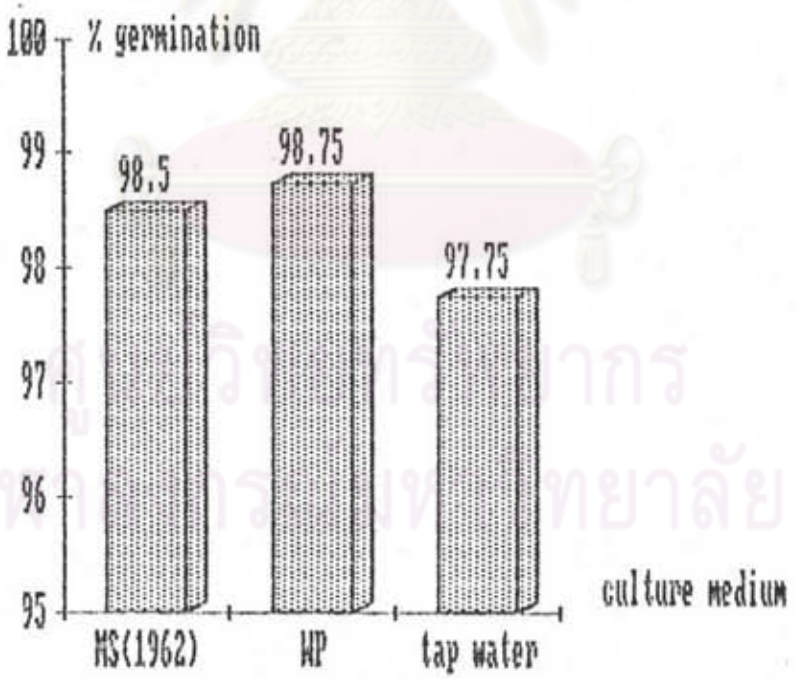
A_2 ได้แก่ น้ำปุ๋ยสูตร WP

A_3 ได้แก่ น้ำประปา เป็นการทดลองควบคุม

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอทในสูตรอาหารทดสอบ 3 สูตร ที่ผสมลงในวัสดุเพาะ จำนวน 8 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด รวมเมล็ดพืชเทียมที่เพาะทดสอบความงอก 400 เมล็ด(นับหลังจากเพาะแล้ว 14 วัน)

สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบ	จำนวนต้นที่นับทั้งหมด ซ้ำที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	รวมเมล็ดพืชเทียมที่งอกทั้งหมด	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT
A_1 (MS)	49	48	50	50	47	50	50	50	349	98.50	a
A_2 (WP)	50	50	49	49	50	49	50	49	395	98.75	a
A_3 (น้ำ)	49	48	49	50	48	50	49	48	391	97.75	a

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

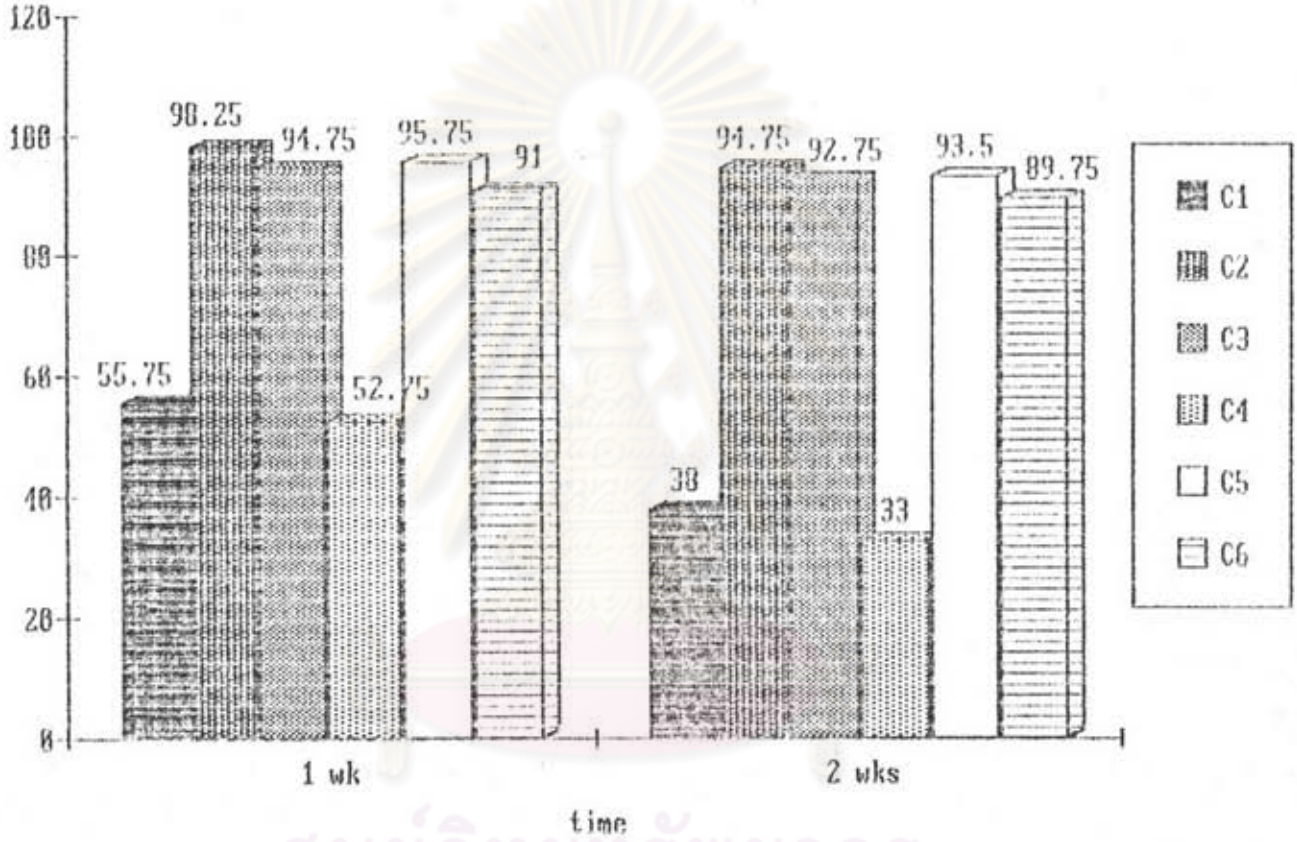


กราฟที่ 7 เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เพาะทดสอบความงอกในสูตรอาหารทดลอง 3 สูตรที่แตกต่างกัน เฉลี่ยจากการทดลองละ 400 เมล็ด

ในที่มีแสงเท่ากับ 55.75 เปอร์เซนต์ และ 52 เปอร์เซนต์ ในที่มืด (ตารางที่ 14, 15, 16 และกราฟที่ 8) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 16) ในสัปดาห์ที่ 2 ของการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมแครอทในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง พบว่าไม่มีการงอกของเมล็ดพืชเทียมเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา แต่กลับพบว่าบางเมล็ดพืชเทียมส่วนของเอมบริออยด์จะตายไป โดยลักษณะของเอมบริออยด์เปลี่ยนจากสีเขียวหรือเหลืองนวลไปเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล เมื่อนำมาทดสอบความงอก เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยลดลงจากสัปดาห์แรกของการเก็บรักษา โดยที่เมล็ดซึ่งเก็บในที่สว่างงอกได้ 38 เปอร์เซนต์ และที่เก็บในที่มืดงอกได้ 33 เปอร์เซนต์ (กราฟที่ 8) การงอกและการเจริญของพืชไม่ดีนัก (ภาพที่ 11A) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ ความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอทที่เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 14, 15 และ 16)

เมล็ดพืชเทียมของแครอทที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง พบว่าในระหว่างการเก็บ เมล็ดพืชเทียมเกือบทุกเมล็ดมีการงอกเกิดขึ้นตามปกติ เช่นเดียวกับการทดสอบความงอกโดยทั่ว ๆ ไปในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเก็บเมล็ดพืชเทียมครบ 1 สัปดาห์ นำมาเพาะทดสอบความงอก เมล็ดพืชเทียมสามารถงอกและเจริญได้ดี (ภาพที่ 11B) โดยที่เมล็ดซึ่งเก็บในที่สว่างได้ 98.25 เปอร์เซนต์ และที่เก็บในที่มืดงอกได้ 95.75 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17 และกราฟที่ 8) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง เมื่อเก็บเมล็ดพืชเทียมครบ 2 สัปดาห์ การเจริญของเมล็ดพืชเทียมที่งอกในระหว่างการเก็บในขวดมีมากกว่าสัปดาห์แรก โดยเฉพาะเมล็ดที่อยู่ส่วนบนของขวดสามารถงอกได้ดี ในขณะที่เมล็ดที่อยู่บริเวณก้นขวดกลับงอกได้ไม่ดี เมื่อนำมาทดสอบความงอกพบว่าเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยลดลงจากสัปดาห์แรก โดยที่เมล็ดซึ่งเก็บในที่สว่างงอกได้ 94.75 เปอร์เซนต์ และที่เก็บในที่มืดงอกได้ 93.5 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17 และกราฟที่ 8) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17)

สำหรับเมล็ดพืชเทียมแครอทที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง เมล็ดพืชเทียมทุกเมล็ดมีการงอกเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา อาหารที่เติมระหว่างการเก็บถูกนำไปใช้และมีการระเหยแห้งไปรวดเร็วกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เมื่อนำเมล็ดพืชเทียมที่เก็บไว้ครบ 1 สัปดาห์ มาเพาะทดสอบความงอกในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยสูงใกล้เคียงกับการเก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 11C) โดยเมล็ดซึ่งเก็บในที่สว่างงอกได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 8 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอทที่เก็บในที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง ระยะเวลาในการเก็บ 1 และ 2 สัปดาห์

ตารางที่ 14 Dunscan's multiple-range test ของการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง

อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ	ระยะเวลาในการเก็บรักษา 1 สัปดาห์ เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT	ระยะเวลาในการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT
C_1=4 °C	55.75	a	38.00	a
C_2=25 °C	98.25	b	94.75	b
C_3=31 °C	94.75	b	92.75	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 15 Dunscan's multiple-range test ของการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ในที่มืด

อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ	ระยะเวลาในการเก็บรักษา 1 สัปดาห์ เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT	ระยะเวลาในการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT
C_4=4 °C	52.75	a	33.00	a
C_5=25 °C	95.75	b	93.50	b
C_6=31 °C	91.00	b	89.75	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

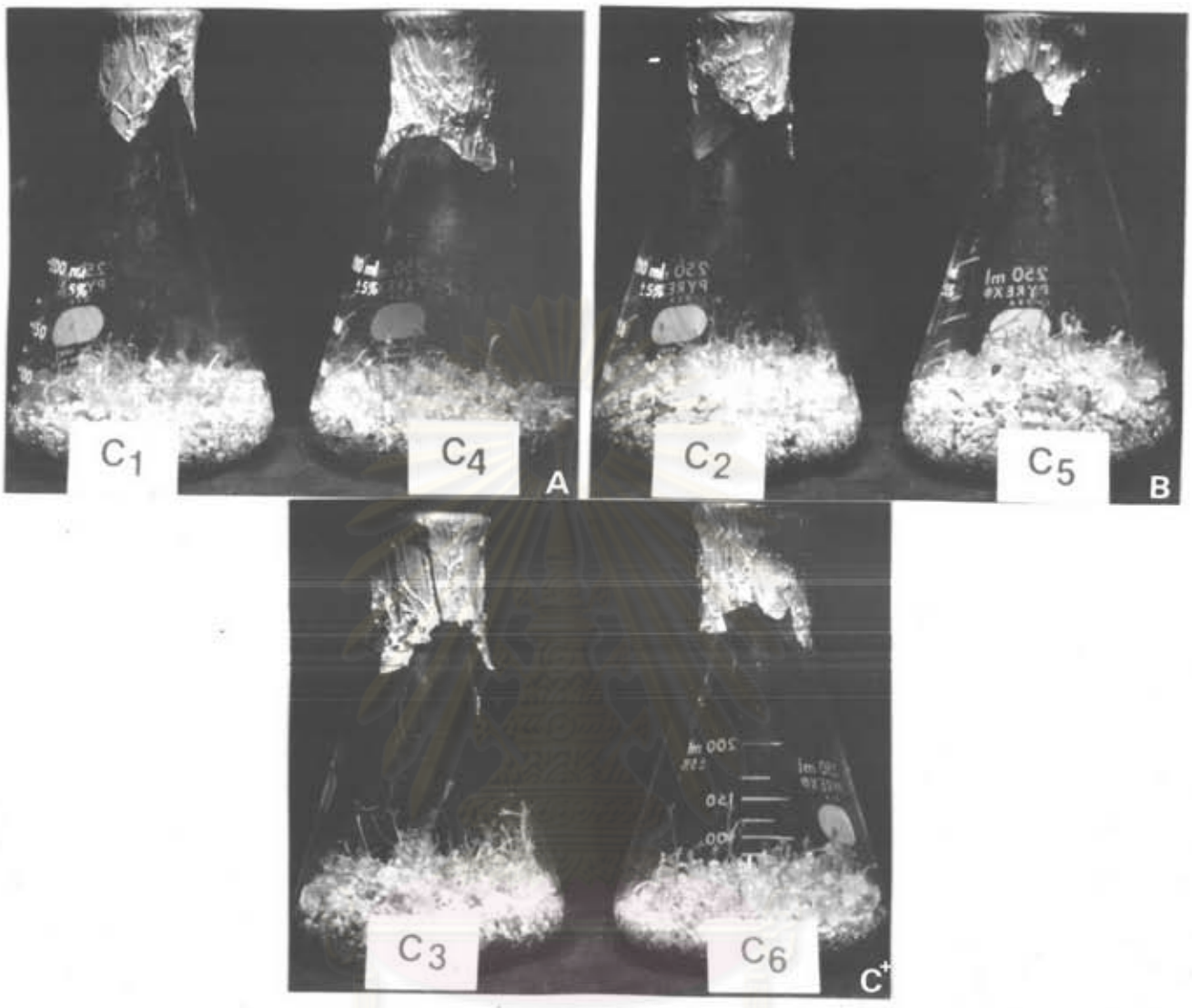
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 11 การงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิและสภาพแสงต่าง ๆ

A : เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 สัปดาห์
C_1 เก็บในที่สว่าง, C_4 เก็บในที่มืด

B : เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 สัปดาห์
C_2 เก็บในที่สว่าง, C_5 เก็บในที่มืด

C : เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 สัปดาห์
C_3 เก็บในที่สว่าง, C_6 เก็บในที่มืด



ภาพที่ 12 การงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิและสภาพแสงต่าง ๆ

A*: เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 สัปดาห์

C_1 เก็บในที่สว่าง, C_4 เก็บในที่มืด

B*: เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 สัปดาห์

C_2 เก็บในที่สว่าง, C_5 เก็บในที่มืด

C*: เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 สัปดาห์

C_3 เก็บในที่สว่าง, C_6 เก็บในที่มืด

ตารางที่ 16 Duncan's multiple-range test ของการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง ระยะเวลาในการเก็บ 1 สัปดาห์

สภาพแสงที่เก็บรักษา	ระยะเวลาในการเก็บ 1 สัปดาห์ อุณหภูมิที่เก็บ					
	4 °C		25 °C		31 ° C	
	เปอร์เซนต์ความงอก	DMRT	เปอร์เซนต์ความงอก	DMRT	เปอร์เซนต์ความงอก	DMRT
ที่มืด	52.95	a	95.75	b	91.00	b
ที่สว่าง	55.75	a	98.25	b	94.75	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 17 Duncan's multiple-range test ของการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท ที่เก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มืดและที่สว่าง ระยะเวลาในการเก็บ 2 สัปดาห์

สภาพแสงที่เก็บรักษา	ระยะเวลาในการเก็บ 2 สัปดาห์ อุณหภูมิที่เก็บ					
	4 °C		25 °C		31 ° C	
	เปอร์เซนต์ความงอก	DMRT	เปอร์เซนต์ความงอก	DMRT	เปอร์เซนต์ความงอก	DMRT
ที่มืด	33.00	a	93.50	b	89.75	b
ที่สว่าง	38.00	a	94.75	b	92.75	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

94.75 เปอร์เซนต์ และที่เก็บในที่มืดงอกได้ 91.00 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17 และกราฟที่ 8) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติ พบว่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17) เมื่อนำเมล็ดพืชเทียมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในที่สว่างและที่มืดมาทดสอบความงอก พบว่าการงอกเกิดได้ไม่ดีเท่ากับสัปดาห์แรก ทั้งนี้เพราะว่ามีบางต้นของพืชตายไป เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยลดลงจากการเก็บรักษาในสัปดาห์แรก โดยที่เมล็ดซึ่งเก็บในที่สว่างงอกได้ 92.75 เปอร์เซนต์ และที่เก็บในที่มืดงอกได้ 89.75 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17 และกราฟที่ 8) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติเปรียบเทียบผลของแสงและอุณหภูมิที่เก็บ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมที่ 4, 25 และ 31 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงสว่าง พบว่าการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ โดยมีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยต่ำทั้งที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17) สำหรับในที่มืดก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับในที่สว่าง (ตารางที่ 14, 15, 16 และ 17)

7. <u>ผลการศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพืชเทียมแคร็อท</u>

เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของเบนโนมิลที่เหมาะสมต่อการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราที่อาจจะเกิดกับเมล็ดพืชเทียม โดยใช้เบนโนมิลความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมลงไปในน้ำบุ๋ยสูตร WP หรือผสมลงในเอนโดสเปิร์มเทียม หรือผสมลงในน้ำบุ๋ยสูตร WP และเอนโดสเปิร์มเทียมทั้ง 2 อย่าง เพาะเมล็ดพืชเทียมเพื่อทดสอบความงอกขวดละ 50 เมล็ด ชุดการทดลองละ 8 ขวด รวมเมล็ดพืชเทียมที่ทดสอบความงอกต่อ 1 ชุดการทดลองเท่ากับ 400 เมล็ด

7.1 <u>ผลของการใช้เบนโนมิลผสมลงในน้ำบุ๋ยสูตร WP</u>

เมื่อผสมเบนโนมิลความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในน้ำบุ๋ยสูตร WP ที่ใช้เพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียม พบว่าความเข้มข้นของเบนโนมิลในช่วง 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมอยู่ในเกณฑ์ที่สูง คือมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 18) เมล็ดพืชเทียมที่งอกในความเข้มข้นของเบนโนมิลในช่วง 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตรนี้มีลักษณะตลอดจนความแข็งแรงเหมือนกันกับเมล็ดพืชเทียมที่เพาะทดสอบในชุดการทดลองควบคุม D_1 ที่ไม่ได้เติมเบนโนมิล (ภาพที่ 13) ส่วนความเข้มข้นของเบนโนมิลในช่วง 40 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น พบว่าเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมต่ำ (ตารางที่ 18) โดยเฉพาะชุดการทดลอง D_7 ที่เติมเบนโนมิลความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซนต์ความ

ภาพที่ 13 การงอกของเมล็ดพืชเทียมในเบนโนมิลความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 มิลลิกรัมต่อลิตร

D_1-D_7 ผสมเบนโนมิลลงในน้ำบุ๋ย

D_8-D_{14} ผสมเบนโนมิลลงในเอนโดสเปิร์มเทียม

D_{15}-D_{21} ผสมเบนโนมิลลงในน้ำบุ๋ยและเอนโดสเปิร์มเทียม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งอกเท่ากับ 9 เปอร์เซนต์ มีการตายของเอมบริออยด์เกิดสูงมากโดยที่เอมบริออยด์จะเปลี่ยนจากสีเขียวมาเป็นสีน้ำตาลหรือดำ และตายไปในที่สุด เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบผลของเบนโนมิลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่มีต่อการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท พบว่าช่วงความเข้มข้นของเบนโนมิล 0 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีเปอร์เซนต์ความงอกสูงเกินกว่าร้อยละ 90 (ตารางที่ 18 และกราฟที่ 9) ส่วนความเข้มข้นของเบนโนมิลช่วง 40 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 18) และมีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยต่ำกว่าร้อยละ 40 (กราฟที่ 9)

7.2 ผลของการใช้เบนโนมิลผสมลงในเอนโดสเปิร์มเทียม

ผสมเบนโนมิลความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบลงในอาหารสูตรที่นำมาทำเป็นเอนโดสเปิร์มเทียม ผลการทดลองปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้นของเบนโนมิล 5 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมสูงกว่า 90 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 18 และกราฟที่ 9) การงอกของเมล็ดพืชเทียมดำเนินไปตามปกติเช่นเดียวกันกับการเพาะในชุดการทดลองควบคุม D_8 ที่ไม่เติมเบนโนมิล (ภาพที่ 13) สำหรับความเข้มข้นของเบนโนมิล 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมเท่ากับ 87.25 เปอร์เซนต์ ลักษณะการงอกของเมล็ดพืชเทียมปกติต่างจากความเข้มข้นของเบนโนมิลในช่วง 40 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมต่ำกว่า 35 เปอร์เซนต์ (กราฟที่ 9) เมล็ดพืชเทียมมีอัตราการตายสูง ต้นที่งอกมีลักษณะไม่แข็งแรงเท่ากับการใช้ความเข้มข้นของเบนโนมิลในระดับต่ำ ๆ เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบผลของเบนโนมิลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่ผสมลงในเอนโดสเปิร์มเทียมต่อการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ในหลาย ๆ ความเข้มข้น (ตารางที่ 18)

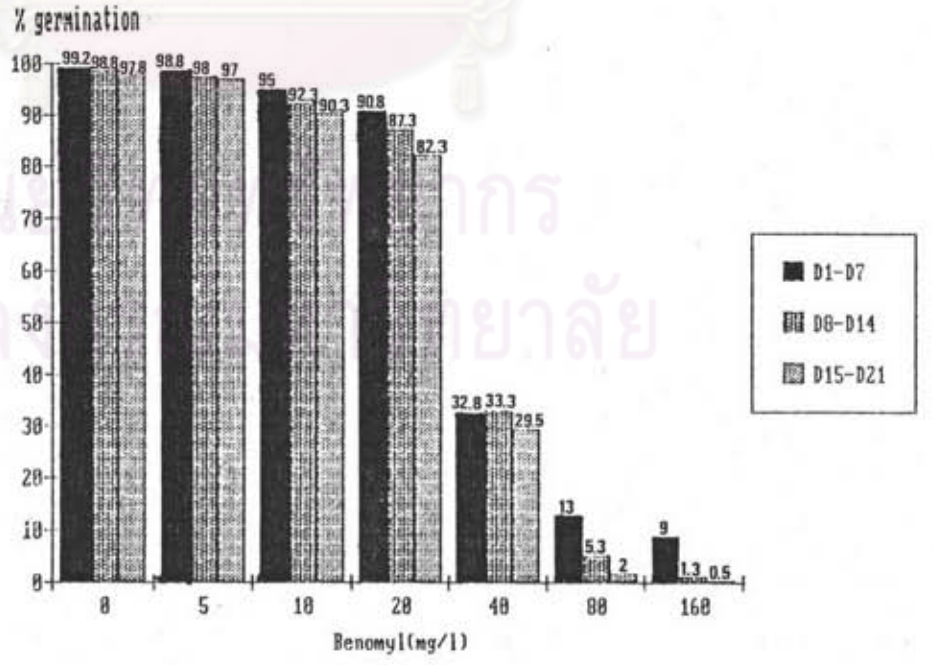
7.3 ผลของการใช้เบนโนมิลผสมลงในน้ำปุ๋ยสูตร WP และเอนโดสเปิร์มเทียม

จากตารางที่ 18 และกราฟที่ 9 พบว่าเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมสูงมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ เมื่อเติมเบนโนมิลความเข้มข้น 5 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหารและเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยเท่ากับ 82.25 เปอร์เซนต์ ในชุดการทดลอง D_{18} ที่เติมเบนโนมิล 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะการงอกและความแข็งแรงของต้นพืชที่งอกจากเมล็ดพืชเทียมที่เติมเบนโนมิลความเข้มข้น 5 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการสังเกตและประเมินผลด้วยตาเปล่า พบว่ามีลักษณะเหมือนกับการเพาะทดสอบในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมเบนโนมิล (ภาพที่ 13) และมีลักษณะตลอดจนความแข็งแรงเหมือนกับต้นพืชที่งอกจากเมล็ดในธรรมชาติ ความเข้มข้นของเบนโนมิลในช่วง 40 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการ

ตารางที่ 18 ผลของเบนโนมิลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่ผสมลงในน้ำบุ้ยสูตร WP หรือ เอนโดสเปิร์มเทียม หรือทั้งน้ำบุ้ยสูตร WP และเอนโดสเปิร์มเทียม ต่อการงอก ของเมล็ดพืชเทียม เฉลี่ยจากชุดการทดลองละ 400 เมล็ด

ความเข้มข้นของเบนโนมิล (มก./ล.)	สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลอง	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT	สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลอง	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT	สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลอง	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT
0	D_1	99.25	a	D_8	98.75	a	D_{15}	97.75	a
5	D_2	98.75	a	D_9	97.50	a	D_{16}	97.00	a
10	D_3	95.50	a	D_{10}	92.25	b	D_{17}	90.25	b
20	D_4	90.75	a	D_{11}	87.25	c	D_{18}	82.25	c
40	D_5	32.75	b	D_{12}	33.25	d	D_{19}	29.50	d
80	D_6	13.00	c	D_{13}	5.25	c	D_{20}	2.00	c
160	D_7	9.00	c	D_{14}	1.25	c	D_{21}	0.50	c

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



กราฟที่ 9 เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอทที่เพาะทดสอบในน้ำบุ้ยสูตร WP ที่เติมเบนโนมิลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เฉลี่ยจากชุดการทดลองละ 400 เมล็ด

งอกของเมล็ดพืชเทียมอย่างมาก เปอร์เซนต์การงอกต่ำกว่าร้อยละ 30 และต่ำที่สุดเมื่อใช้เบนโนมิลความเข้มข้น 80 และ 160 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย 2.00 และ 0.5 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่งนับว่าต่ำมาก (ตารางที่ 18 และกราฟที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 18)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของ D_1 ถึง D_4 > D_8 ถึง D_{11} > D_{15} ถึง D_{18} (ตารางที่ 18) ส่วนความเข้มข้นของเบนโนมิลตั้งแต่ 40 ถึง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลไม่ดีทุก ๆ ชุดของการทดลอง (ตารางที่ 18) มีอัตราการตายของเอมบริออยด์สูง เปอร์เซนต์ความงอกต่ำ

ข. ยาสูบ (Nicotina rustica Linn.)

การศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียมยาสูบ โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบ่งการรายงานผลออกเป็น

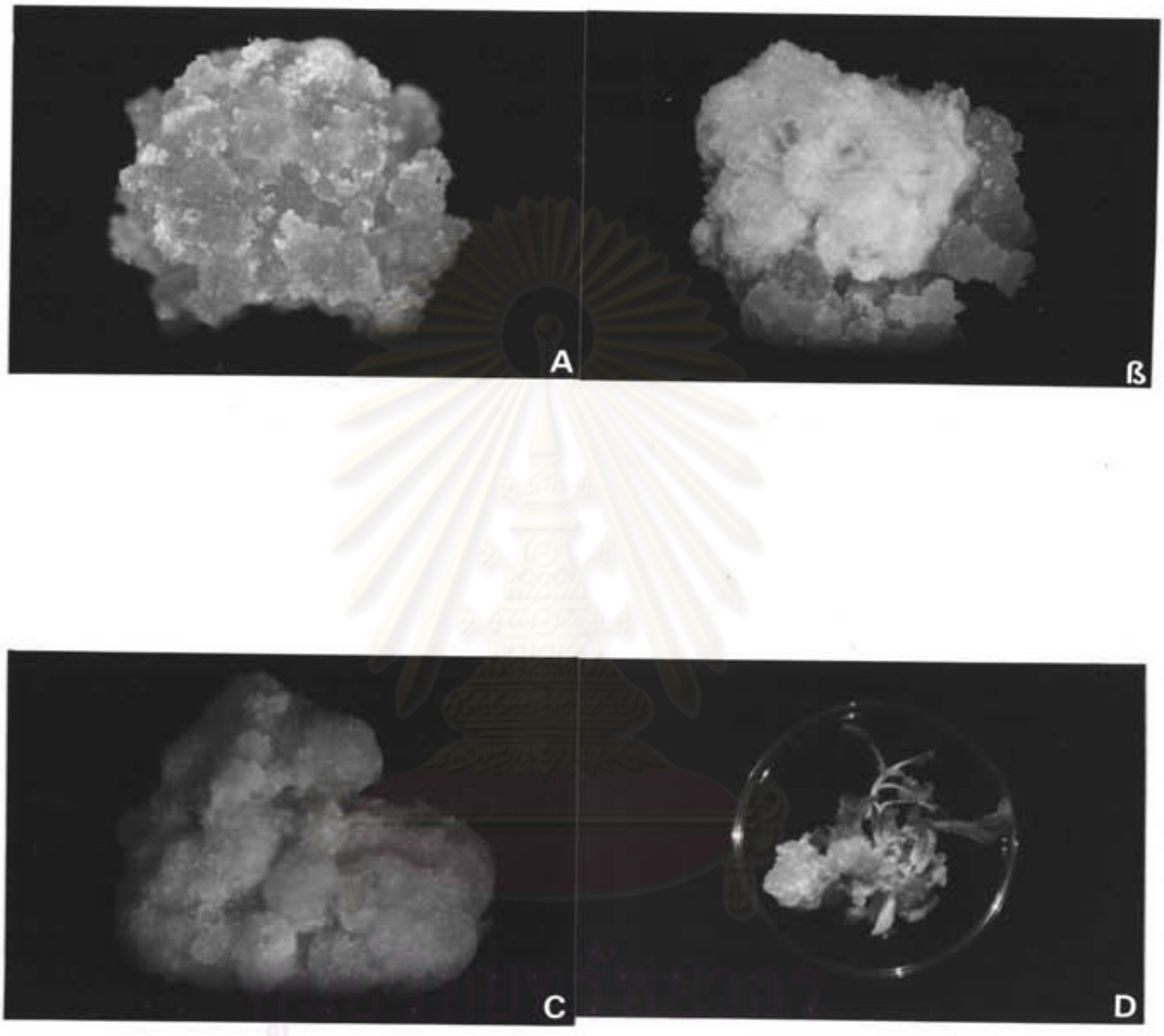
1. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส
2. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์
3. ผลการศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียม
4. ผลการศึกษาการเพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ

1. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้น ก้านใบ และใบของต้นยาสูบที่เพาะในสภาพปลอดเชื้ออายุ 2 สัปดาห์ ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารพื้นฐานของ MS (1962) โดย Evan et al. (1981) ตามภาคผนวก ก ข้อ 1 ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด สังเกตผลการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้คะแนนแคลลัสโดยคะแนนขึ้นอยู่กับขนาดของแคลลัส สำหรับการชักนำแคลลัสของยาสูบ ขนาดของแคลลัสที่โตที่สุดมีคะแนนเต็ม 7.00 คะแนน จากการสังเกตด้วยตาเปล่าและการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญดังต่อไปนี้

1.1 เนื้อเยื่อส่วนลำต้นของต้นกล้ายาสูบ

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนลำต้นของต้นกล้ายาสูบที่นำมาเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง มีการเจริญเป็นแคลลัสที่มีเนื้อประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันค่อนข้างแน่นในระยะสัปดาห์ที่ 2 ของการเจริญ พบแคลลัสสีขาว ขาวเหลือง และเขียวขาว เมื่อแคลลัสมี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 14 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน

A : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวใส กำลังขยาย 3 เท่า

B : กลุ่มเซลล์สีเขียวปุยขาวเจริญบนแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวใส กำลังขยาย 3 เท่า

C : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว กำลังขยาย 3 เท่า

D : ยอดใหม่ที่พัฒนาพร้อม ๆ กับการเจริญของแคลลัส

อายุประมาณ 3 สัปดาห์ บริเวณตรงกลางก้อนแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ต่อมาพบแคลลัสเนื้อเยื่อสีเขียวใสจำนวนมากในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 14A) แคลลัสลักษณะนี้จะมีการเจริญแผ่ออกไปบนอาหาร ในระยะต่อมาเริ่มมีกลุ่มเซลล์สีเขียวปุยสีขาวเจริญอยู่บนแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวใส (ภาพที่ 14 B) กลุ่มเซลล์สีเขียวปุยขาวนี้เป็นกลุ่มเซลล์ที่จับกันอย่างหนาแน่น เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่าเนื้อของแคลลัสมีความละเอียดมากกว่าแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวใส ส่วนแคลลัสสีเขียวอีกลักษณะหนึ่งที่พบจากการชักนำแคลลัสส่วนลำต้นมีลักษณะเป็นแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว มีผิวเนื้อละเอียดจับกันแน่นทึบก้อน (ภาพที่ 14C) และบางแคลลัสพบการพัฒนาของยอดใหม่เกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญของแคลลัส (ภาพที่ 14D)

การชักนำแคลลัสส่วนลำต้นของต้นกล้ายาสูบในที่มืด พบแคลลัสลักษณะเหมือนกันกับแคลลัสที่ชักนำในที่สว่าง เป็นแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันแน่น แคลลัสจะเจริญมาจากรอยตัดของชิ้นส่วนพืช

ข. <u>ปริมาณและขนาดของแคลลัส</u> เนื้อเยื่อส่วนลำต้นของต้นกล้ายาสูบที่ชักนำแคลลัสในที่สว่าง เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อประเมินผลจากการวัดขนาดและการสังเกตด้วยตาเปล่า โดยมีคะแนนเฉลี่ย 6.50 คะแนน สำหรับการเจริญของแคลลัสในที่มืด มีคะแนนเฉลี่ยเป็น 5.20 คะแนน (ตารางที่ 19 และกราฟที่ 12) จากการวัดผลของคะแนนเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 6 เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำแคลลัสส่วนลำต้นของต้นกล้ายาสูบในที่มืดและที่สว่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 21)

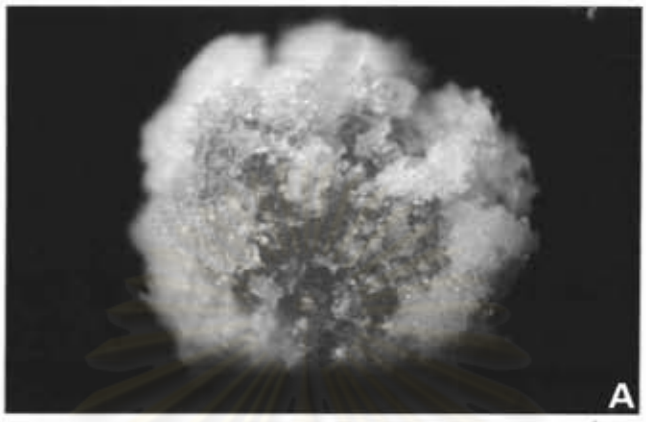
1.2 <u>เนื้อเยื่อส่วนก้านใบของต้นกล้ายาสูบ</u>

ก. <u>ลักษณะของแคลลัส</u> เนื้อเยื่อส่วนก้านใบของต้นกล้ายาสูบที่นำมาเลี้ยง พบแคลลัส 2 ลักษณะ คือ

1. แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันแน่นสีเขียวอยู่บริเวณตรงกลางก้อนแคลลัส ส่วนบริเวณรอบ ๆ ก้อนแคลลัสมีกลุ่มเซลล์เป็นปุยสีขาวล้อมรอบส่วนของแคลลัสที่มีสีเขียว แคลลัสลักษณะนี้เจริญมาจากบริเวณรอยตัดและบริเวณโดยรอบส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง (ภาพที่ 15A)

2. แคลลัสสีขาวใส ประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ก้อนกลม ๆ สีขาวใสเกาะกันอย่างหลวม ๆ เจริญแผ่ออกไปบนอาหาร (ภาพที่ 15B)

แคลลัสส่วนก้านใบยาสูบที่ชักนำในที่มืด พบแคลลัสมีลักษณะเดียวกันกับแคลลัสที่ชักนำในที่สว่าง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 15 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนก้านใบของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน
A : แคลลัสเนื้อแน่นสีเขียว มีเซลล์สีขาวล้อมรอบ กำลังขยาย 3 เท่า
B : แคลลัสสีขาวใส กำลังขยาย 3 เท่า

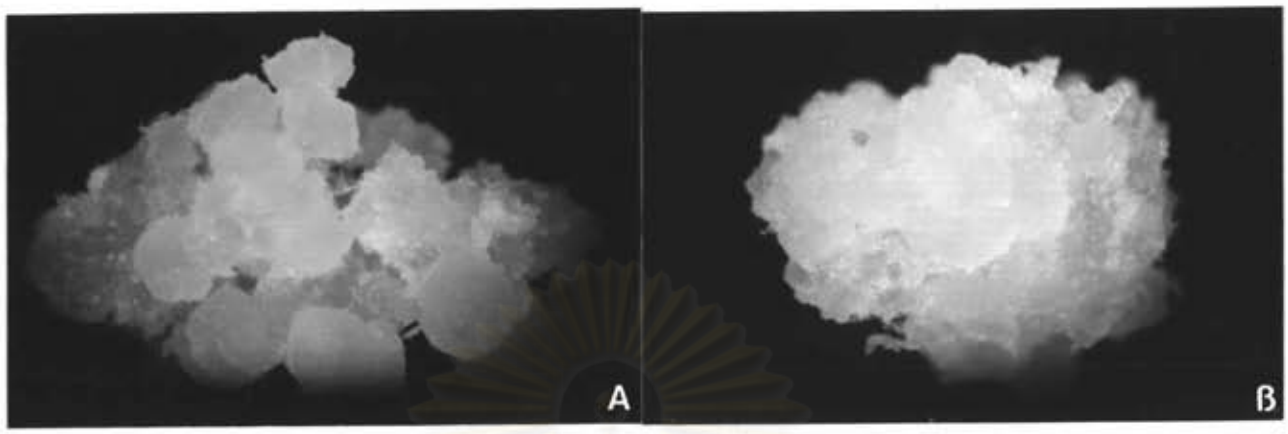
ข. ปริมาณและขนาดของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนก้านใบต้นกล้ายาสูบที่ชักนำในที่มีแสงสว่างเกิดแคลลัสได้ดีกว่าชักนำในที่มืด มีปริมาณของแคลลัสที่เกิดสูงกว่าและขนาดโตกว่า โดยมีคะแนนเฉลี่ย 5.00 คะแนน สำหรับการชักนำแคลลัสในที่สว่าง และ 3.37 คะแนน สำหรับการชักนำแคลลัสในที่มืด (ตารางที่ 19 และกราฟที่ 12) ปริมาณของแคลลัสที่ชักนำในที่มืดพบน้อยมาก บางชิ้นส่วนของพืชที่ไม่เกิดแคลลัส เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำแคลลัสส่วนก้านใบต้นกล้ายาสูบในที่มืดกับที่สว่าง พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 21)

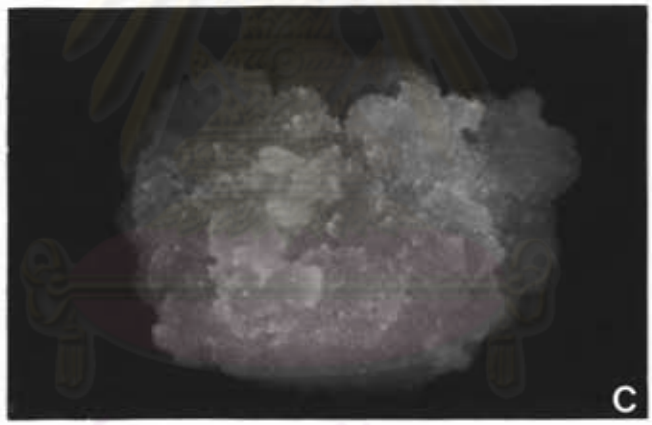
1.3 เนื้อเยื่อส่วนใบของต้นกล้ายาสูบ

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนใบของต้นกล้ายาสูบที่นำมาเลี้ยงโดยใช้มีดกรีดส่วนของแผ่นใบให้เกิดรอยแผลตามความยาวของแผ่นใบ พบว่าให้ผลดีในการชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อเปรียบเทียบกับใบที่ไม่ได้กรีด แคลลัสเกิดตรงส่วนที่กรีด พบแคลลัสสีเขียว แคลลัสสีเหลืองนวลและขาวใส ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์มีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็ก ๆ เกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 16A และภาพที่ 16B) พบได้ทั้งในที่มืดและที่สว่าง แต่แคลลัสที่ชักนำในที่มืดแคลลัสมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 16C) แคลลัสเหล่านี้เกิดจากบริเวณรอยแผลและรอยตัดระหว่างตัวใบกับก้านใบ

ข. ปริมาณและขนาดของแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 6 แคลลัสที่เกิดบริเวณรอยแผลมีการเพิ่มปริมาณและขนาดอย่างรวดเร็วไม่ว่าจะชักนำในที่สว่างหรือที่มืด โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 6.45 คะแนน และ 6.50 คะแนน ตามลำดับ (ตารางที่ 19 และกราฟที่ 12) เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบการชักนำแคลลัสส่วนใบของต้นกล้ายาสูบในที่มืดกับที่สว่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 21)

ศึกษาเปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้น ก้านใบ และใบของต้นกล้ายาสูบในที่มืดและที่สว่าง โดยการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple-range test พบว่าเนื้อเยื่อส่วนลำต้นและใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติไม่ว่าจะชักนำแคลลัสในที่สว่างหรือที่มืด แต่เนื้อเยื่อส่วนก้านใบให้แคลลัสได้ไม่ดีทั้งในที่มืดและที่สว่าง พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 20)





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 16 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน (ภาพ A และ B) และในที่มืด (ภาพ C)

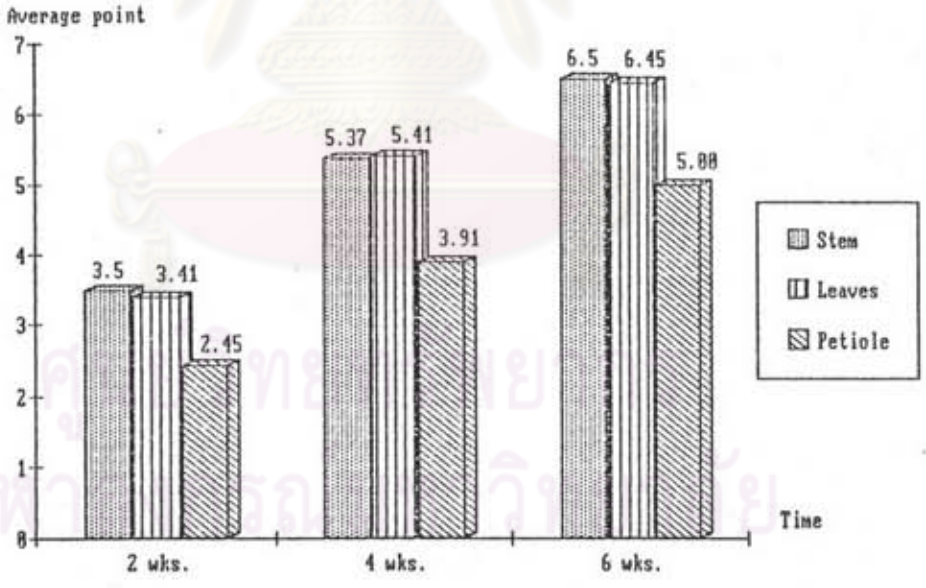
A : แคลลัสสีเขียวใส มีกลุ่มเซลล์รูปร่างกลมเกาะอยู่อย่างหลวม ๆ กำลังขยาย 3 เท่า

B : แคลลัสสีขาวหรือเหลืองนวล กำลังขยาย 3 เท่า

C : แคลลัสสีน้ำตาล กำลังขยาย 3 เท่า

ตารางที่ 19 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้น ก้านใบ และใบ ของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 โดยมีคะแนนเต็ม 7.00 คะแนน

ส่วนของพืช	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	ขนาดของแคลลัส (ให้เป็นคะแนน)					
		สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 6	
		ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด	ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด	ที่มีแสงสว่าง	ที่มืด
ลำต้น	120	3.50	2.70	5.37	4.16	6.50	5.20
ก้านใบ	120	2.41	1.79	3.91	2.87	5.00	3.37
ใบ	120	3.41	3.37	5.41	5.62	6.45	6.50

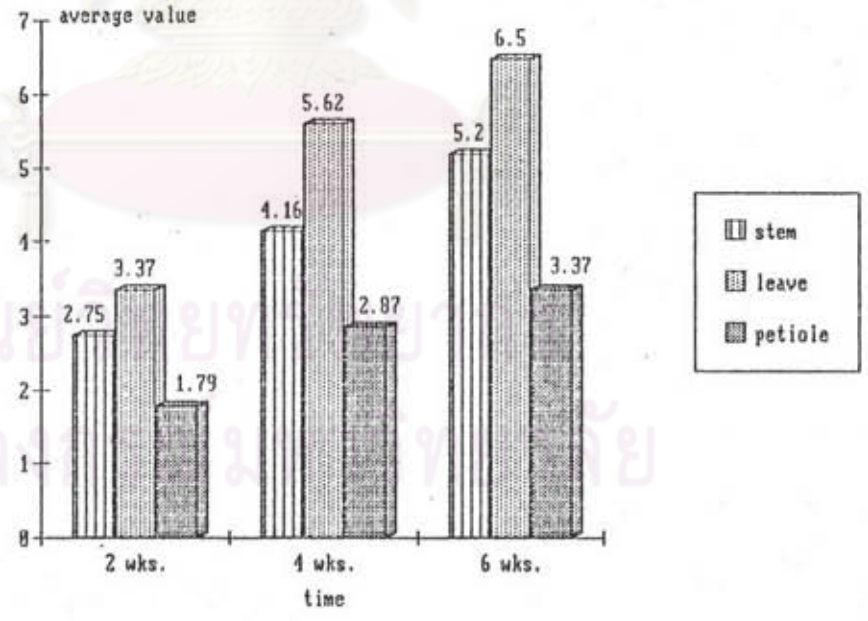


กราฟที่ 10 เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสส่วนลำต้น ใบ และก้านใบของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 จากคะแนนเต็ม 7.00 คะแนน

ตารางที่ 20 Duncan's multiple-range test ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้น ใบ และก้านใบของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 6

ส่วนของพืช	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	ชักนำแคลลัสในที่มีแสงสว่าง คะแนนเฉลี่ย	DMRT	ชักนำแคลลัสในที่มืด คะแนนเฉลี่ย	DMRT
ลำต้น	120	6.50	a	5.20	a
ใบ	120	6.45	a	6.50	a
ก้านใบ	120	5.00	b	3.37	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

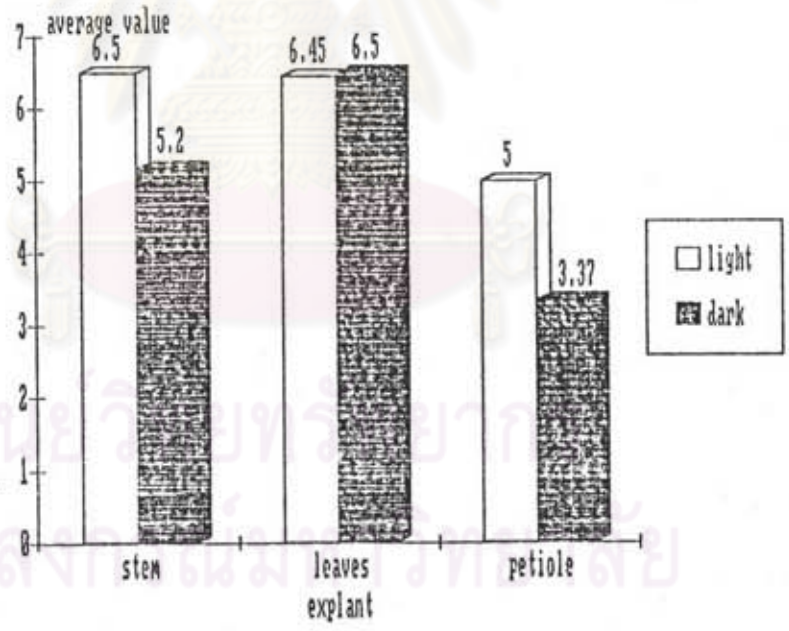


กราฟที่ 11 เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้น ใบ และก้านใบ ของต้นกล้ายาสูบในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 จากคะแนนเต็ม 7.00 คะแนน

ตารางที่ 21 Duncan's multiple-range test ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้ายาสูบ ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 6

สภาพแสงที่ใช้ในการชักนำแคลลัส	ส่วนของพืชที่ใช้ในการชักนำแคลลัส					
	ลำต้น		ใบ		ก้านใบ	
	คะแนนเฉลี่ย	DMRT	คะแนนเฉลี่ย	DMRT	คะแนนเฉลี่ย	DMRT
มีแสงสว่าง	6.50	a	6.45	a	5.00	b
ไม่มีแสงสว่าง	4.66	a	6.50	a	3.37	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์



กราฟที่ 12 เปรียบเทียบผลการชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้น ใบ และก้านใบ ของต้นกล้ายาสูบในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน กับในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 6 จากคะแนนเต็ม 7.00 คะแนน

2. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆในการศึกษาและการรายงานผลดังนี้

2.1 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

2.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสลักษณะต่างๆ ที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากส่วนต่างๆของต้นกล้ายาสูบ

2.4 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์และการศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis

2.1 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

แคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นกล้ายาสูบ เมื่อนำมาแบ่งเป็นก้อนๆ แต่ละก้อนหนักประมาณ 1.0 มิลลิกรัม นำมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสขวดละก้อน และย้ายลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการเจริญโดยการเพิ่มขนาดมากขึ้น แคลลัสมีลักษณะแข็งแรง ทำการเพิ่มแคลลัสจนได้แคลลัสจำนวนมากเพียงพอสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์กลุ่มเล็กๆและเพิ่มปริมาณของเซลล์พร้อมที่จะนำไปศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ต่อไป

2.3 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสลักษณะต่างๆที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากส่วนต่างๆของต้นกล้ายาสูบ

เพื่อศึกษาดูว่าแคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนใดของต้นกล้ายาสูบและเป็นแคลลัสลักษณะไหนที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุด โดนนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำมากรองด้วยตะแกรงและผ้ากรองที่มีรูขนาด 2.0,1.5,1.0,0.5 และ 0.1 มิลลิเมตร แยกเซลล์แต่ละขนาดที่ได้จากการกรอง นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์บนเครื่องเขย่า สังเกตุการเกิดเอมบริออยด์ด้วยตาเปล่า เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเอมบริออยด์ขวดต่อขวดว่า แคลลัสลักษณะใดให้เอมบริออยด์ได้ดีที่สุด และเอมบริออยด์เกิดได้ดีที่สุดจากกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเท่าใด เพื่อที่จะได้นำแคลลัสลักษณะดังกล่าวมาศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์และกระบวนการเกิด somatic embryogenesis โดยละเอียดต่อไป

ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสลักษณะต่างๆ ที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้น ใบ และก้านใบของต้นกล้ายาสูบ พบว่าแคลลัสเนื้อแน่นสีเขียวใสที่ชักนำจากส่วนลำต้น และแคลลัสสีเขียวใสมีกลุ่มเซลล์ค่อนข้างกลมสีขาวเจริญอยู่ด้วยกันที่ชักนำจากส่วนของใบ เป็นลักษณะของแคลลัสที่ให้เอมบริออยด์ได้ดีที่สุด และขนาดของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริออยด์ เป็นกลุ่มเซลล์ที่ค้างอยู่บนผ้ากรองที่มีรูขนาด 0.5 มิลลิเมตร

2.4 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์และการศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis

2.4.1 การชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

นำเซลล์แต่ละกลุ่มที่แยกได้จากการทดลองมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 2 สูตรที่แตกต่างกันบนเครื่องเขย่า โดยใส่เซลล์ที่ได้จากการกรองประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 200 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว 20 มิลลิลิตรต่อขวด จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่างๆในอาหารทดลอง 2 สูตร โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ ผลปรากฏดังแสดงไว้ในตารางที่ 22

ก. ขนาดของเซลล์ ขนาดของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุดได้แก่ กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดโตกว่าหรือเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตร จากการนับจำนวนเอมบริออยด์ในวันที่ 14 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ สำหรับกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 1.0 มิลลิเมตรพัฒนามาเป็นเอมบริออยด์ได้บ้าง แต่เอมบริออยด์ไม่สามารถพัฒนาได้จากกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่า 1 มิลลิเมตร กลุ่มเซลล์กลุ่มนี้มักมีการเจริญและการเพิ่มขนาดของเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งเซลล์กลุ่มนี้สามารถนำกลับมากรองเพื่อแยกเอาเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กๆได้อีกหลายๆ ครั้ง และกลุ่มเซลล์ที่เล็กกว่า 0.1 มิลลิเมตร ก็ไม่สามารถพัฒนามาเป็นเอมบริออยด์ได้เช่นกัน

ข. ผลของสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ เอมบริออยด์สามารถพัฒนาได้ดีในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ตามวิธีการของ Evan และคณะ (1981) ที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนเอมบริออยด์เฉลี่ยต่อขวดเท่ากับ 548 เอมบริออยด์ ในขณะที่เอมบริออยด์ที่ชักนำในอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่เติมฮอร์โมน มีจำนวนเอมบริออยด์เท่ากับ 439 เอมบริออยด์ต่อขวด (ตารางที่ 22) เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบผลของสูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 22 จำนวนเอมบริออยด์ที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 2 สูตร นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2 (เฉลี่ยจากจำนวน 3 ขวดต่อชุดการทดลอง)

ขนาดของกลุ่มเซลล์ที่แยกได้จากการกรอง (มม.)	Murashige and Skoog (1962)			Evan et.al.(1981)		
	จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด		
	globular shape	heart shape + torpedo shape	total	globular shape	heart shape + torpedo shape	total
1.5	-	-	-	-	-	-
1.0	58	69	127	65	119	184
0.5	218	221	439	243	305	548
0.1	-	-	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 Duncan's multiple-range test ของจำนวนเอมบริออยด์ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ที่แตกต่างกัน 2 สูตร เฉลี่ยจากสูตรละ 3 ขวด นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2

สูตรอาหารชักนำให้เกิดเอมบริออยด์	จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			รวมทั้งหมด	เฉลี่ยต่อขวด	DMRT.
	1	2	3			
Murashige and Skoog (1962)	144	162	130	439	145	a
Evan et.al. (1981)	185	169	194	548	181	a

หมายเหตุ : DMRT.= Duncan's multiple-range test
ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.4.2 การศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis

เมื่อศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่างๆที่ได้จากการกรอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอทุกๆ 2 วันเพื่อศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis ผลปรากฏว่ากลุ่มเซลล์ที่แยกได้จากการกรองที่ค้างอยู่บนตะแกรงที่มีรูขนาด 0.5 มิลลิเมตรนั้น มีกลุ่มเซลล์ปนกันอยู่เป็นจำนวนมาก ในชั้นกรองนี้กลุ่มเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ได้สูง

กลุ่มเซลล์ที่พบมากที่สุดเป็นกลุ่มเซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ถึง 0.5 มิลลิเมตร ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยไซโตพลาสซึม (cytoplasm)ในปริมาณมาก พบได้ในวันที่ 4 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ประมาณวันที่ 4 และ 6 เริ่มพบเอมบริออยด์ในระยะ globular shape และพบจำนวนมากขึ้นในวันที่ 8 globular shape มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือกลมรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ถึง 2.0 มิลลิเมตร หลังจากนั้นพบว่าจำนวนเอมบริออยด์ในระยะglobular ลดน้อยลง เนื่องจาก globular shape บางเอมบริออยด์ได้พัฒนาเป็นเอมบริออยด์ในระยะ heart shape มี

รูปร่างคล้ายหัวใจ โดยมีบริเวณที่พร้อมจะพัฒนาไปเป็นส่วนของใบเลี้ยงและรากเกิดขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ขนาดของ heart shape มีความยาวประมาณ 2.0 ถึง 3.0 มิลลิเมตร

หลังจากนั้นเอมบริออยด์ในระยะ heart shape เริ่มมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มขนาดของเอมบริออยด์ให้ยาวขึ้น กลายเป็นเอมบริออยด์ในระยะ torpedo shape ซึ่งมีรูปร่างคล้ายตอร์ปิโด torpedo shape มีขนาดแตกต่างกันมากมาย เอมบริออยด์ในระยะนี้พร้อมที่จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ พบว่า torpedo shape ของยาสูบ มีการพัฒนาส่วนของเอมบริออยด์ที่จะเจริญไปเป็นรากได้เด่นชัดกว่าส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นส่วนของใบและมีอัตราการเจริญค่อนข้างสูงมาก เอมบริออยด์ในระยะ heart shape และ torpedo shape มีจำนวนมากที่สุดประมาณวันที่ 21 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์บนเครื่องเขย่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียมยาสูบ

ภายหลังการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ พบว่าเอมบริออยด์ในระยะ torpedo มีจำนวนมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 วัดความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 2 ถึง 7 มิลลิเมตร ความกว้างโดยเฉลี่ย 1 ถึง 3 มิลลิเมตร torpedo มีสีขาว นำเอมบริออยด์ในระยะ torpedo มากรองบนตะแกรงที่มีรูขนาดต่างกัน เพื่อแยกเอมบริออยด์ที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน (ภาพที่ 17)

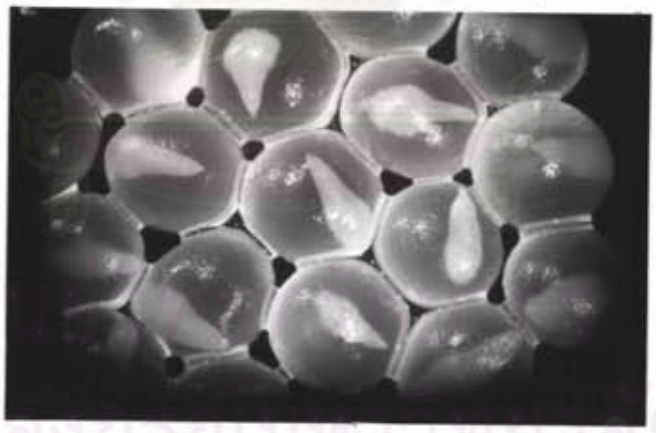
เมื่อกรองเอมบริออยด์แล้ว นำเอมบริออยด์มาผสมลงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม sodium alginate 2 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อนำมาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม โดยหยดลงใน calcium nitrate ได้เมล็ดพืชเทียมยาสูบที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดพืชเทียมประกอบไปด้วย 1 หรือ 2 เอมบริออยด์เท่านั้น (ภาพที่ 18)

4. ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้มาเพาะทดสอบความงอกในขวดที่มี vermiculite เป็นวัสดุเพาะโดยทดสอบผลของอาหารที่แตกต่างกัน ที่เติมลงในวัสดุเพาะต่อการงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบ นับจำนวนเมล็ดพืชเทียมยาสูบที่งอกทั้งหมด และเมล็ดที่ตาย นับครั้งแรก หลังจากเพาะ 7 วัน และนับครั้งสุดท้าย หลังจากเพาะ 14 วัน ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบดังแสดงไว้ในตารางที่ 23 เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบที่สูงที่สุด เท่ากับ 84.75 เปอร์เซนต์ โดยเฉพาะในวัสดุเพาะที่เติมน้ำปุ๋ยสูตร WP และมีเปอร์เซนต์ความงอก 84 เปอร์เซนต์ สำหรับเมล็ดพืชเทียมที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติม MS (1962) และในวัสดุเพาะที่เติมน้ำประปา มีเปอร์เซนต์ความงอกถึง 81 เปอร์เซนต์ เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 24)

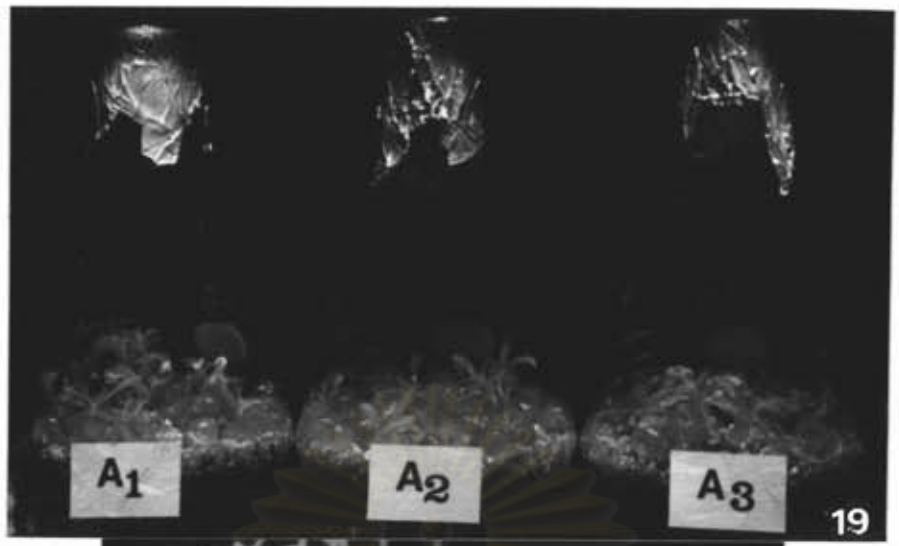
จากการสังเกตด้วยตาเปล่าถึงลักษณะการงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบ พบว่าเมล็ดพืชเทียมสามารถงอกได้ภายในวันที่ 3 ของการเพาะเมล็ดพืชเทียม โดยพบว่าส่วนของรากพัฒนาได้ดีกว่าส่วนของยอด ส่วนรากจะงอกพ้นเปลือกเมล็ดพืชเทียมประมาณวันที่ 3 หลังเพาะเมล็ดพืชเทียม ในขณะที่ส่วนของยอดโผล่พ้นเปลือกเมล็ดพืชเทียมในวันที่ 7 หลังจากการเพาะเมล็ด ต้นพืชใหม่ที่งอกจากการเพาะเมล็ดพืชเทียม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเมล็ดที่งอกจากเมล็ดจริงทุกประการ คือประกอบไปด้วยส่วนของราก ไฮโปโคทิล ใบเลี้ยง ลำต้น ก้านใบ และใบอย่างชัดเจน (ภาพที่ 20)

ภาพที่ 17 เอมบริออยด์ในระยะ torpedo ของยาสูบที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน กำลังขยาย 2 เท่า



ภาพที่ 18 เมล็ดพืชเทียมยาสูบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 19 ผลของสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบ

A_1 ได้แก่วัสดุเพาะที่เติมสูตรอาหาร MS (1962)

A_2 ได้แก่วัสดุเพาะที่เติมน้ำบุ๋ยสูตร WP

A_3 ได้แก่วัสดุเพาะที่เติมน้ำประปา เป็นการทดลองควบคุม

ภาพที่ 20 แสดงต้นพืชที่งอกจากเมล็ดพืชเทียมยาสูบ

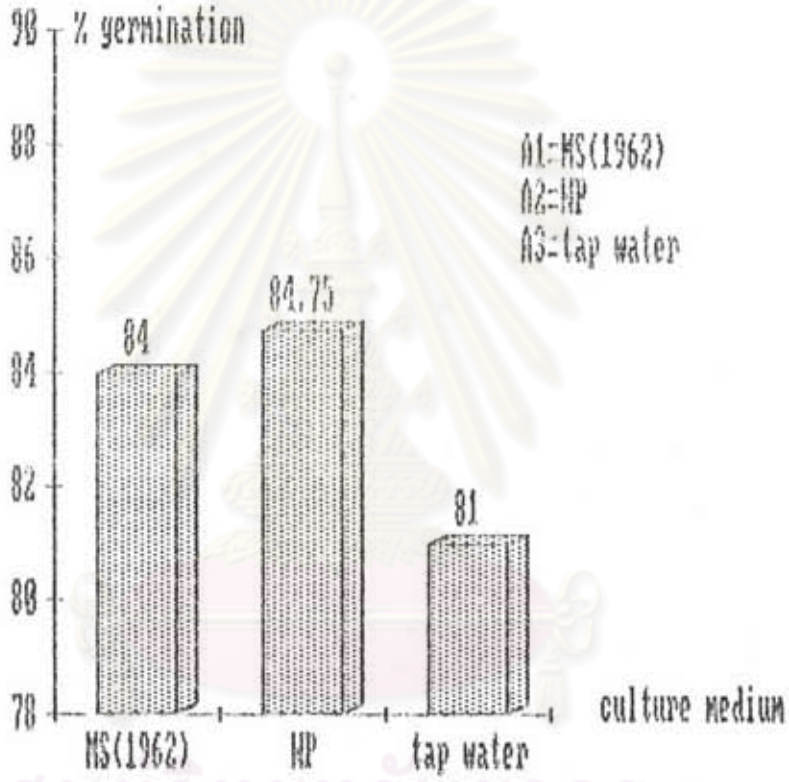
ตารางที่ 23 แสดงผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมยาสูบในสูตรอาหารทดสอบ 3 สูตร ที่ผสมลงในวัสดุเพาะ จำนวน 8 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด

สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบในวัสดุเพาะ	จำนวนต้นที่นับทั้งหมด ซ้ำที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	รวมเมล็ดพืชเทียมที่งอกทั้งหมด	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย
A_1	45	43	39	43	47	39	40	40	339	84.00
A_2	41	40	40	46	43	40	43	46	336	84.75
A_3	41	40	42	44	39	37	40	41	324	81.00

ตารางที่ 24 Duncan's multiple-range test ของการงอกของเมล็ดพืชเทียมในสภาพปลอดเชื้อ เพาะในวัสดุเพาะที่เติมสูตรอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร เฉลี่ยจากสูตรละ 400 เมล็ด

สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบในวัสดุเพาะ	จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก	เปอร์เซนต์ความงอกทั้งหมด	DMRT
A_1	339	84.00	a
A_2	336	84.75	a
A_3	324	81.00	a

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 13 เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมยาสูบ ที่เพาะทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อ ในวัสดุเพาะที่เติมสูตรอาหารทดสอบ 3 สูตรที่แตกต่างกัน เฉลี่ยจากสูตรละ 400 เมล็ด

ค. หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus officinalis Linn.)

การศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แบ่งรายงานผลการทดลองออกเป็น

1. ผลการชักนำให้เกิดแคลลัส
2. ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์
3. ผลการผลิตเมล็ดพืชเทียม
4. ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ

1. ผลการชักนำให้เกิดแคลลัส

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสส่วนตายอดหรือตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรการทดลอง 3 สูตร โดยที่สูตรอาหารทดลองสูตรที่ 1 ดัดแปลงจากสูตรอาหารพื้นฐาน White (1943) โดย Steward et al. (1971) สูตรอาหารทดลองสูตรที่ 2 ดัดแปลงจากสูตรอาหารพื้นฐานของ MS (1962) โดย Redenbeaugh et al. (1987) สำหรับสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 3 เป็นสูตรทดลองที่ปรับปรุงจากสูตรทดลองที่ 1 และสูตรทดลองที่ 2 (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เนื่องจากพบว่าการชักนำแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่งในที่มืดดีกว่าที่สว่าง การทดลองนี้จึงชักนำแคลลัสโดยเลี้ยงในที่มืดเท่านั้น ชักนำแคลลัสในอาหารสูตรทดลองทั้ง 3 สูตรสังเกตผลการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลโดยการให้คะแนนแคลลัสที่เกิดขึ้น คะแนนที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของแคลลัส สำหรับการชักนำแคลลัสส่วนตายอดและตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งนี้ แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีคะแนนเต็ม 5.00 คะแนน จากการสังเกตด้วยตาเปล่าและการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่าเนื้อเยื่อมีการเจริญดังต่อไปนี้

ก. ลักษณะของแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนตายอดหรือตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งที่นำมาเลี้ยงในที่มืดในสูตรอาหารทดลอง 3 สูตร พบลักษณะของแคลลัสที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือ

1. แคลลัสสีเหลืองเข้ม เป็นแคลลัสที่มีเนื้อประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันแน่น แคลลัสลักษณะนี้พบมากในสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 3 (ภาพที่ 21A) เมื่อแคลลัสมีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาของเอมบริออยด์เกิดขึ้น (ภาพที่ 21B) แคลลัสสีเหลืองเข้มนี้เจริญมาจากเนื้อเยื่อบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืช

2. แคลลัสสีขาวนวล เป็นแคลลัสที่มีเนื้อประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันแน่น มีสีขาวหรือสีเหลืองนวล พบมากในสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 แคลลัสสีขาวนวลนี้บางแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอด (ภาพที่ 21C) บางแคลลัสมีการพัฒนาของเอมบริออยด์เกิดขึ้น แคลลัสลักษณะนี้มีการเจริญมาจากบริเวณรอยตัดและโดยรอบชิ้นส่วนของ

เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง

3. แคลลัสสีเหลืองปุยสีขาว เป็นแคลลัสที่ประกอบไปด้วยเซลล์ที่จับกันอย่างหนาแน่นมีกลุ่มเซลล์เป็นปุยสีขาวเจริญอยู่รอบ ๆ แคลลัสสีเหลือง แคลลัสลักษณะนี้พบมากในสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 2 และสูตรที่ 1 บางแคลลัสมีการพัฒนาของรากเกิดขึ้น (ภาพที่ 21D) และพบว่าการพัฒนาของรากมีมากขึ้นเมื่ออายุของแคลลัสเพิ่มขึ้น แคลลัสลักษณะนี้มีกำเนิดมาจากบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง

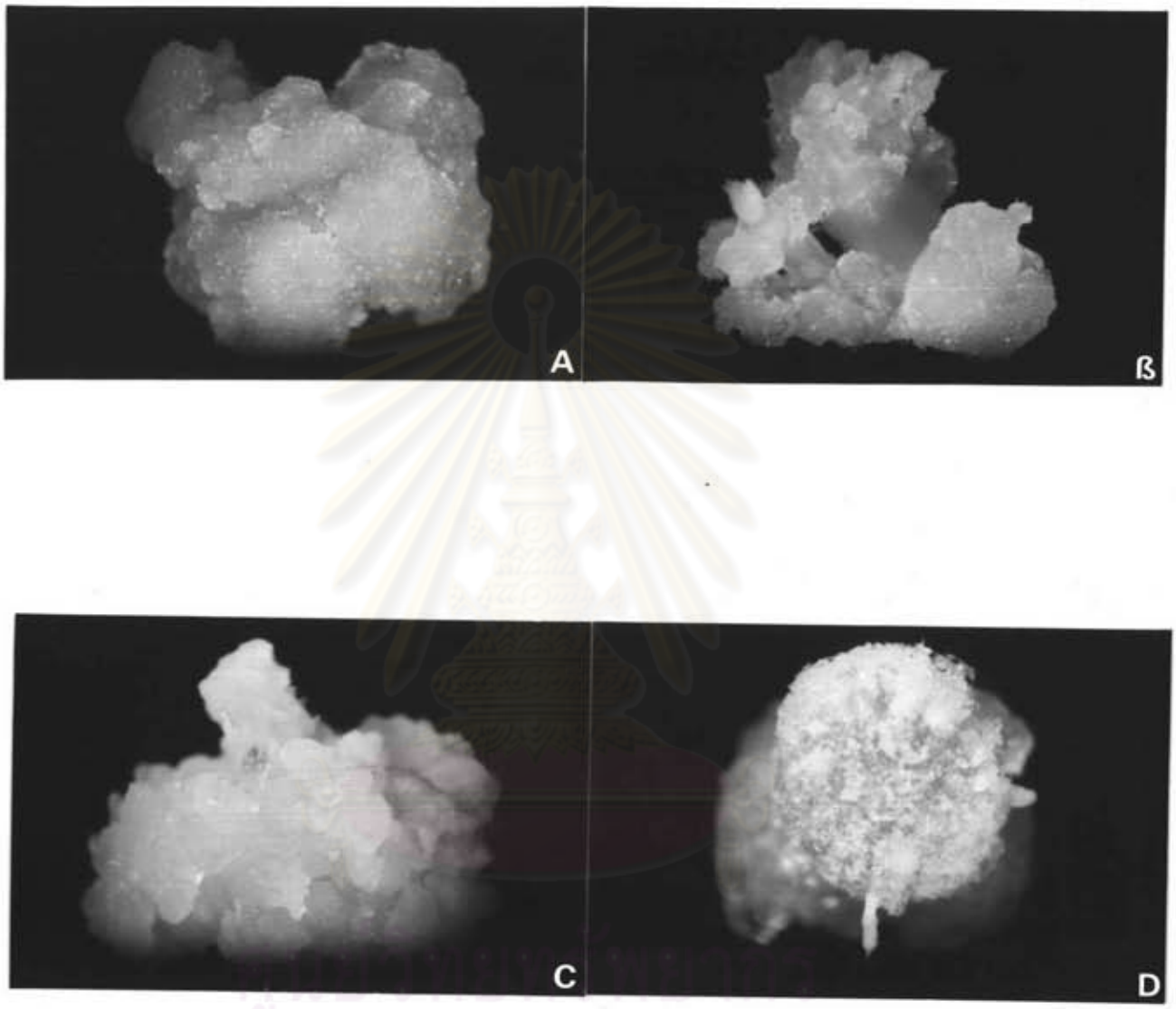
ข. <u>ปริมาณและขนาดของแคลลัส</u> การชักนำแคลลัสส่วนตายอดและตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งในอาหารสูตรทดลองสูตรที่ 1, 2 และ 3 พบว่าสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 3 มีการเจริญของแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อประเมินผลจากการให้คะแนนแคลลัสด้วยตาเปล่า พบแคลลัสสีเหลืองเข้มและแคลลัสสีขาวนวลในปริมาณที่มากกว่าสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 1 และ 2 ขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุดมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 4.12 คะแนน (ตารางที่ 25)

ส่วนแคลลัสที่พบในสูตรอาหารทดลองสูตรที่ 2 เป็นแคลลัสสีเหลืองเข้มและแคลลัสสีเหลืองปุยสีขาว มีคะแนนเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 3.75 คะแนน (ตารางที่ 25)

สำหรับอาหารสูตรทดลองสูตรที่ 1 พบแคลลัสสีขาวนวลและแคลลัสสีเหลืองปุยสีขาวเป็นจำนวนมาก มีคะแนนเฉลี่ยของแคลลัส 3.12 คะแนน (ตารางที่ 25)

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วย Duncan's multiple-range test เปรียบเทียบผลของสูตรอาหารที่มีต่อการชักนำแคลลัสส่วนตายอดหรือตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งในที่มืด พบว่าการชักนำแคลลัสในอาหารสูตรทดลองที่ 1 ต่างจากสูตรที่ 2 และ 3 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ในขณะที่สูตรอาหารทดลองสูตรที่ 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 26 และกราฟที่ 14)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 21 แคลลัสลักษณะต่าง ๆ ที่ชักนำจากส่วนตายอดและตาข้างของหน่อไม้ฝรั่ง ในอาหารสูตรทดลอง 3 สูตร ในที่มืด

A : แคลลัสสีเหลืองเข้ม กำลังขยาย 5 เท่า

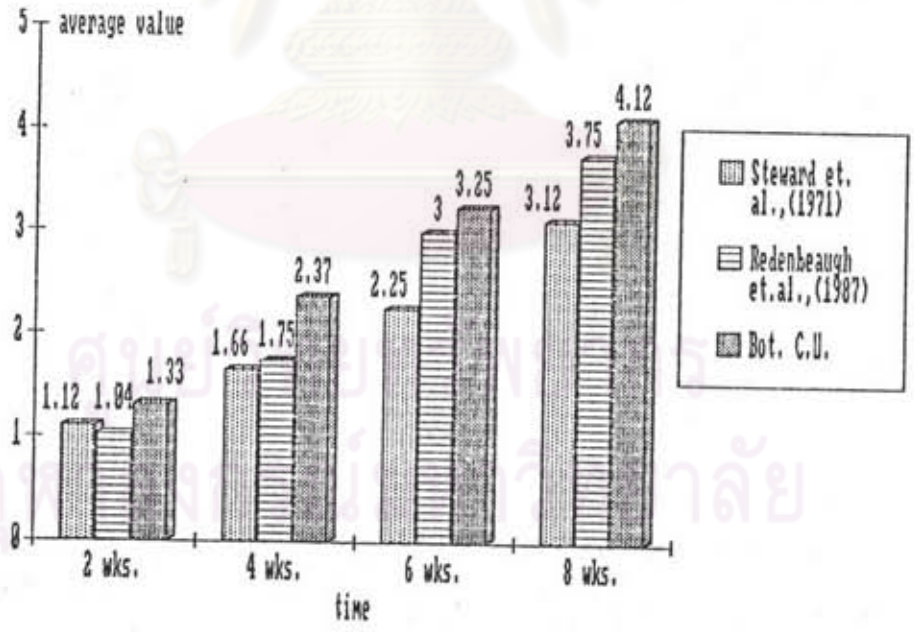
B : แคลลัสสีเหลืองเข้ม มีเอมบริออยด์เจริญอยู่บนแคลลัส กำลังขยาย 3 เท่า

C : แคลลัสสีขาวนวล มีการพัฒนาของยอดเจริญบนแคลลัส กำลังขยาย 3 เท่า

D : แคลลัสสีเหลืองปุยสีขาว มีการพัฒนาของราก กำลังขยาย 5 เท่า

ตารางที่ 25 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนตายอดและตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งในอาหารสูตรทดลอง 3 สูตรในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8 โดยมีคะแนนเต็ม 5.00 คะแนน (เฉลี่ยจากผลการทดลอง 30 ซ้ำ)

สูตรอาหารทดลอง	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	คะแนนเฉลี่ยของแคลลัส สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
สูตรที่ 1	120	1.12	1.66	2.25	3.12
สูตรที่ 2	120	1.04	1.75	3.00	3.75
สูตรที่ 3	120	1.33	2.37	3.25	4.12



กราฟที่ 14 เปรียบเทียบผลสูตรอาหารที่มีต่อการชักนำแคลลัสส่วนตายอดและตาข้าง ของหน่อไม้ฝรั่งในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 จากคะแนนเต็ม 7.00 คะแนน เฉลี่ยจาก 120 แคลลัสต่อสูตร

ตารางที่ 26 Duncan's multiple-range test ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนตายอดและตาข้างของหน่อไม้ฝรั่ง ในสูตรอาหารทดลอง 3 สูตร ชักนำแคลลัสในที่มืด วัดผลในสัปดาห์ที่ 8

สูตรอาหารทดลอง	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	คะแนนเฉลี่ยของแคลลัส	DMRT
สูตรที่ 1	120	3.12	a
สูตรที่ 2	120	3.75	b
สูตรที่ 3	120	4.12	b

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ของหน่อไม้ฝรั่ง

ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ของหน่อไม้ฝรั่ง ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆในการศึกษาและการรายงานผลดังต่อไปนี้

2.1 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

2.3 ผลการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

2.4 การศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis

2.1 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

แคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนตายอดและตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งเมื่อนำมาแบ่งเป็นก้อนๆ แต่ละก้อนหนักประมาณ 1.0 มิลลิกรัม นำมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสขวดละก้อน และย้ายลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการเจริญโดยการเพิ่มขนาดมากขึ้น แคลลัสมีลักษณะแข็งแรง ทำการเพิ่มแคลลัสจนได้แคลลัสจำนวนมากเพียงพอสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่แตกต่างกัน 3 สูตรทดลอง(ภาคผนวก ก.ข้อ 1)บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์กลุ่มเล็กๆและเพิ่มปริมาณของเซลล์พร้อมที่จะนำไปศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ต่อไป

2.3 การชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

นำเซลล์แต่ละกลุ่มที่แยกได้จากการทดลองมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 3 สูตรที่แตกต่างกันบนเครื่องเขย่า โดยใส่เซลล์ที่ได้จากการกรองประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 200 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว 20 มิลลิลิตรต่อขวด จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่างๆในอาหารทดลอง 3 สูตร โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ผลปรากฏดังแสดงไว้ในตารางที่ 27

ก. ขนาดของเซลล์ ขนาดของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุดได้แก่ กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.5 มิลลิเมตร จากการนับจำนวนเอมบริออยด์ในวันที่ 14 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ สำหรับกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 1.0 มิลลิเมตรพัฒนามาเป็นเอมบริออยด์ได้บ้าง แต่เอมบริออยด์ไม่สามารถพัฒนาได้จากกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่า 1.5 มิลลิเมตร กลุ่มเซลล์กลุ่มนี้มักมีการเจริญและพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ แต่เอมบริออยด์ไม่มีการแยกจากกัน

มักจะติดกันเป็นกลุ่มก้อนมากกว่า ส่วนกลุ่มเซลล์ที่ค้างอยู่บนตะแกรง 0.1 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่เป็นพวกชิ้นส่วนของเซลล์ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริออยด์ได้

ข. ผลของสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดเอมบริออยด์

เอมบริออยด์สามารถพัฒนาได้ดีในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์สูตรทดลองที่ 3 (Bot C.U.) และสูตรปรับปรุงของ Redenbeaugh et.al.,(1987) ให้ผลดีกว่าสูตรอาหารที่ปรับปรุงโดย Steward et.al.,(1971) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 จำนวนเอมบริออยด์ที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ 3 สูตร นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2 (เฉลี่ยจากจำนวน 3 ขวดต่อชุดการทดลอง)

ขนาดของกลุ่มเซลล์	Steward et.al., (1971)			Rodenbeaugh et.al., (1980)			Bot C.U.		
	จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด		
	globular shape	heart shape+ torpedo shape	total	globular shape	heart shape+ torpedo shape	total	globular shape	heart shape+ torpedo shape	total
>1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
>1.0	43	65	108	54	195	249	107	228	335
>0.5	56	69	126	218	219	362	188	295	483
>0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 28 Duncan's multiple-range test ของจำนวนเอมบริออยด์ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ที่แตกต่างกัน 2 สูตร เฉลี่ยจากสูตรละ 3 ขวด นับจำนวนเอมบริออยด์ในสัปดาห์ที่ 2

สูตรอาหารชักนำให้เกิดเอมบริออยด์	จำนวนเอมบริออยด์ต่อขวด			รวมทั้งหมด	เฉลี่ยต่อขวด	DMRT.
	1	2	3			
Steward et.al. (1971)	42	36	48	126	42	a
Redenbeaugh et.al. (1987)	120	117	125	362	120	b
Bot C.U.	161	142	180	483	161	b

หมายเหตุ : DMRT.= Duncan's multiple-range test
ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.4. การศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis

เมื่อศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่างๆที่ได้จากการกรอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ทุกๆ 2 วันเพื่อศึกษากระบวนการ somatic embryogenesis ผลปรากฏว่ากลุ่มเซลล์ที่แยกได้จากการกรองที่ค้างอยู่บนตะแกรงที่มีรูขนาด 0.5 มิลลิเมตรนั้น มีกลุ่มเซลล์ปนกันอยู่เป็นจำนวนมาก ในชั้นกรองนี้กลุ่มเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ได้สูง

กลุ่มเซลล์ที่พบมากที่สุดเป็นกลุ่มเซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ถึง 0.5 มิลลิเมตร ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ในปริมาณมาก พบได้ในวันที่ 4 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ประมาณวันที่ 4 และ 6 เริ่มพบเอมบริออยด์ในระยะ globular shape และพบจำนวนมากขึ้นในวันที่ 8 globular shape มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือกลมรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ถึง

1.0 มิลลิเมตร ระยะต่อมาพบว่าเอมบริออยด์ในระยะ globular shape ได้พัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีรูปร่างยาวรี ซึ่งพบจำนวนมากขึ้นในวันที่ 7 และ 8 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ต่อมาเอมบริออยด์ในระยะ torpedo ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างไปจาก torpedo shape ของพืชใบเลี้ยงคู่โดยทั่วไป torpedo shape ของหน่อไม้ฝรั่งมีขนาดความยาวโดยเฉลี่ย 5.0 ถึง 6.0 มิลลิเมตร torpedo shape มีรูปร่างเรียวยาวหัวท้ายแหลมคล้ายจรวด สรุปได้ว่าในการพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ของหน่อไม้ฝรั่ง เอมบริออยด์จะเกิดได้ 2 ระยะด้วยกัน กล่าวคือเอมบริออยด์มีรูปร่างเป็น globular แล้วพัฒนามาเป็นเอมบริออยด์ในระยะ torpedo shape โดยไม่ผ่านระยะที่เป็น heart shape

3. <u>ผลการผลิตเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง</u>

เมื่อย้ายแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่งมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์บนเครื่องเขย่า พบว่าเอมบริออยด์ในระยะ torpedo มีจำนวนมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 วัดความยาวโดยเฉลี่ย 2 ถึง 7 มิลลิเมตร รูปร่าง torpedo ของหน่อไม้ฝรั่งแตกต่างไปจาก torpedo shape ของแครอทและยาสูบ กล่าวคือ torpedo shape ของหน่อไม้ฝรั่งมีรูปร่างรียาว หัวท้ายแหลม (ภาพที่ 22) นำเอมบริออยด์ในระยะ torpedo มากรองผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดต่าง ๆ เพื่อแยกเอมบริออยด์ให้มีขนาดสม่ำเสมอกัน

นำเอมบริออยด์ที่แยกได้มาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม โดยที่ผสมเอมบริออยด์ที่มีขนาดเท่ากันลงในสูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม sodium alginate 2 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้แท่งแก้วคนให้เอมบริออยด์กระจายทั่วไปในอาหารแล้วหยดลงในสารละลาย calcium nitrate ได้เมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่งที่มีรูปร่างกลม ใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดพืชเทียมบรรจุเอมบริออยด์ 1 เอมบริออยด์ (ภาพที่ 23)

4. <u>ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ</u>

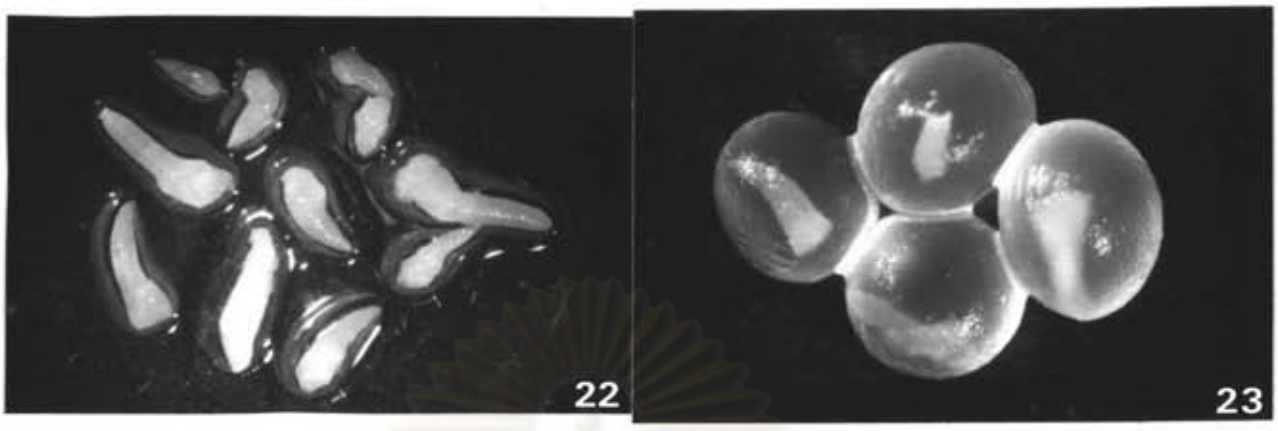
นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้มาเพาะทดสอบความงอกในวัสดุเพาะที่มีสูตรอาหารแตกต่างกัน 2 สูตร ได้แก่ MS (1962) และ น้ำปุ๋ยสูตร WP โดยมีน้ำประปาเป็นชุดการทดลองควบคุม เพื่อเป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดพืชเทียม

หน่อไม้ฝรั่ง ดังแสดงผลการทดสอบความงอกไว้ในตารางที่ 29

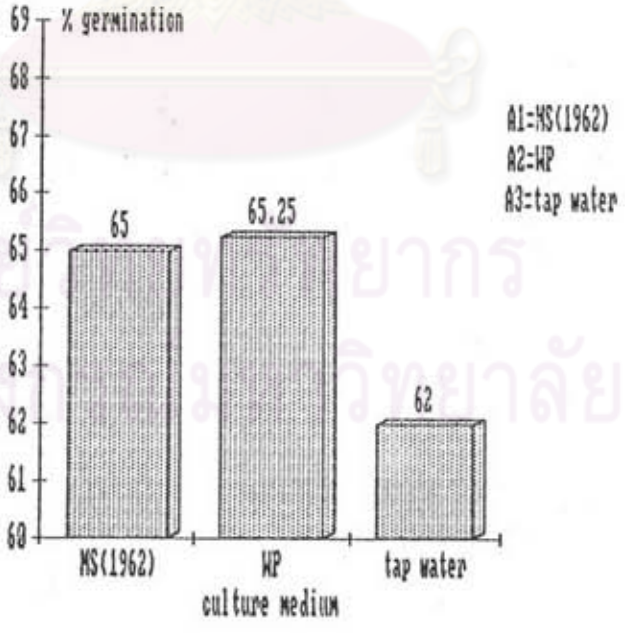
เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่งในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งเติมลงในวัสดุเพาะ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 29) เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่งในสูตรอาหารทั้ง 3 ใกล้เคียงกันมาก โดยมีชุดการทดลอง A_2 ที่เติมน้ำปุ๋ยสูตร WP ลงไปในวัสดุเพาะมีเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 65.25 เปอร์เซนต์ (กราฟที่ 15)

จากการสังเกตด้วยตาเปล่าถึงการงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง ปรากฏว่าเมล็ดพืชเทียมสามารถงอกได้ภายในวันที่ 3 ของการเพาะเมล็ด โดยส่วนของยอดมักจะพัฒนากว่าส่วนของราก เอมบริออยด์จะแทงส่วนของยอดแหลมออกมาพ้นเปลือกเมล็ดพืชเทียมประมาณ วันที่ 3 หรือ 4 หลังจากเพาะเมล็ด การงอกของเมล็ดค่อนข้างสม่ำเสมอกัน งอกใกล้เคียงกันมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนต้นหน่อไม้ฝรั่งที่งอกจากเมล็ดจริงทุกประการ (ภาพที่ 24)

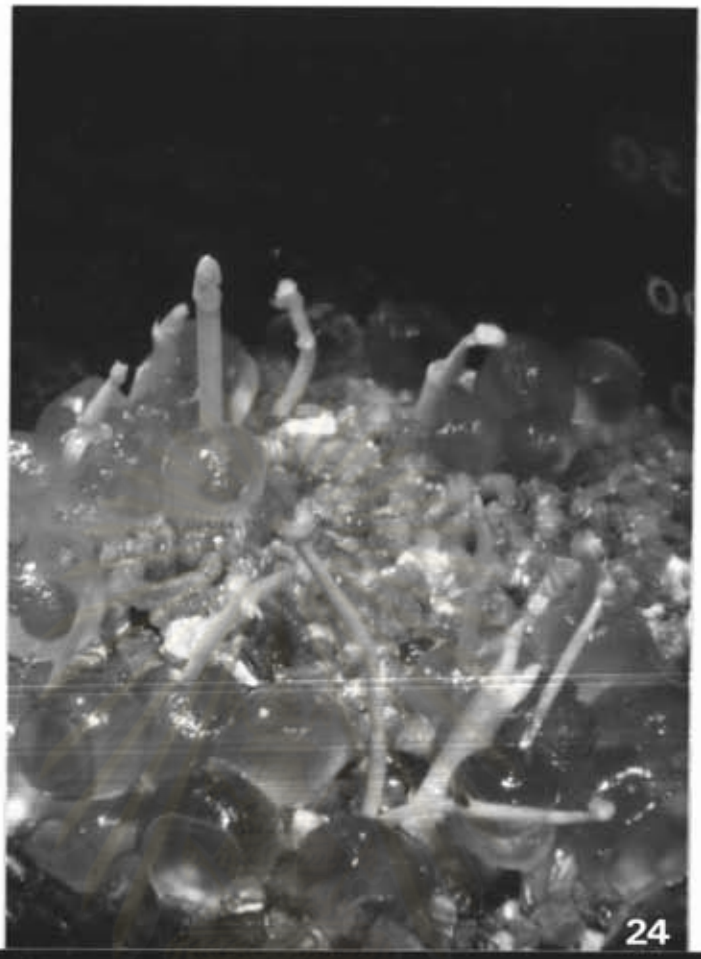
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

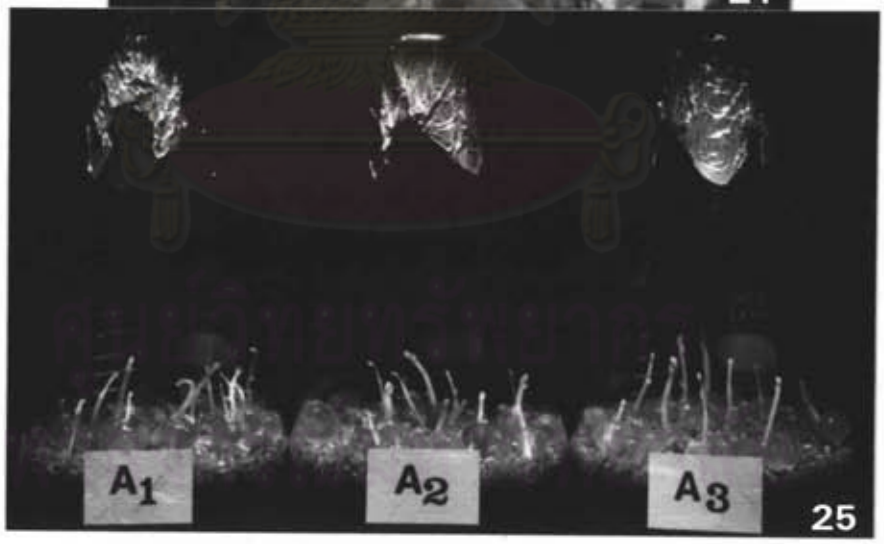


ภาพที่ 22 เอมบริออยด์ในระยะ torpedo ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน กำลังขยาย 2 เท่า
ภาพที่ 23 เมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง



กราฟที่ 15 แสดงเปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ยของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง ที่เพาะทดสอบความงอก ในสูตรอาหารทดลอง 3 สูตร ที่แตกต่างกัน เฉลี่ยจากสูตรละ 400 เมล็ด





ภาพที่ 24 การงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง

ภาพที่ 25 ผลของสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง

A_1 ได้แก่วัสดุเพาะที่เติมสูตรอาหาร MS (1962)

A_2 ได้แก่วัสดุเพาะที่เติมน้ำปุ๋ยสูตร WP

A_3 ได้แก่น้ำประปา เป็นการทดลองควบคุม

ตารางที่ 29 ผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมหน่อไม้ฝรั่ง ในสูตรอาหารทดสอบ 3 สูตร ที่ผสมลงในวัสดุเพาะ เฉลี่ยจากสูตรละ 400 เมล็ด

สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบในวัสดุเพาะ	จำนวนต้นที่นับทั้งหมด ซ้ำที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	รวมเมล็ดพืชเทียมที่งอกทั้งหมด	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย
A_1	35	26	32	25	28	39	35	40	260	65.00
A_2	26	33	27	37	31	28	39	40	261	65.25
A_3	38	35	37	28	23	30	25	32	248	62.00

ตารางที่ 30 Duncan's multiple-range test ของการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียมบองกน่อไม้ฝรั่ง ในอาหารสูตรทดสอบ 3 สูตร ที่เติมลงในวัสดุเฉลี่ยจากสูตรละ 400 เมล็ด

สูตรอาหารที่ใช้ทดสอบในวัสดุเพาะ	รวมเมล็ดพืชเทียมที่งอกทั้งหมด	เปอร์เซนต์ความงอกเฉลี่ย	DMRT
A_1	260	65.00	a
A_2	261	65.25	a
A_3	248	62.00	a

หมายเหตุ : DMRT=Duncan's multiple-range test ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย