บทที่ 3

ผลการทดลอง

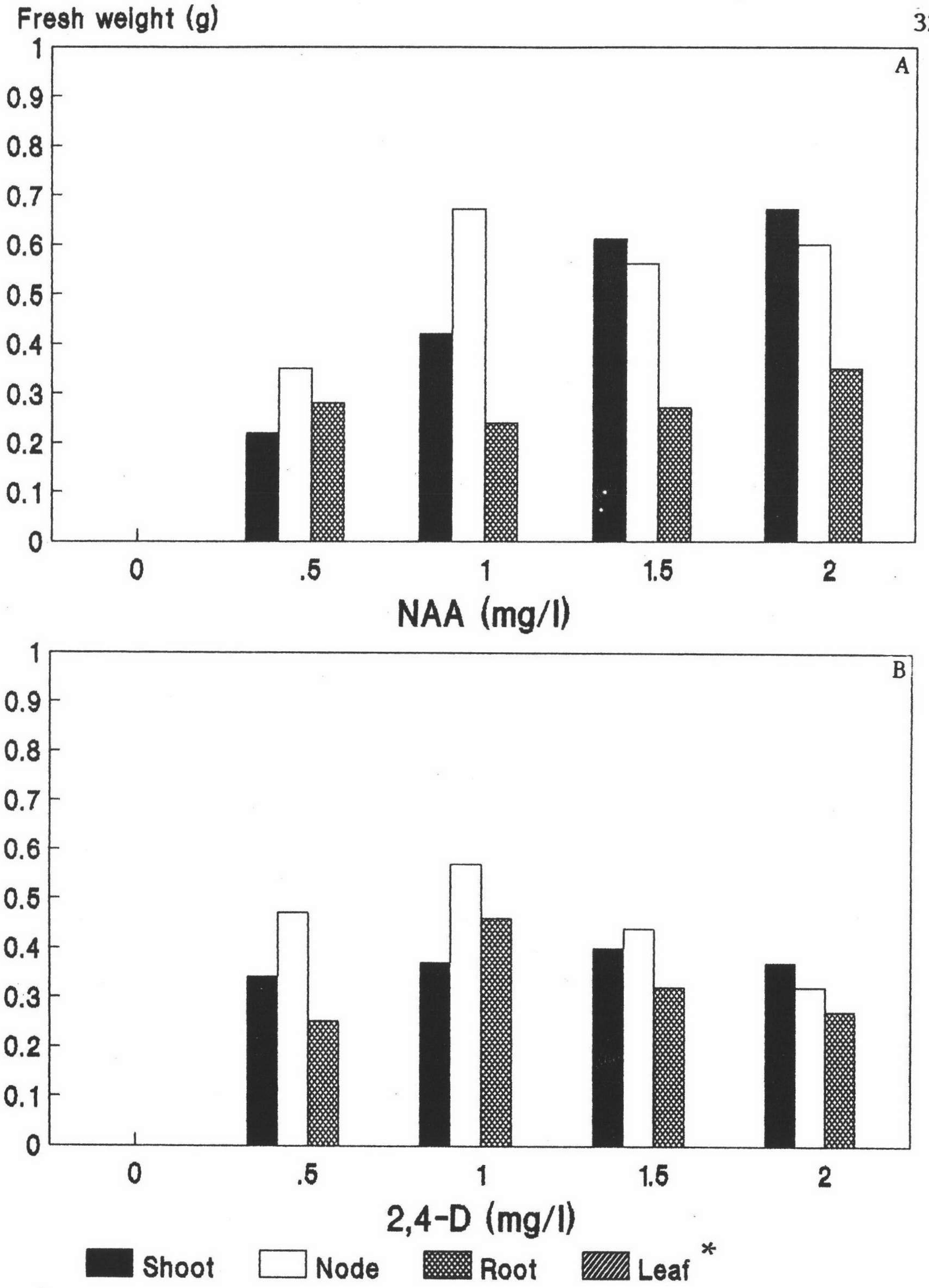
<u>การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของสารควบคุมการเจริญเติบโต</u>

1. <u>การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อสารต่าง ๆ ของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน</u>

จากการทดลองผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เนื้อเยื่อแต่ละส่วนตอบสนองต่อออกซิน โดยเกิดแคลลัสและราก (รูปที่ 3.1 และ 3.2) โดยทั่วไปจะเห็นแคลลัสเมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 10 วัน โดยจะเห็นบริเวณปลายรอยตัดทั้ง 2 ข้าง ส่วนยอดข้อและรากจะให้แคลลัสแบบ friable ให้สีที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความเข้มข้นของฮอร์โมนแต่ละชนิด คือที่ NAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-1.5 มก.ต่อลิตร จะให้แคลลัสสีเหลือง ส่วนที่ 2.0 จะให้แคลลัสสีเหลืองถึงเหลืองปนน้ำตาล ส่วน 2,4-D ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-1.0 มก.ต่อลิตร ให้แคลลัสสีเหลืองปนน้ำตาล และที่ 1.5-2.0 มก.ต่อลิตร ให้แคลลัสสีเหลืองปนน้ำตาลถึงน้ำตาล ในวิธีการทดลองที่ใช้ IAA เนื้อเยื่อไม่เกิดแคลลัส ส่วนของพืชทดลองที่ใช้ใบ จะตายภายในสัปดาห์ที่ 2-3

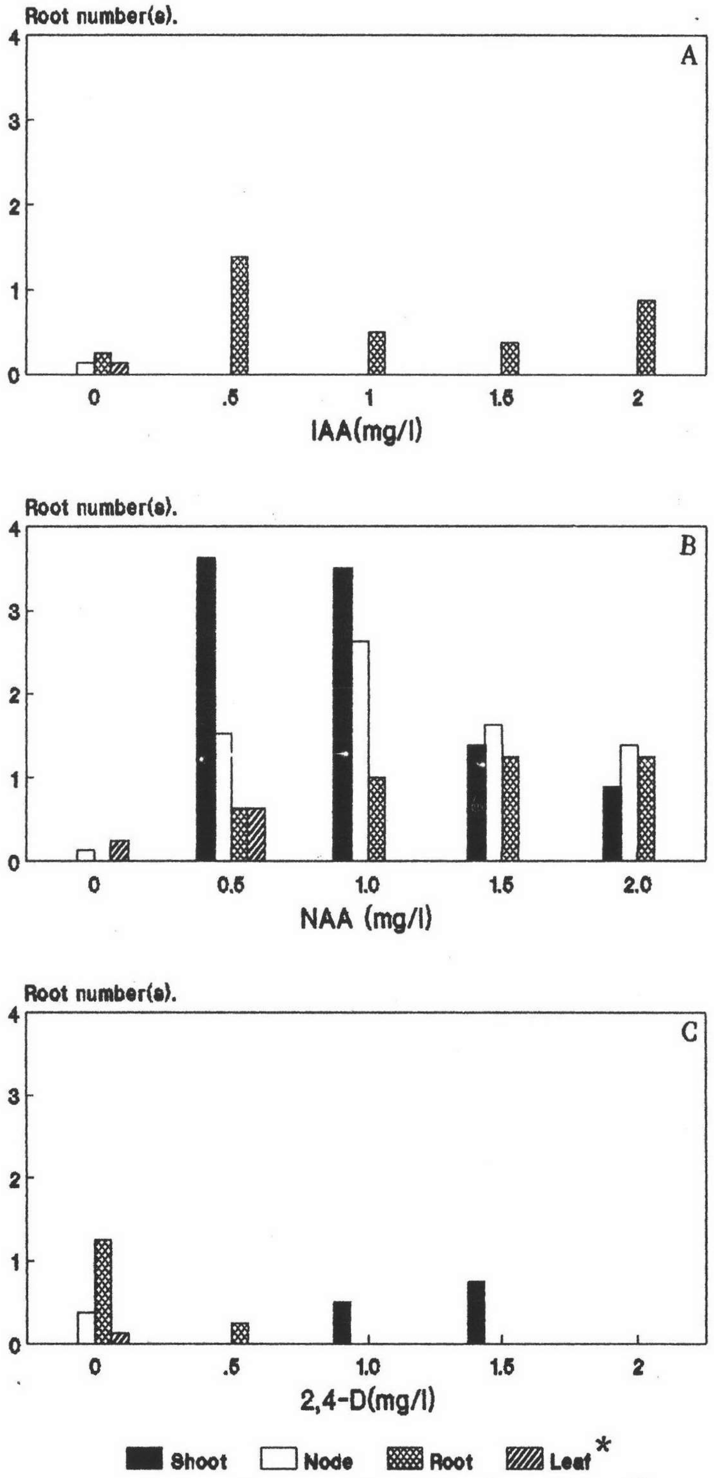
วิธีการทดลองที่ใช้ NAA ตอบสนองต่อการเกิดรากดีกว่า IAA และ 2,4-D วิธีการที่ใช้ 2,4-D จะเกิดสารประกอบฟีโนลิกมากที่สุด โดยจะเกิดมากขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D

ส่วนยอดจะตอบสนองต่อ NAA ในการเกิดรากดีที่สุด ที่ระดับ NAA 0.5-1.0 มก.ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ส่วนข้อ ที่ระดับ NAA 1 มก.ต่อลิตร



รูปที่ 3.1 กราฟแสดงผลของสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ NAA (A) 2,4-D (B) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อยอด ข้อ ราก และใบ (น้ำหนักเป็นกรัมต่อชิ้นของเนื้อเยื่อในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

* เนื้อเยื่อใบตายในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงผลของสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ IAA (A) NAA (B) และ 2,4-D (C) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก. ต่อลิตร ต่อการเกิดรากชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอด ข้อ รากและใบ (จำนวนรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

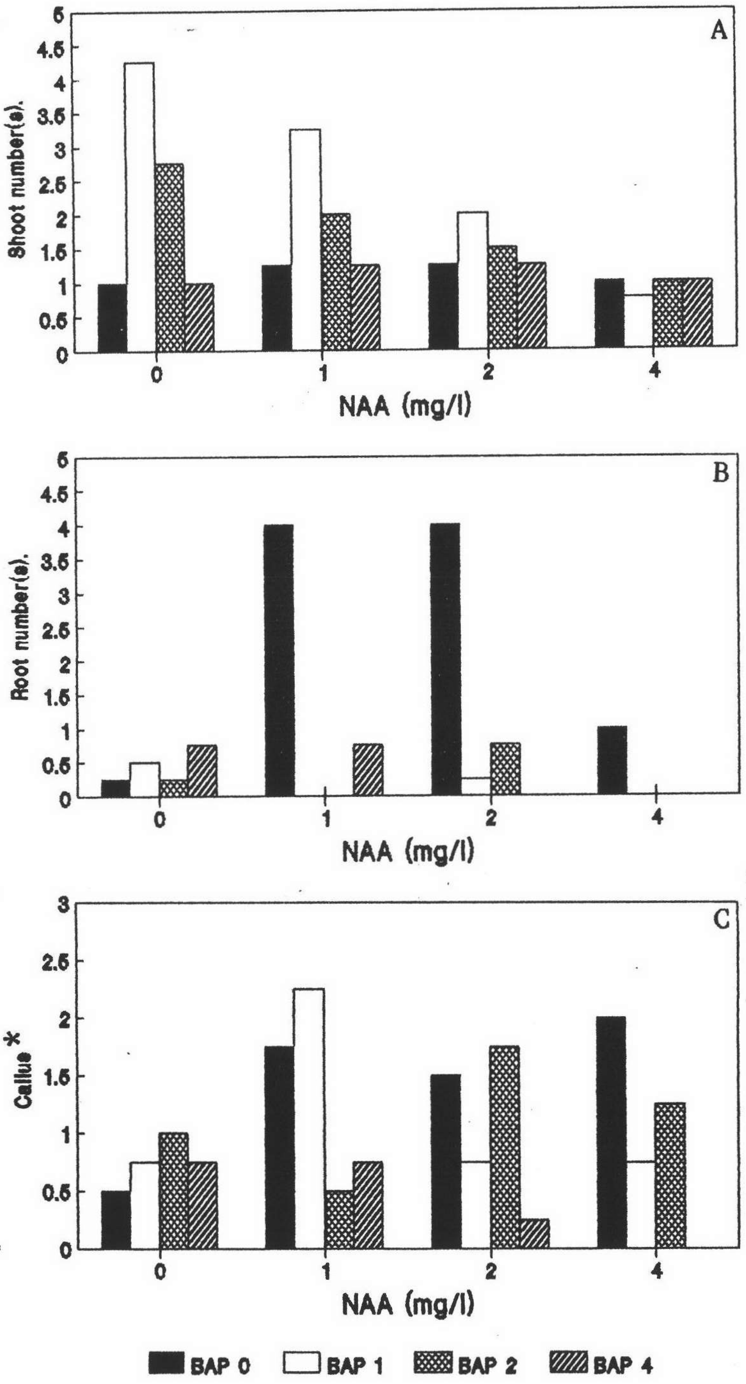
* เนื้อเยื่อใบตายในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์

2. <u>การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในการทำงานร่วมกันของ NAA และ BAP ที่ระดับควมเข้มข้นต่าง ๆ</u>

จากการทดลองพบว่าส่วนข้อที่ได้จากพืชในเรือนเพาะชำ และพืชในสภาพปลอดเชื้อให้ผลตอบสนองต่อ NAA และ BAP ในแนวเดียวกัน (รูปที่ 3.3 และ 3.4) แต่ชิ้นส่วนพืชจากเรือนเพาะชำตอบสนองต่อสารเร่งการเจริญเติบโตได้น้อยกว่า และมีแนวโน้มในการเกิดสารประกอบฟีโนลิกมากกว่า โดยชิ้นส่วนจากทั้ง 2 แบบ ให้แคลลัสสีเขียวปนเหลืองทั้งแบบฟู (friable) แบบแน่น (compact) และแบบเนื้อแข็ง (hard) ที่ BAP และ NAA ประมาณ 0.5 ถึง 1.0 มก.ต่อลิตร ที่ BAP มากกว่า 2 มก.ต่อลิตร จะให้สารประกอบฟีโนลิกค่อนข้างสูง มีผลให้เนื้อเยื่อไม่เจริญ ที่ NAA 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ให้แคลลัสสีเหลืองปนน้ำตาล

พบจำนวนยอดสูงสุดในการทดลองที่มี BAP ประมาณ 0.5 ถึง 1.0 มก.ต่อลิตร ซึ่งปราศจาก NAA และความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้จำนวนการเกิดยอดลดลง

พบจำนวนรากสูงสุดในการทดลองที่ปราศจาก BAP ที่ NAA ระดับ 0.5-2.0 มก.ต่อลิตร ที่ NAA ระดับ 0.5 มก.ต่อลิตร ให้รากลักษณะคล้ายธรรมชาติ ส่วน NAA ความเข้มข้นสูงขึ้น รากจะมีลักษณะสั้นป้อมมากขึ้น และให้แคลลัสมากขึ้นด้วย



* คะแนนการเกิดแคลลัส

(วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง)

0 = ไม่เกิดแคลลัส

1 < 0.5 ซม.

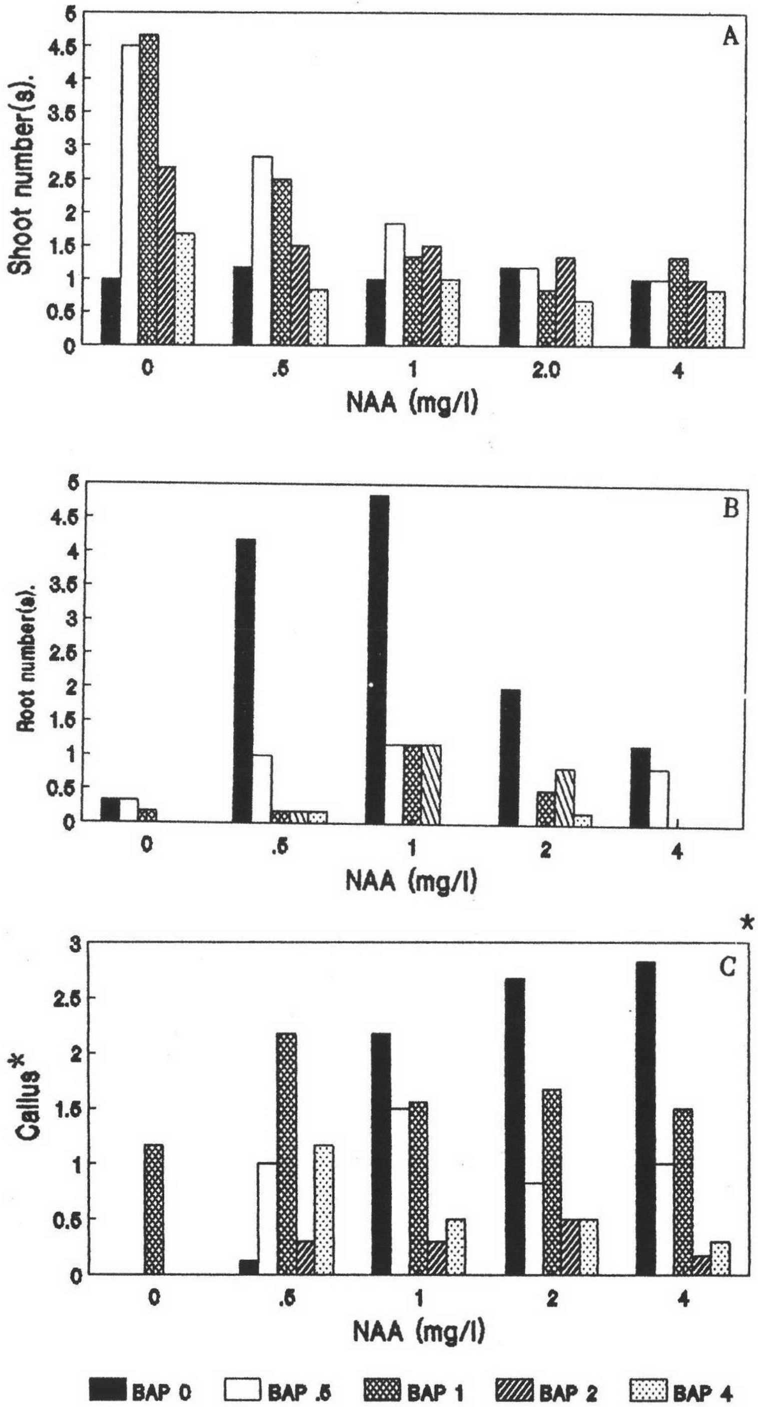
2 = 0.5 ถึง 1.0 ซม.

3 = 1.0 ถึง 1.5 ซม.

4 > 1.5 ซม.

รูปที่ 3.3 กราฟแสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอด (A) ราก (B) และแคลลัส (C) ต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากเรือนเพาะชำในระยะเวลา 4 สัปดาห์

I16458412



* คะแนนการเกิดแคลลัส

(วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง)

0 = ไม่เกิดแคลลัส

1 < 0.5 ซม.

2 = 0.5 ถึง 1.0 ซม.

3 = 1.0 ถึง 1.5 ซม.

4 > 1.5 ซม.

รูปที่ 3.4 กราฟแสดงผลการทำงานร่วมกันของ BAP และ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มก.ต่อลิตร ต่อการเกิดจำนวนยอด (A) ราก (B) และแคลลัส (C) ต่อชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อจากภาวะปลอดเชื้อในระยะเวลา 4 สัปดาห์

การชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการทดลองศึกษาผลของ NAA ต่อ BAP พบว่า BAP 0.5 มก.ต่อลิตรให้แคลลัสที่มีลักษณะเนื้อยุ่ยมากกว่า 1.0 มก.ต่อลิตร จึงนำมาใช้ศึกษาผลการชักนำแคลลัสในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

1. การชักนำให้เกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

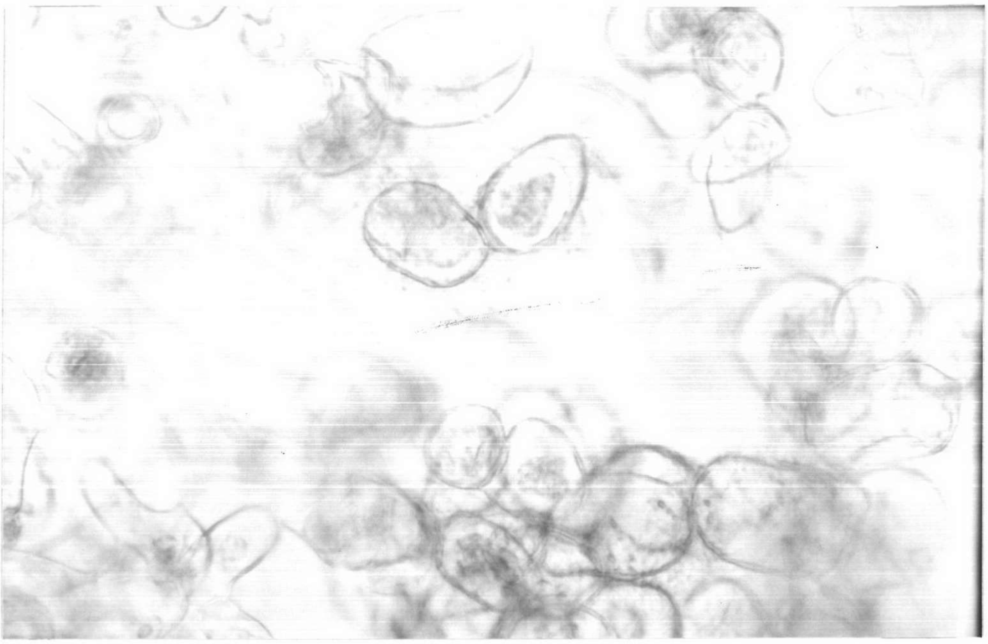
เนื้อเยื่อส่วนยอด ข้อ และเมล็ด จะเริ่มให้แคลลัสประมาณสัปดาห์ที่ 2 ในอาหารที่มี NAA เพียงอย่างเดียว ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเหลืองปริมาณเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ NAA ที่ความเข้มข้น NAA 2 มก.ต่อลิตร แคลลัสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3 ในสัปดาห์ที่ 2-3 เนื้อเยื่อส่วนใบจะเริ่มเหลืองและตาย

วิธีการทดลองที่มี BAP 0.5 มก.ต่อลิตร แคลลัสสีเหลืองถึงเหลืองปนเขียวในทุกเนื้อเยื่อ ส่วนยอด ข้อ และเมล็ด ให้แคลลัสมีลักษณะยุ่ย (friable) มากกว่าแบบเนื้อแข็ง (hard) แคลลัสมีลักษณะละเอียด เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ของแคลลัสมีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก ผนังเซลล์บาง (รูปที่ 3.5) เนื้อเยื่อส่วนใบให้แคลลัสลักษณะเนื้อแข็งมากกว่าเนื้อยุ่ย และเกิดสารฟีโนลิก ค่อนข้างสูง (รูปที่ 3.6)

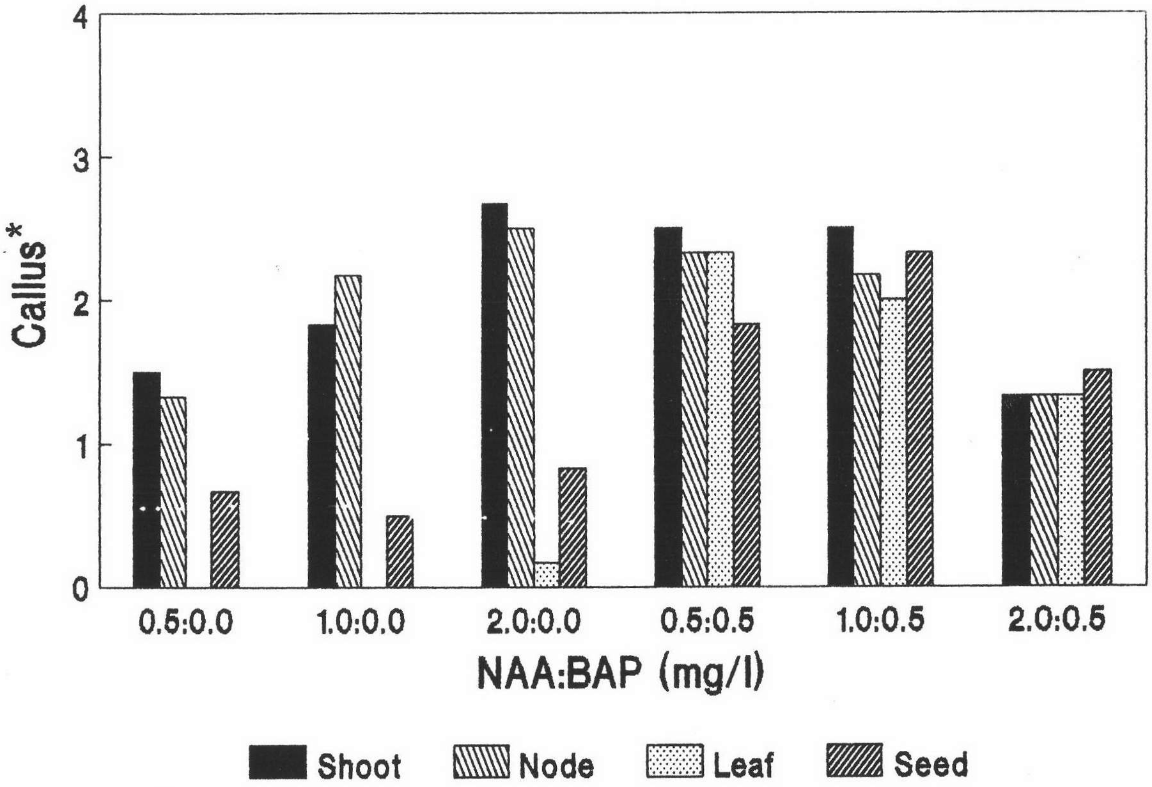
ชิ้นเนื้อเยื่อจากต้นที่แตกต่างกัน มีผลต่อการชักนำแคลลัสและการเกิดสารฟีโนลิกค่อนข้างสูง

2. การชักนำให้เกิดแคลลัสในภาวะมีแสงและปราศจากแสง

พบว่าเนื้อเยื่อส่วนยอด และข้อ ให้แคลลัสในปริมาณไม่แตกต่างกันมากนักทั้งในสภาพมีแสงและไม่มีแสง แคลลัสจากการชักนำในภาวะที่ได้รับแสง มีสีเหลืองถึงสีเหลืองปนเขียว ส่วนในภาวะปราศจากแสงสีเหลืองถึงเหลืองปนน้ำตาล ส่วนยอดให้แคลลัสลักษณะ friable มากกว่าส่วนข้อ ภาวะของแสงไม่มีผลต่อการเกิดสารฟีโนลิกมากนัก แต่ขึ้นกับชิ้นเนื้อเยื่อของพืชทดลองมากกว่า (รูปที่ 3.7 และ 3.8)



รูปที่ 3.5 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัส ที่ได้จากการชักนำด้วย NAA ต่อ BAP เท่ากับ 0.5:0.5 มก.ต่อลิตร จากเนื้อเยื่อส่วนยอด (กำลังขยาย 1200 เท่า)



รูปที่ 3.6 กราฟแสดงคะแนนการเกิดแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อยอด ข้อ ใบและเมล็ดกำลังงอกชักนำด้วย NAA ต่อ BAP ระดับต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

* คะแนนการเกิดแคลลัส

(วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง)

0 = ไม่เกิดแคลลัส

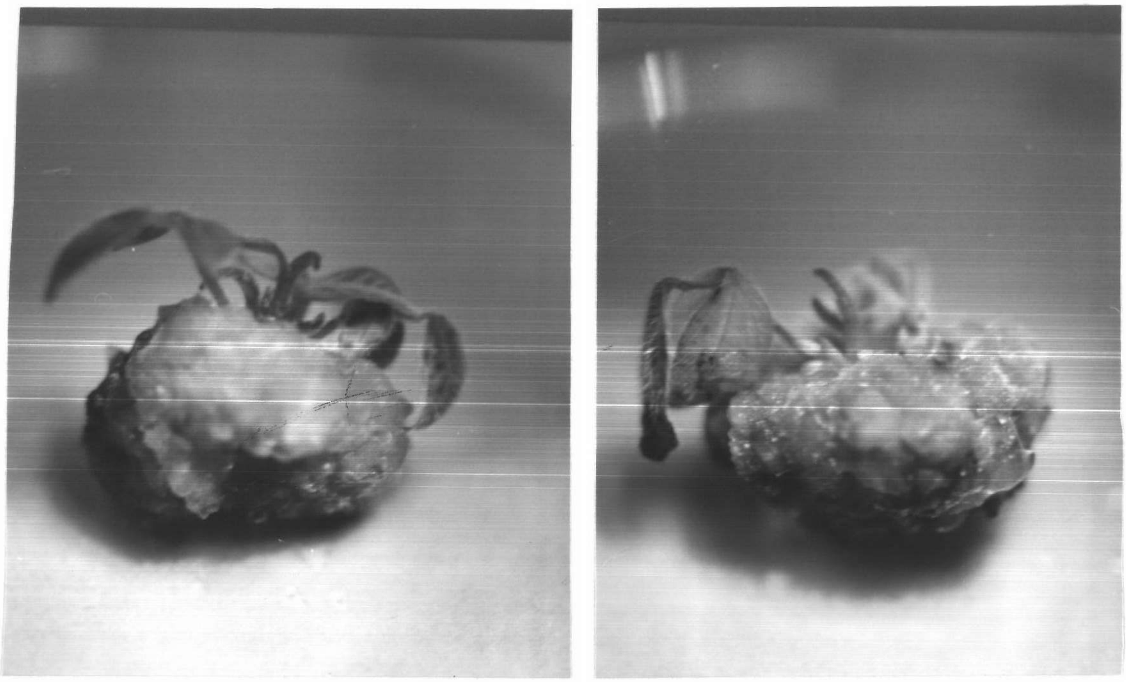
1 < 0.5 ซม.

2 = 0.5 ถึง 1.0 ซม.

3 = 1.0 ถึง 1.5 ซม.

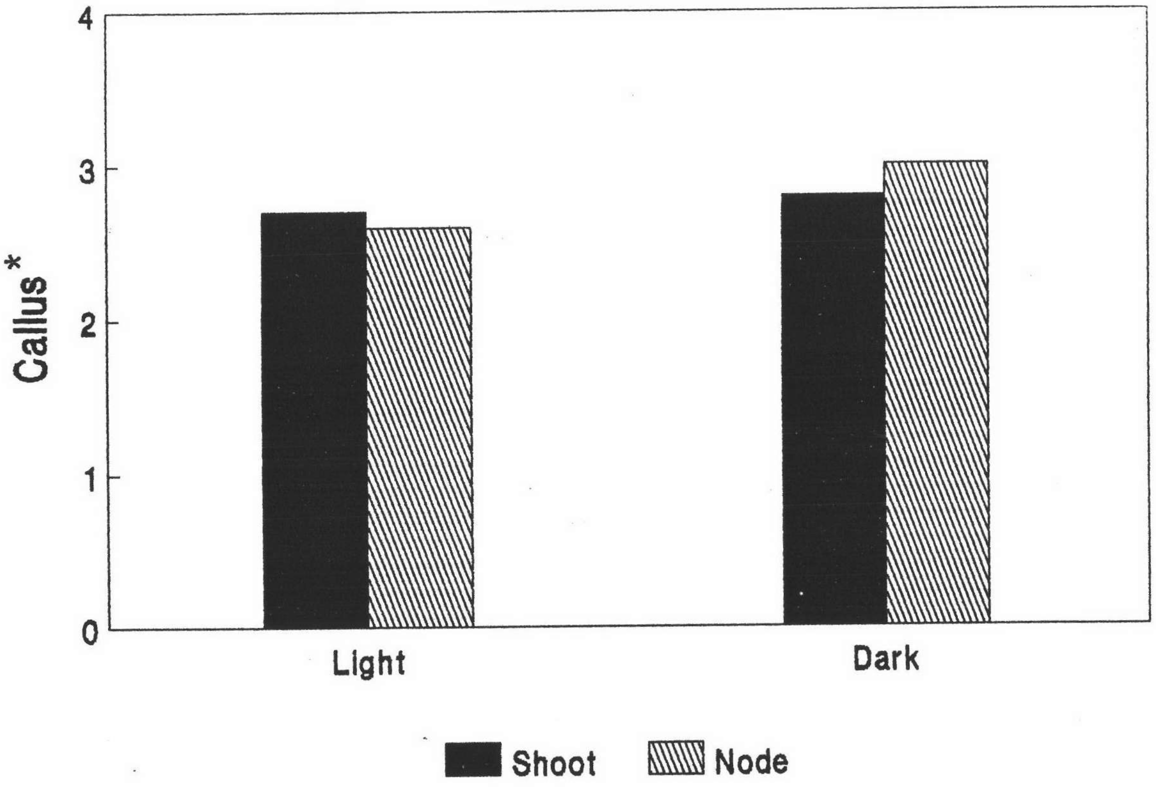
4 > 1.5 ซม.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



A B

รูปที่ 3.7 ภาพการชักนำให้เกิดแคลลัส ในภาวะมีแสง (A) และปราศจากแสง (B) ของเนื้อเยื่อส่วนยอดและราก ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงคะแนนการชักนำให้เกิดแคลลัส ในภาวะมีแสงและปราศจากแสง ของเนื้อเยื่อยอดและราก (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

* คะแนนการเกิดแคลลัส

(วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง)

0 = ไม่เกิดแคลลัส

1 < 0.5 ซม.

2 = 0.5 ถึง 1.0 ซม.

3 = 1.0 ถึง 1.5 ซม.

4 > 1.5 ซม.

ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงและชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของแคลลัส

ปัจจัยที่ศึกษาถึงผลการงอกใหม่ของแคลลัส คือสารควบคุมการเจริญเติบโต สูตรอาหาร และสารอาหารเพิ่มเติมบางอย่าง

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัส

1.1 ระดับความเข้มข้นของ BAP ที่แตกต่างร่วมกับ NAA 0.5 มก.ต่อลิตร

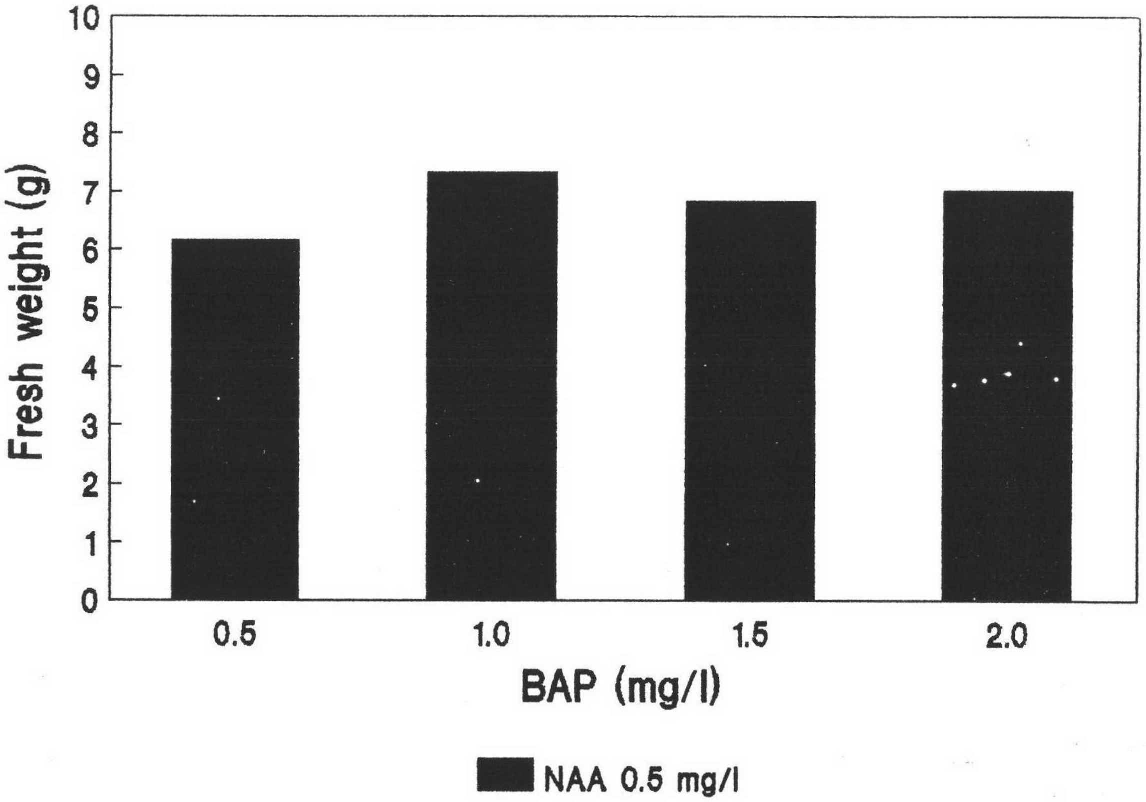
เลี้ยงแคลลัสที่มี BAP ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ให้แคลลัสสีเหลืองปนเขียว ส่วนที่ 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ให้แคลลัสสีเหลืองปนเขียวถึงเหลืองปนน้ำตาล และมีอัตราการเจริญไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 3.9)

1.2 ระดับความเข้มข้น NAA ที่แตกต่างร่วมกับ BAP 1.0 มก.ต่อลิตร

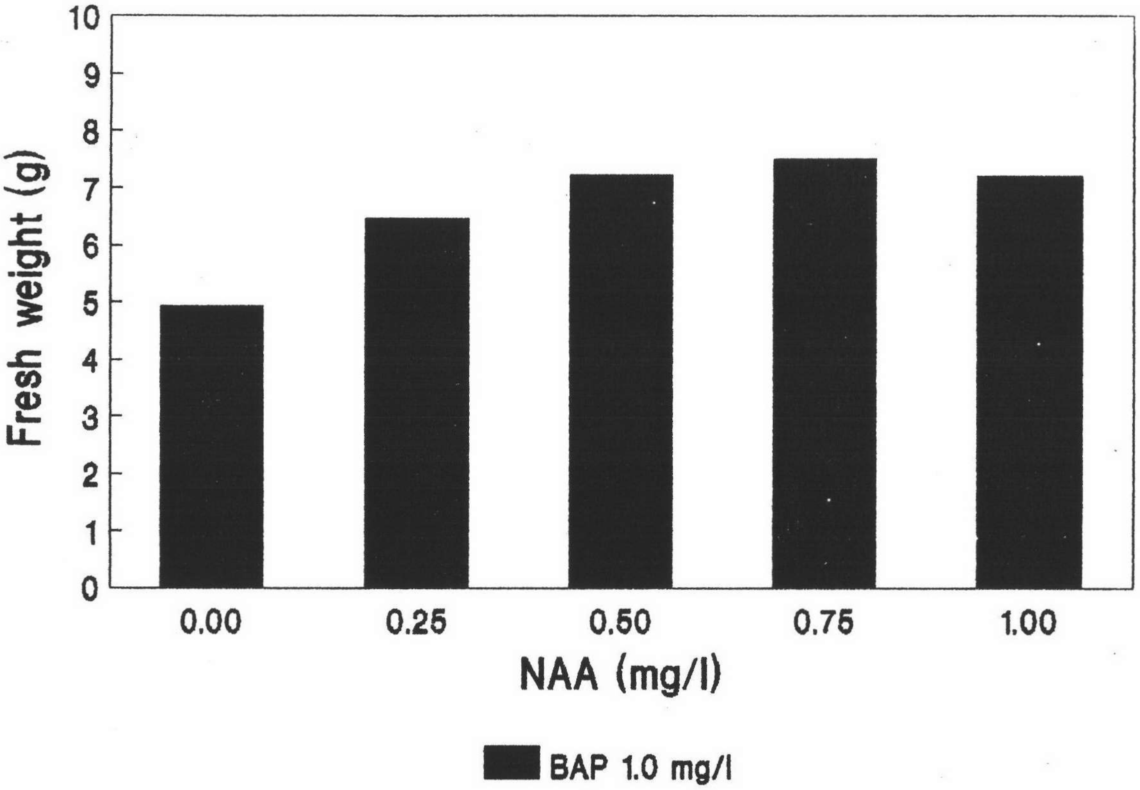
จากผลการทดลองที่ 1.1 เลือกใช้ BAP ที่ 1.0 มก.ต่อลิตร ในการเลี้ยงแคลลัส เนื่องจากให้แคลลัสสีเขียวปนเหลืองสม่ำเสมอและสูงกว่าในวิธีการทดลองอื่น เมื่อนำมาทำการทดลองร่วมกับ NAA ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าแคลลัสในอาหารที่มี NAA ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ให้แคลลัสที่มีปริมาณและคุณภาพไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนในอาหารที่ปราศจาก NAA จะให้อัตราการเจริญค่อนข้างต่ำกว่าที่ NAA มาก (รูปที่ 3.10)

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัส

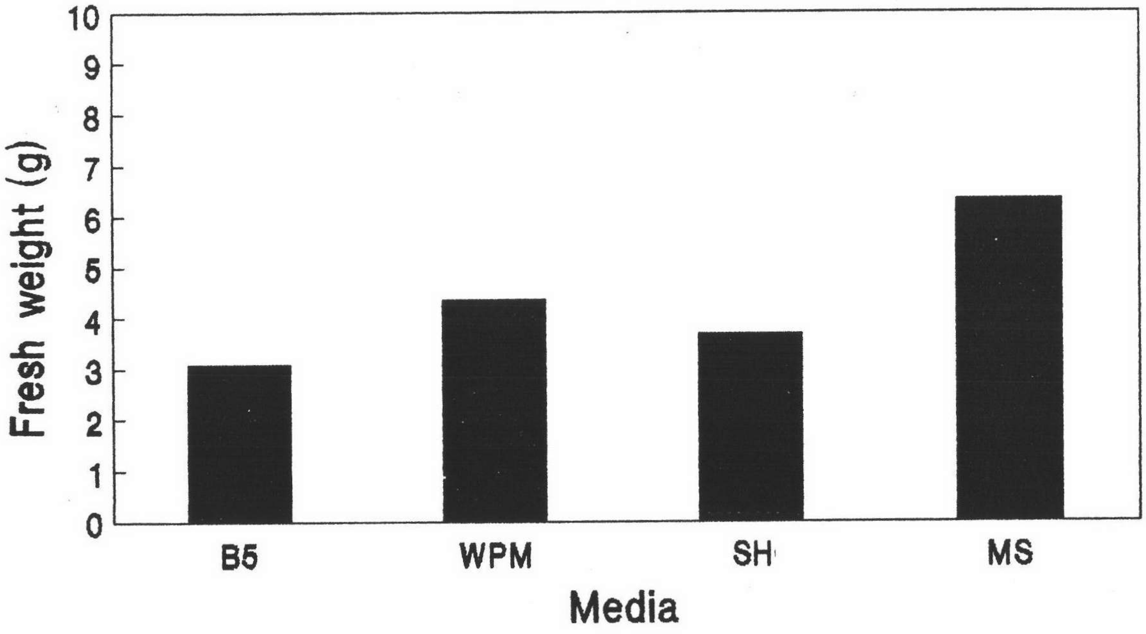
แคลลัสในอาหารสูตร MS ให้แคลลัสลักษณะดีสีเขียวปนเหลือง ในปริมาณมากที่สุด รองลงมาได้แก่ สูตร WPM SH และ B5 ให้อัตราการเจริญต่ำสุดและแคลลัสสีค่อนข้างเหลือง (รูปที่ 3.11)



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.10 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร MS มี BAP 1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.11 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร B5 WPM SH และ MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

3. ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการเลี้ยงแคลลัส

อัตราการเจริญของแคลลัสเพิ่มขึ้น ตามระดับควมเข้มข้นของธาตุอาหาร โดยระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ 0.5xMS ถึง 1.25xMS อัตราการเพิ่มแคลลัสจะสูง ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ 1.25 x MS ถึง 1.50xMS อัตราการเพิ่มแคลลัสและลักษณะที่ดีไม่แตกต่างกันมากนัก แคลลัสที่ได้จากอาหาร 2 สูตรนี้จะมีสีเขียวกว่าปกติ (รูปที่ 3.12)

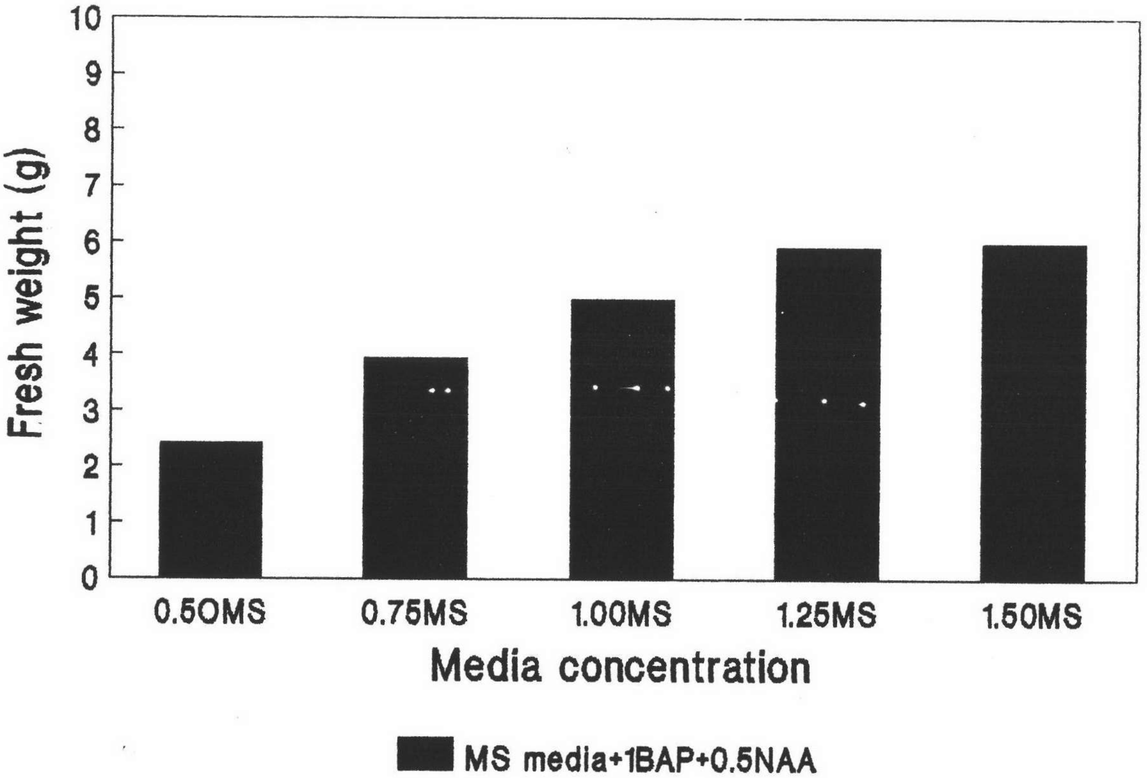
4. ระยะเวลาต่อการเจริญของแคลลัส

4.1 ภาวะแสง

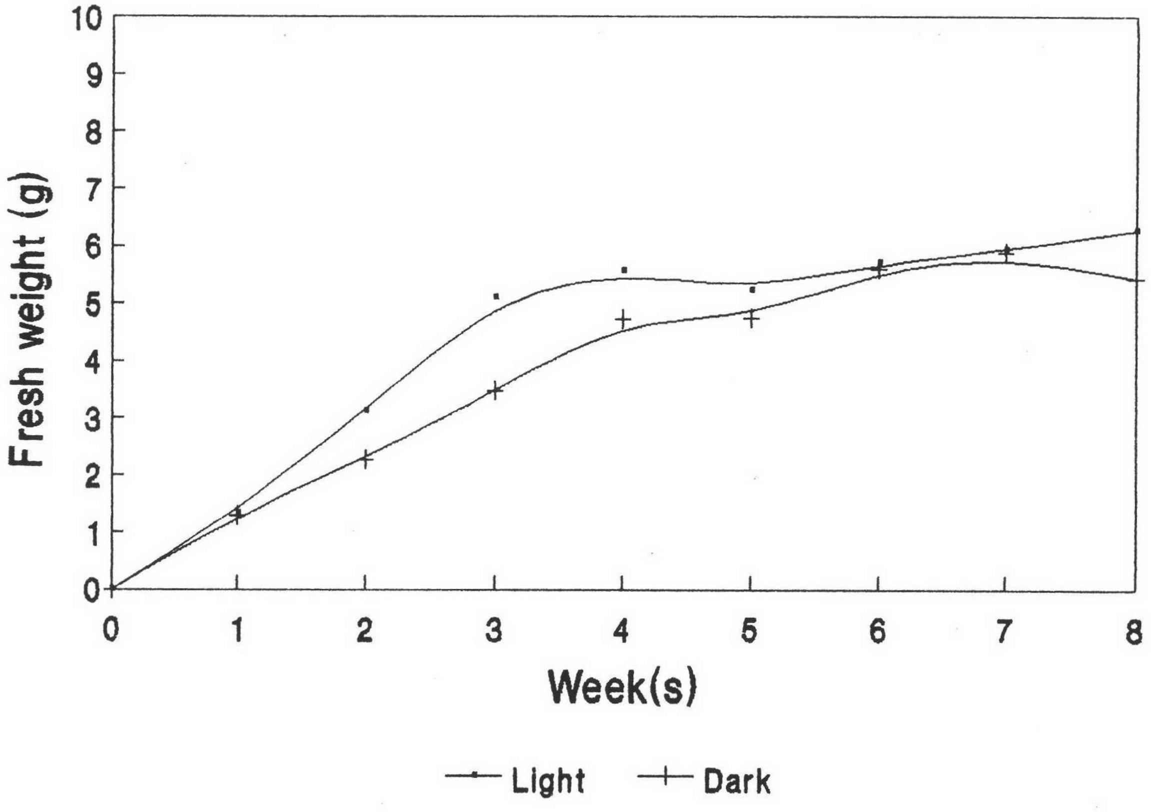
แคลลัสในภาวะมีแสงให้แคลลัส สีเหลืองปนเขียว อัตราการเพิ่มแคลลัสสูงกว่าในภาวะปราศจากแสง ซึ่งให้แคลลัสสีเหลืองเล็กน้อย แคลลัสทั้ง 2 ภาวะจะมีอัตราการเพิ่มแคลลัสสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4 อัตราการเพิ่มของแคลลัสเริ่มลดลง สัปดาห์ที่ 6 แคลลัสเริ่มตาย (รูปที่ 3.13)

4.2 สูตรอาหาร

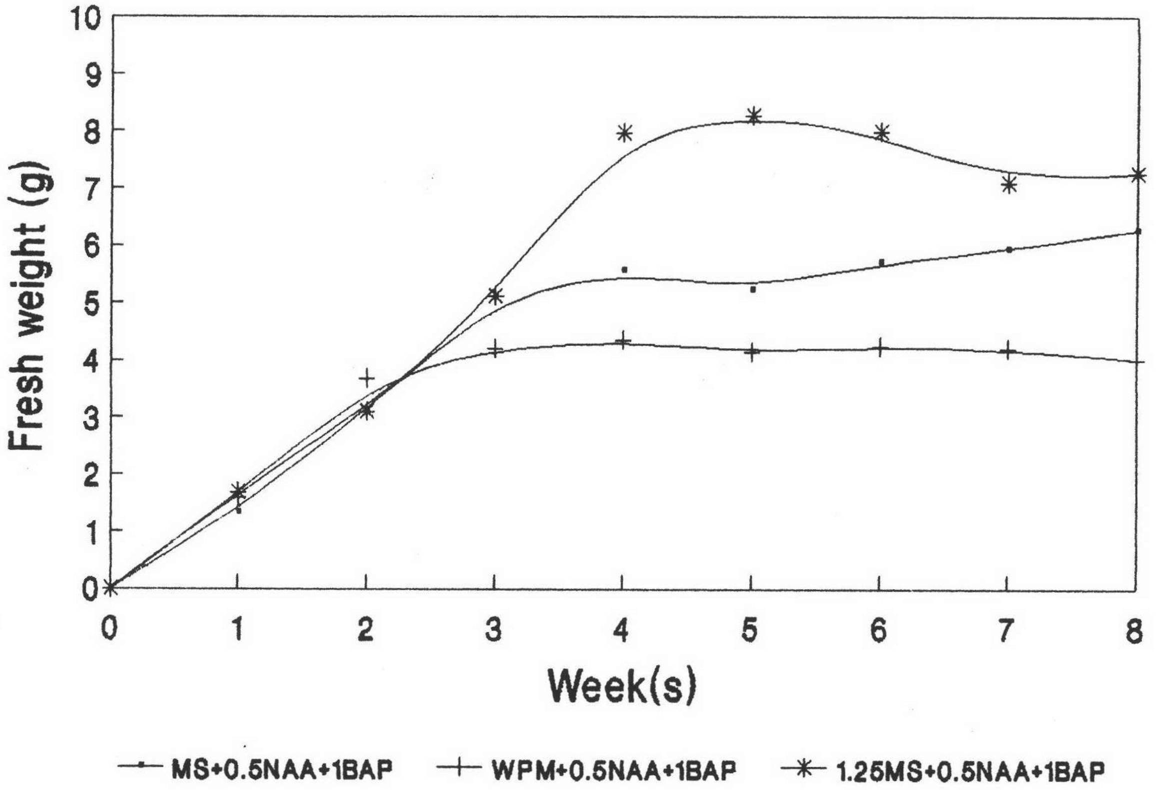
อัตราการเพิ่มแคลลัสใน 2 สัปดาห์แรกของอาหารทั้ง 3 สูตร อยู่ในอัตราใกล้เคียงกัน หลังสัปดาห์ที่ 2 อัตราการเพิ่มของแคลลัสในอาหารสูตร WPM เริ่มลดลง และปริมาณแคลลัสเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 3 ในอาหารสูตร MS อัตราการเพิ่มของแคลลัสเริ่มลดลงหลังจากสัปดาห์ที่ 3 และให้ปริมาณแคลลัสคงที่ในสัปดาห์ที่ 4 ในอาหารสูตร 1.25xMS ให้อัตราการเพิ่มของแคลลัสสูงสุด ในสัปดาห์ที่ 4 และเริ่มให้แคลลัสปริมาณคงที่ ในสัปดาห์ที่ 5 (รูปที่ 3.14)



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS ความเข้มข้นระดับ 0.5 0.75 1.0 1.25 และ 1.50 เท่า มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.13 กราฟแสดงอัตราการเจริญแคลลัส ในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ในที่มีแสงและปราศจากแสง (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์)



รูปที่ 3.14 กราฟแสดงอัตราการเจริญแคลลัสในอาหารสูตร MS WPM และ 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ในสภาพมีแสง (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์)

5. <u>อิทธิพลของการควบคุมการเจริญเติบโตต่อทิศทางการเจริญของแคลลัส</u>

5.1 ระดับความเข้มข้นของ BAP ต่อการเจริญของแคลลัสที่ NAA 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร

แคลลัสในอาหารที่มี NAA 0.25 มก.ต่อลิตร ให้ปริมาณแคลลัสเพิ่มขึ้น ตามระดับความเข้มข้นของ BAP ส่วนแคลลัสในอาหารที่มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร มีทิศทางการเพิ่มของแคลลัสไม่แน่นอน (รูปที่ 3.15) ที่ BAP ตั้งแต่ 4 มก.ต่อลิตรขึ้นไป แคลลัสสีค่อนข้างเหลืองถึงเหลืองปนน้ำตาล ใน NAA ทั้ง 2 ระดับ ในวิธีการทดลอง NAA ต่อ BAP 0.5:1.5 มก.ต่อลิตร ให้ยอดสีเขียว 1 ยอด

5.2 ระดับความเข้มข้นของ Kinetin ต่อการเจริญของแคลลัส

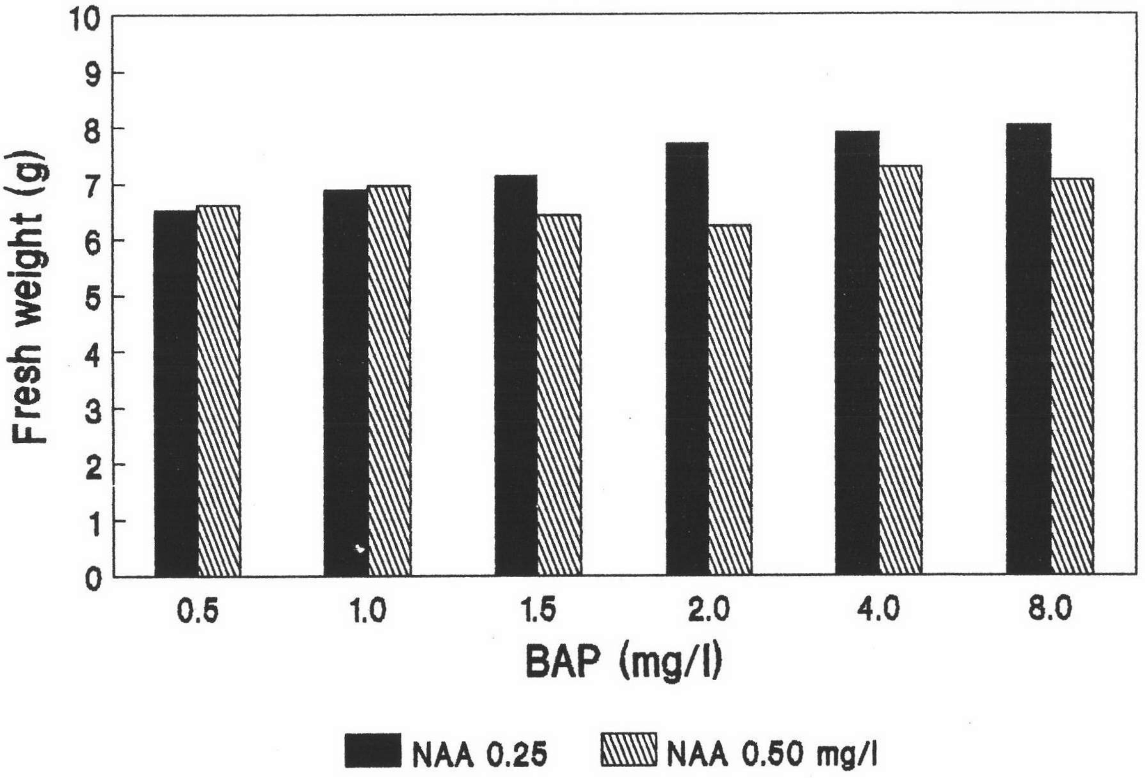
ระดับความเข้มข้นของ Kinetin มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญของแคลลัสที่ Kinetin ประมาณ 2 มก.ต่อลิตร แต่อัตราการเพิ่มไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 3.16)

5.3 ระดับความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญของแคลลัส

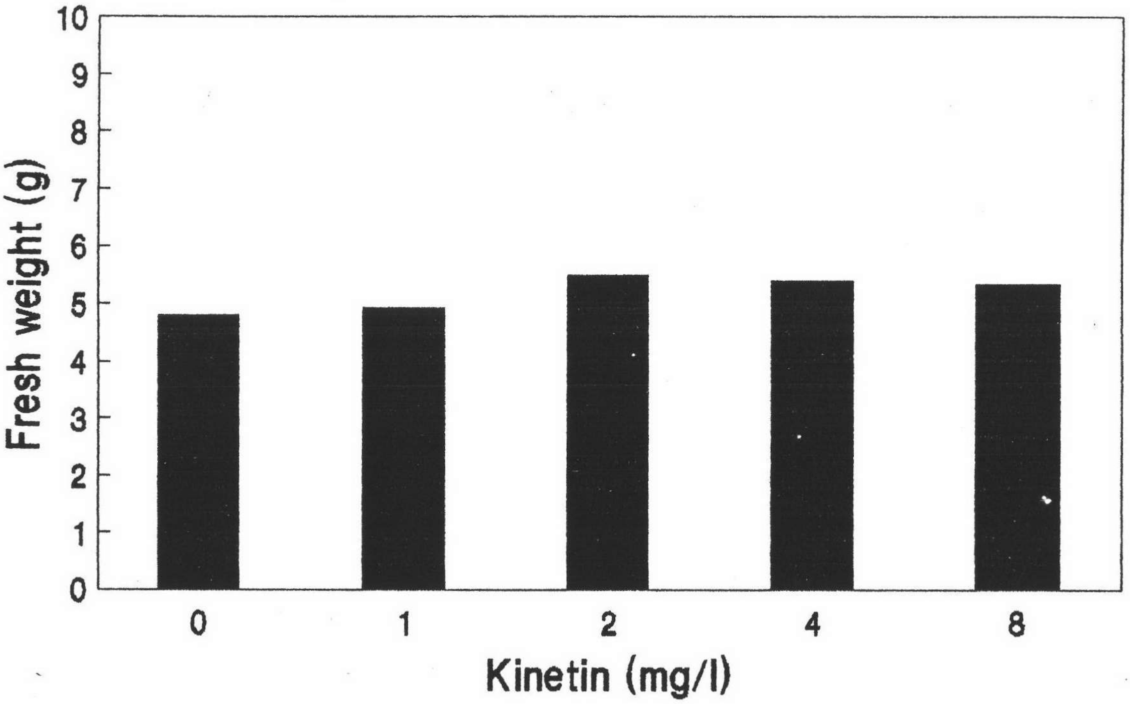
แคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ TDZ 0.5 มก.ต่อลิตร ให้น้ำหนักสดแคลลัสมากที่สุด 6.84 กรัม อาหารสูตร 1.25xMS และอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1 มก.ต่อลิตร ให้น้ำหนักสดแคลลัสมากที่สุด 6.12 กรัม ที่ TDZ 0.0 และ 2.0 กรัม ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างจาก TDZ ที่ระดับความเข้มข้นอื่นมากนัก (รูปที่ 3.17)

5.4 ระดับความเข้มข้นของ GA_3 ต่อการเจริญของแคลลัส

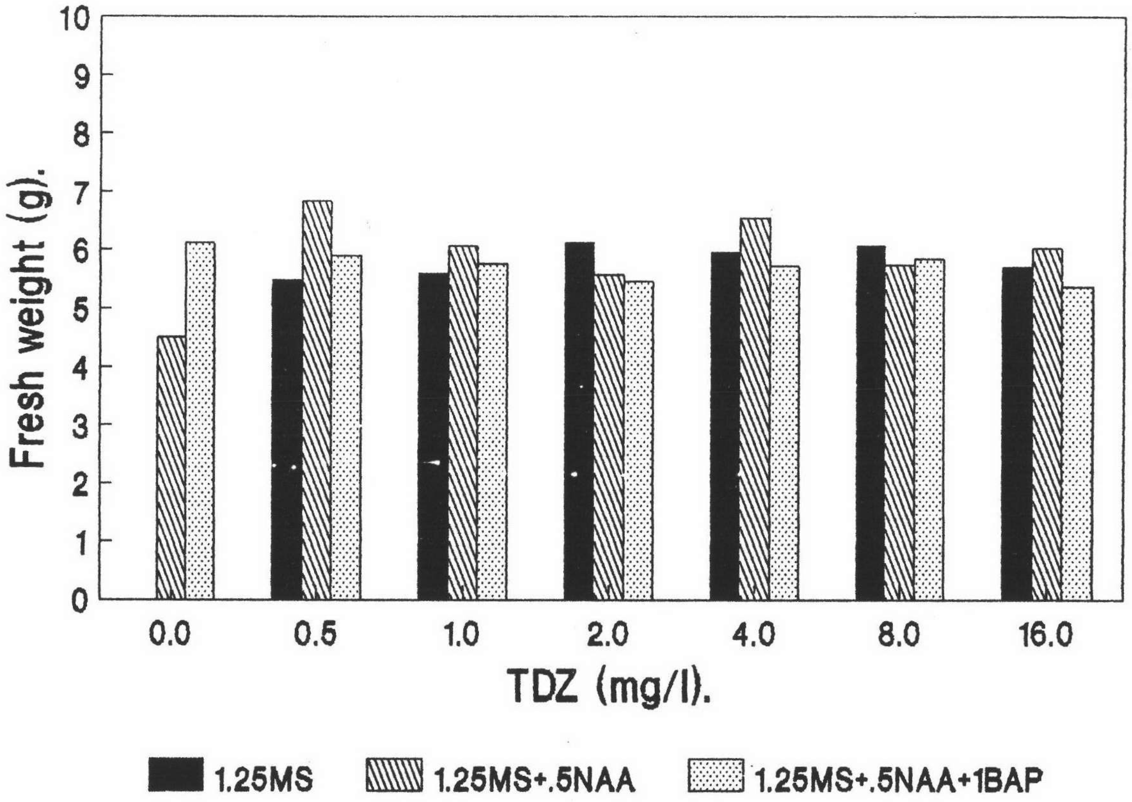
แคลลัสใน GA_3 ระดับความเข้มข้น 0.0 ถึง 4.0 มก.ต่อลิตร มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 3.18) แคลลัสมีสีเหลืองเพิ่มขึ้น ตามระดับความเข้มข้นของ GA_3 แต่เมื่อย้ายแคลลัสในอาหารเลี้ยงแคลลัสปกติ (MS NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร) พบว่าแคลลัสให้สีเขียวเพิ่มขึ้นกว่าปกติมาก แต่ไม่พบการพัฒนา



รูปที่ 3.15 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS ที่ NAA 0.25 และ 0.50 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 1.5 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.16 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตรร่วมกับ Kinetin 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.17 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS 1.25xMS มี NAA 0.5 มล.ต่อลิตร และ 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

ของแคลลัสในลักษณะ embryogenesis หรือ organogenesis (รูปที่ 3.18)

5.5 ระดับความเข้มข้นของ ABA ต่อการเจริญของแคลลัส

แคลลัสที่ได้จาก ABA 0.5 มก.ต่อลิตร ให้ปริมาณแคลลัสสูงที่สุด แต่แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่มากนัก ที่ ABA ประมาณ 2-8 มก.ต่อลิตร จะให้แคลลัสสีค่อนข้างเหลืองกว่าในวิธีการที่ปราศจาก ABA และ ABA ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงมา (รูปที่ 3.19)

6. <u>ปัจจัยบางอย่างเพิ่มเติมต่อการเจริญของแคลลัส</u>

6.1 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

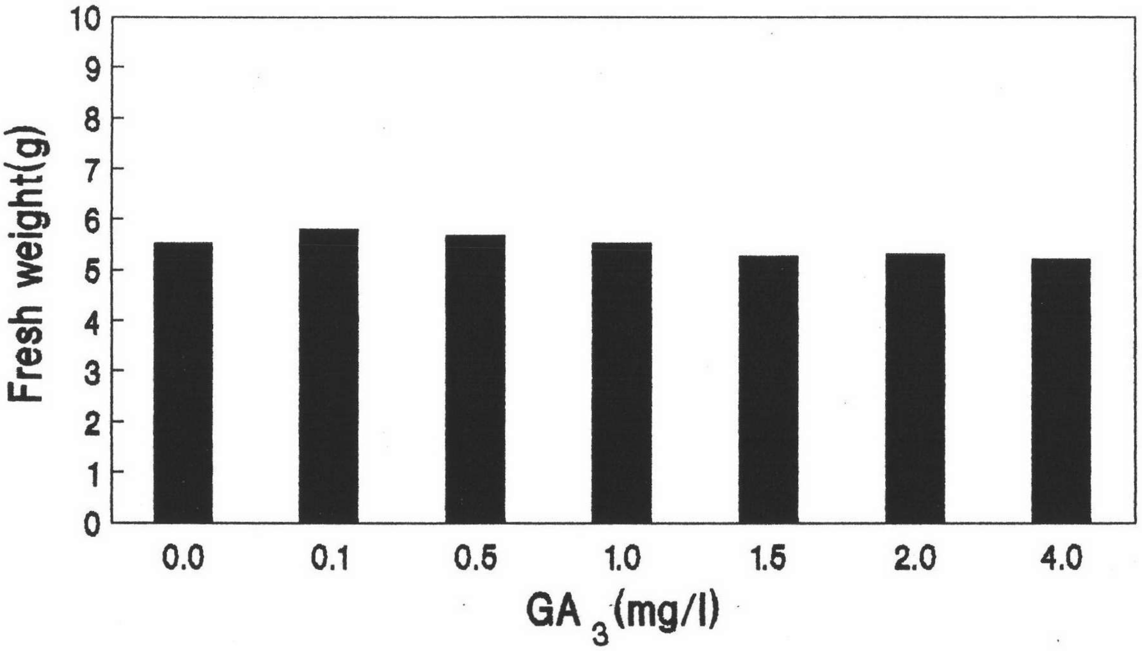
น้ำหนักสดแคลลัสเพิ่มขึ้น ตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งแต่ 1 ถึง 3 มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส ไม่แตกต่างจากน้ำตาลร้อยละ 3 มากนัก และเริ่มให้น้ำหนักสดลดลงในระดับน้ำตาลร้อยละ 6

ระดับน้ำตาลร้อยละ 5 ขึ้นไป ให้แคลลัสค่อนข้างเหลืองภายนอกแห้งแต่ภายในฉ่ำน้ำ

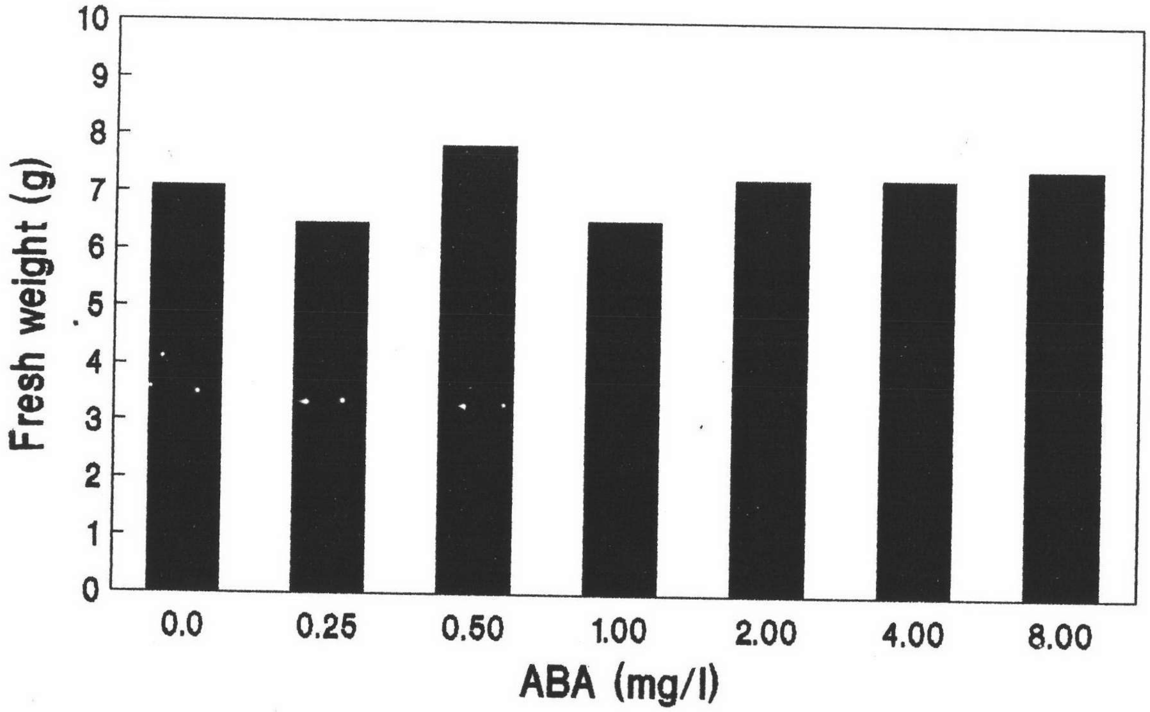
ระดับน้ำตาลร้อยละ 1 และ 2 ให้แคลลัสเหลืองที่มีการเจริญเติบโตต่ำ (รูปที่ 3.20)

6.2 ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอล

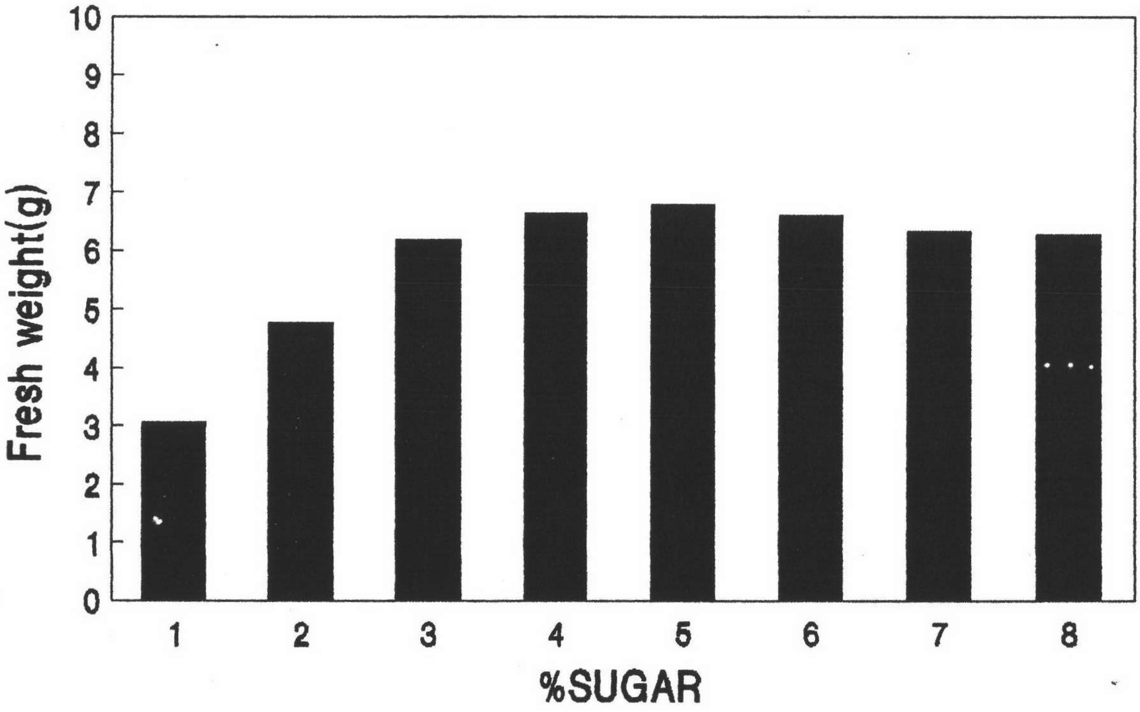
น้ำหนักสดแคลลัสเพิ่มขึ้น ตามระดับความเข้มข้นกลีเซอรอล ซึ่งจะให้ปริมาณแคลลัสที่ 500 มิลลิโมล ซึ่งสูงกว่า วิธีการทดลองที่ปราศจากกลีเซอรอล แต่ให้แคลลัสสีเหลืองถึงเหลืองปนน้ำตาล วิธีการทดลองที่มีกลีเซอรอล 100 และ 200 มิลลิโมล ให้น้ำหนักสดแคลลัสต่ำกว่าวิธีการทดลองที่ไม่มีกลีเซอรอล (รูปที่ 3.21)



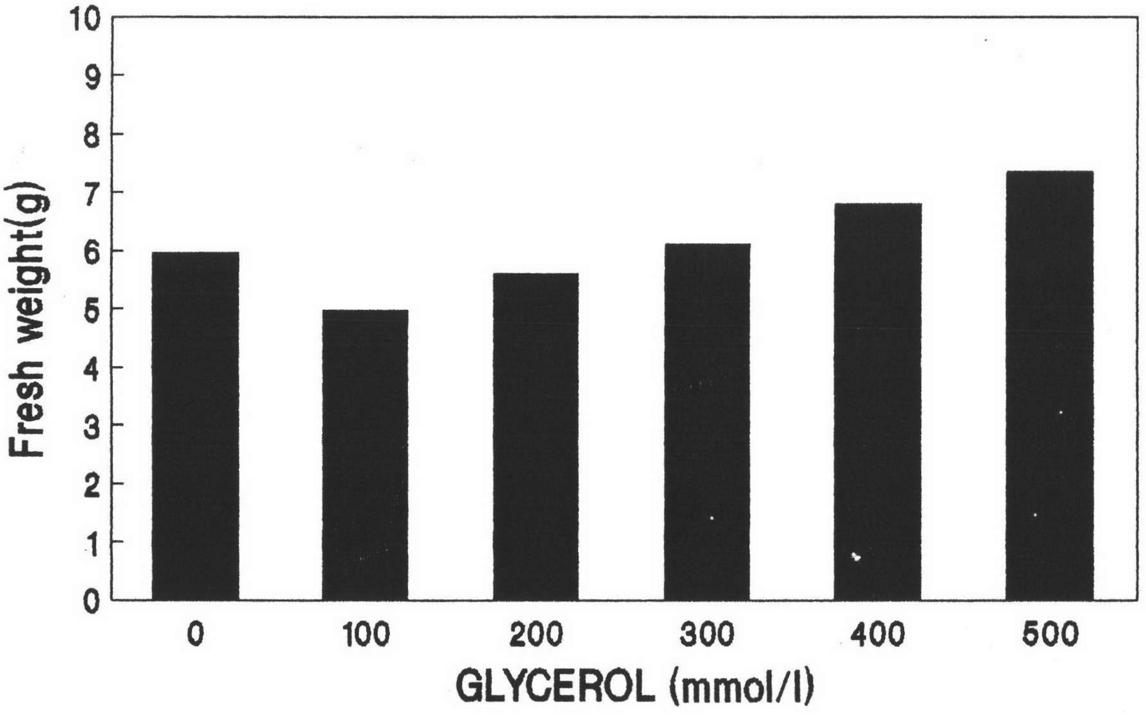
รูปที่ 3.18 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในสูตร MSมี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.19 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA:BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ ABA 0 0.25 0.5 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.20 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลร้อยละ 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.21 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับกลีเซอรอล 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

6.3 ไมโออิโนซิทอล (mio-inositol)

ไมโออิโนซิทอลในระดับที่แตกต่างกัน ให้ปริมาณการเพิ่มของแคลลัสไม่แตกต่าง แต่ที่ไมโออิโนซิทอลเพิ่มขึ้น ทำให้สีของแคลลัสสีเขียวเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.22)

6.4 เคซีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate)

ระดับเคซีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น มีผลต่ออัตราการเจริญของแคลลัสลดต่ำลง และให้สีเหลือง (รูปที่ 3.23)

6.5 ผงถ่าน (charcoal)

ในทุกวิธีการทดลองที่มีผงถ่านแคลลัสแห้งและตาย ใน 2-3 สัปดาห์ ส่วนวิธีการที่ไม่มีผงถ่านแคลลัสเจริญได้ตามปกติ

6.6 ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)

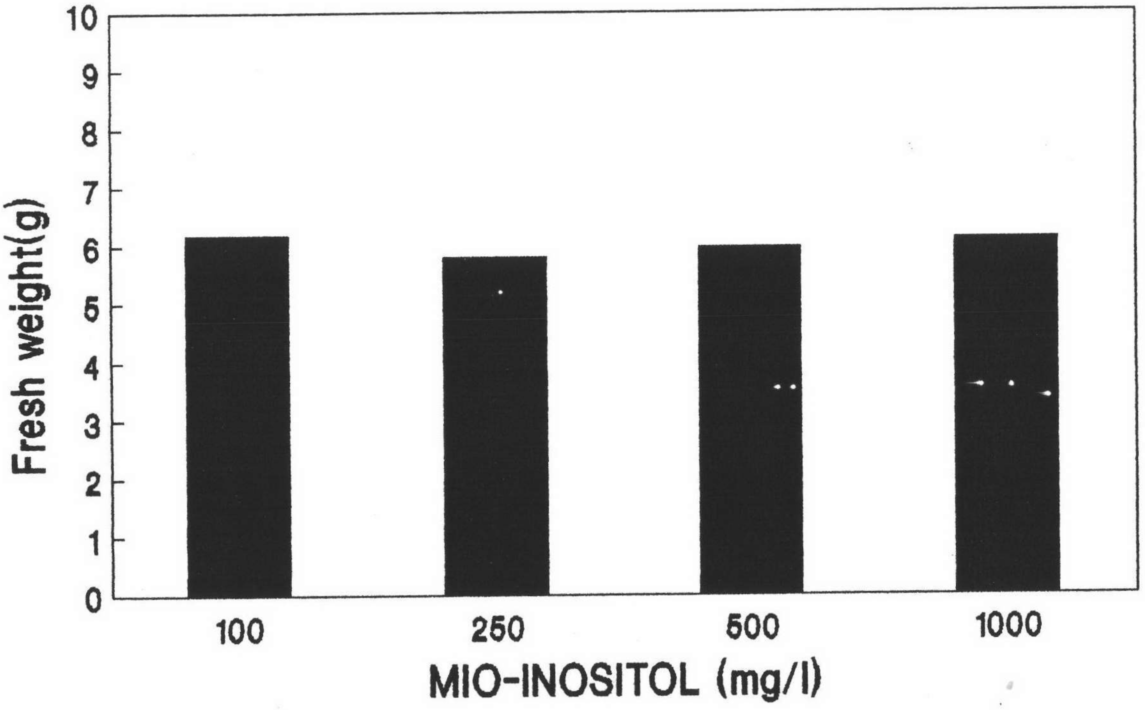
ในทุกวิธีการทดลองที่มีซิลเวอร์ไนเตรท แคลลัสจะตาย ใน 2 สัปดาห์ ส่วนวิธีการที่ไม่มีซิลเวอร์ไนเตรทแคลลัสเจริญได้ตามปกติ

6.7 กรดอะมิโน (Amino acid)

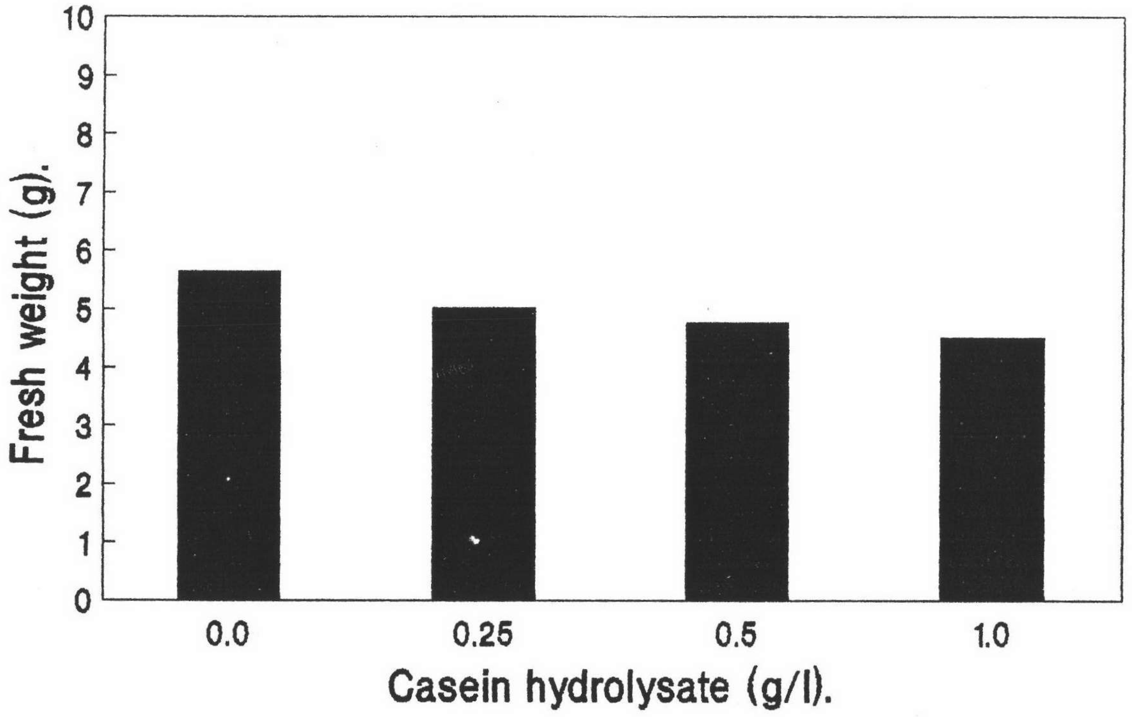
พบว่าวิธีการที่มีและไม่มีกรดอะมิโนให้แคลลัสที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 3.24)

6.8 ระดับความเข้มแสง

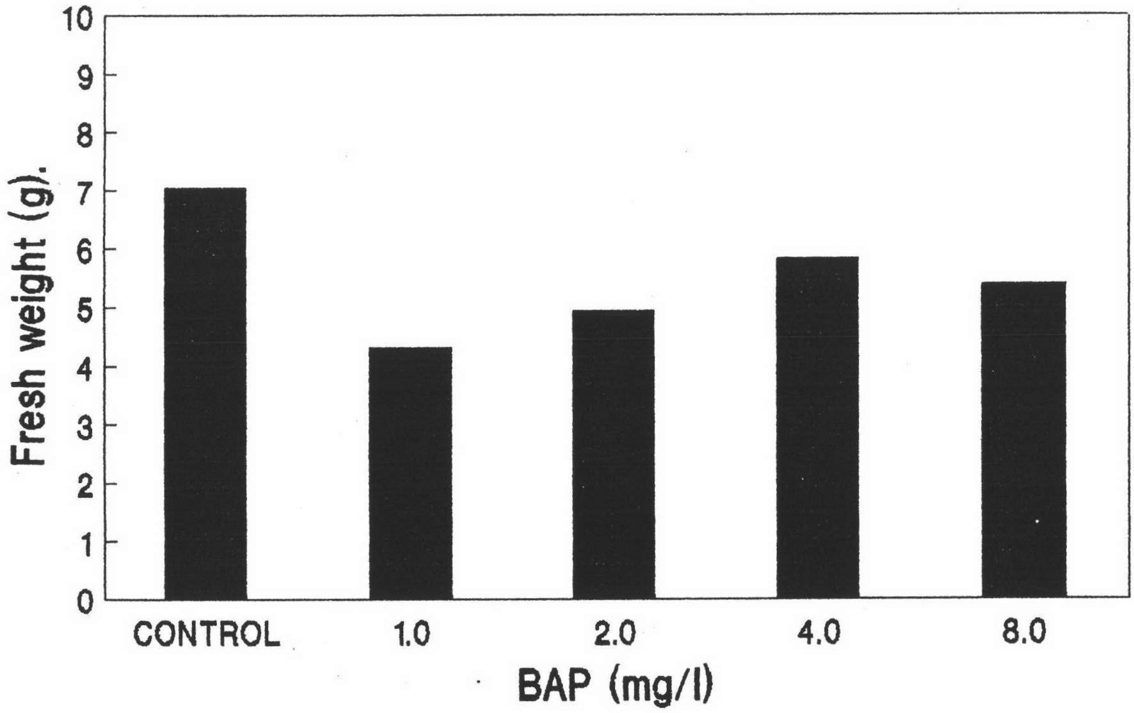
ระดับความเข้มแสงที่ 3,000 ลักส์ ให้น้ำหนักสดแคลลัสมากกว่า 2,000 ลักซ์ ในทุกวิธีการทดลองและแคลลัสมีสีเขียวเพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 3.25)



รูปที่ 3.22 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับไมโออิโนซิทอล 100 250 500 และ 1000 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

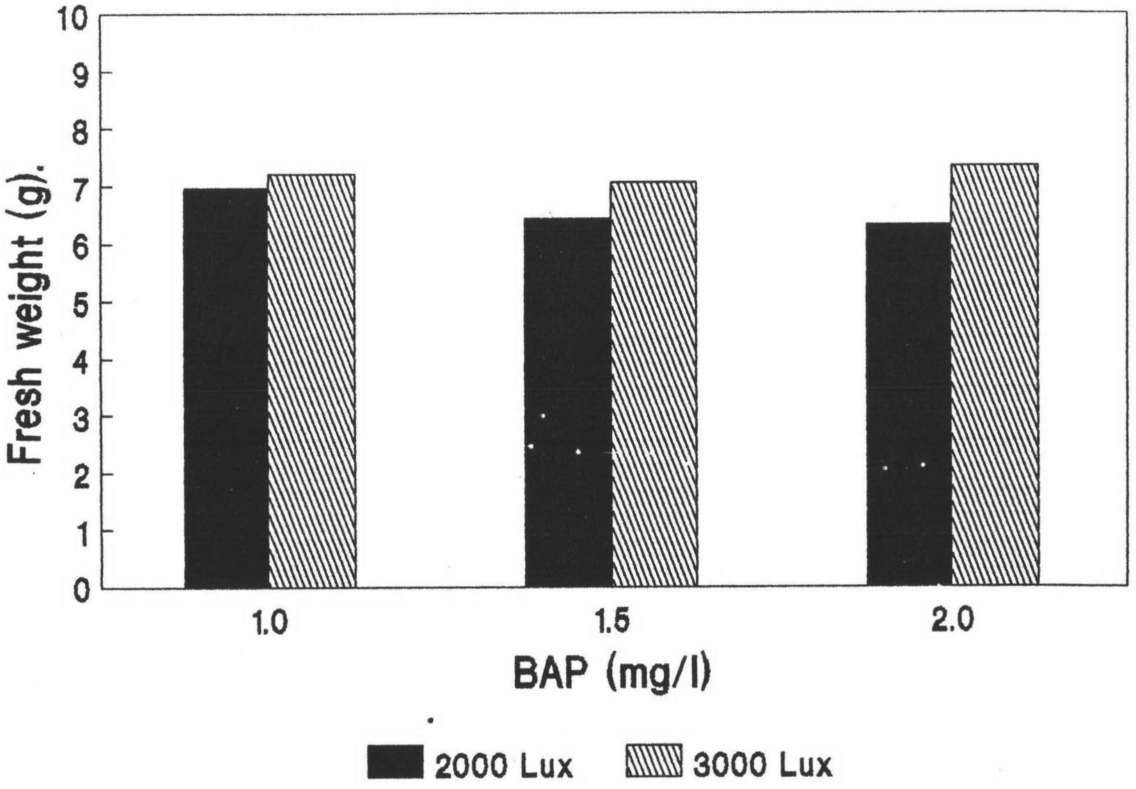


รูปที่ 3.23 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซต ระดับความเข้มข้น 0.0 0.25 0.50 และ 1.0 กรัมต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.24 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร MS ที่มีกรดอะมิโนร่วมกับ BAP 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร (ระยะเวลา 4 สัปดาห์)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.25 กราฟแสดงน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในอาหารสูตร 1.25xMS มี 0.5 มก.ต่อลิตรร่วมกับ BAP 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ในภาวะความเข้มแสง 2000 และ 3000 ลักส์ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

7. <u>การงอกใหม่จากแคลลัสชักนำ</u>

ระหว่างการเลี้ยงแคลลัสในช่วงการย้ายเนื้อเยื่อครั้งที่ 3-4 พบการเกิดยอดจากแคลลัสในอาหารเลี้ยงแคลลัสสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5 ต่อ 1.0 มก.ต่อลิตร แต่อัตราการเกิดไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการเกิดยอดได้ (รูปที่ 3.26)

<u>ปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด</u>

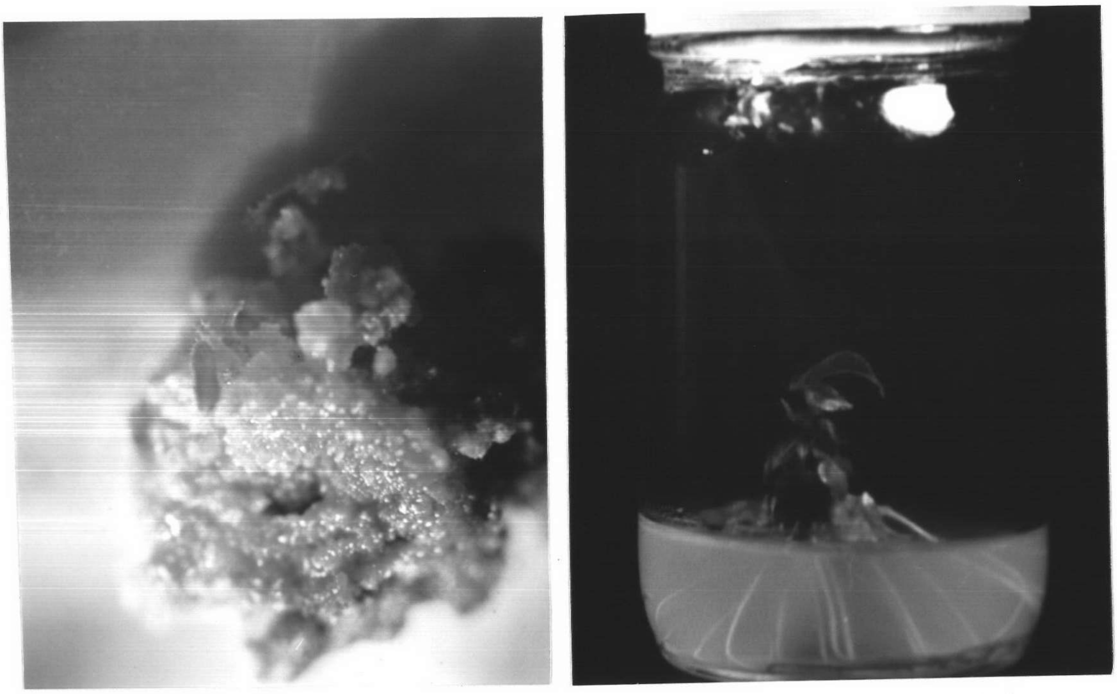
1. <u>การศึกษาอิทธิพลของอาหารต่อการชักนำให้เกิดยอด</u>

1.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดในระดับ BAP ต่างๆ

จากการทดลองพบว่าอาหารทั้ง 3 สูตร มีผลชักนำตายอดจากส่วนข้อ (รูปที่ 3.27) ตามความเข้มข้นของระดับ BAP โดยจะให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดที่ BAP 0.25 มก.ต่อลิตร BAP 0.5 1.0 และ 0.0 ให้จำนวนยอดรองลงมา ตามลำดับ อาหารทั้ง 3 สูตร มีผลช่วยชักนำให้เกิดตายอดแตกต่างกันมากในระดับ BAP 0.25 มก.ต่อลิตร อาหารสูตร SH ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 8.37 ยอด ส่วนอาหารสูตร MS และ WPM ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.12 และ 3.75 ยอด ตามลำดับ

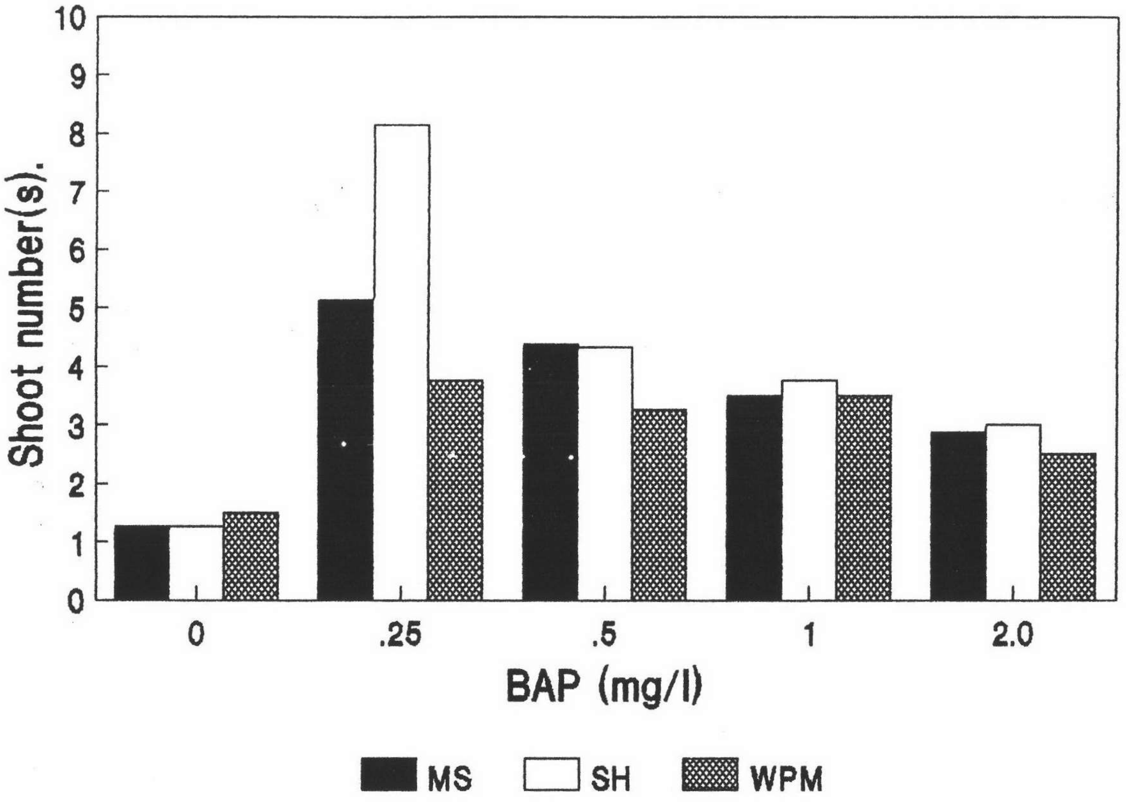
ระดับ BAP 0.5 มก.ต่อลิตร ยอดจะเริ่มหงิกงอมีลักษณะผิดปกติมีอาการมากขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของ BAP ในอาหารทั้ง 3 สูตร อาหารสูตร SH ให้จำนวนยอดมาก แต่ยอดสีเหลือง และมีจุดดำกระจายอยู่ทั้งยอด (necrosis) อาหารสูตร MS ยอดสีเขียวปนเหลืองค่อนข้างฉ่ำน้ำ และอาหารสูตร WPM ให้ยอดมีลักษณะปกติมากที่สุด ยอดยืดตัวดี

ระดับ BAP มก.ต่อลิตร ในอาหารสูตร WPM พบว่าตายอดยืดตัวให้ยอดลักษณะปกติ พบใบสีเหลืองมีจุดดำบ้างเล็กน้อย อาหารสูตร MS ตายอดยืดตัวน้อยมาก ส่วน SH พบว่ายอดยืดตัวในลักษณะผิดปกติ ใบสีเหลืองซีดและหงิกงอ



A B

รูปที่ 3.26 ภาพแสดงยอดที่เกิดจากแคลลัส (A) และต้นที่ได้จากยอดชักนำของแคลลัส (B)



รูปที่ 3.27 กราฟแสดงจำนวนยอด จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อ บนอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่มี BAP ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 1.0 และ 2.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 8 สัปดาห์)

เมื่อย้ายส่วนข้อที่ได้จากการชักนำให้เกิดยอด ลงในอาหารเดิม แต่ปราศจาก BAP พบว่า ยอดจากข้อที่ชักนำด้วย BAP 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร ยืดตัวเพียงเล็กน้อย ในอาหารสูตร MS และ SH สูตร SH ยอดยังคงแสดงอาการ necrosis ส่วนสูตร WPM ในยอดเจริญปกติ มีความยาวประมาณ 1-3 ซม. บางต้นให้ต้นและรากสมบูรณ์ ยอดจากข้อที่ชักนำด้วย BAP ตั้งแต่ 1.0 มก.ต่อลิตรขึ้นไป ในอาหารสูตร MS และ SH ยอดไม่มีการพัฒนาแบบผิดปกติ แต่ยืดตัวเพียงเล็กน้อย อาหารสูตร WPM ยอดเจริญได้แต่ลักษณะผิดปกติมีอาการหงิกงอ

1.2 ชิ้นส่วนพืชทดลอง

จากการทดลอง พบว่าเนื้อเยื่อส่วนข้อจะตอบสนองต่อ BAP 0.25 0.50 มก.ต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดตายอดในปริมาณที่สูงกว่า และให้ยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์กว่า การชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนยอด (รูปที่ 3.28)

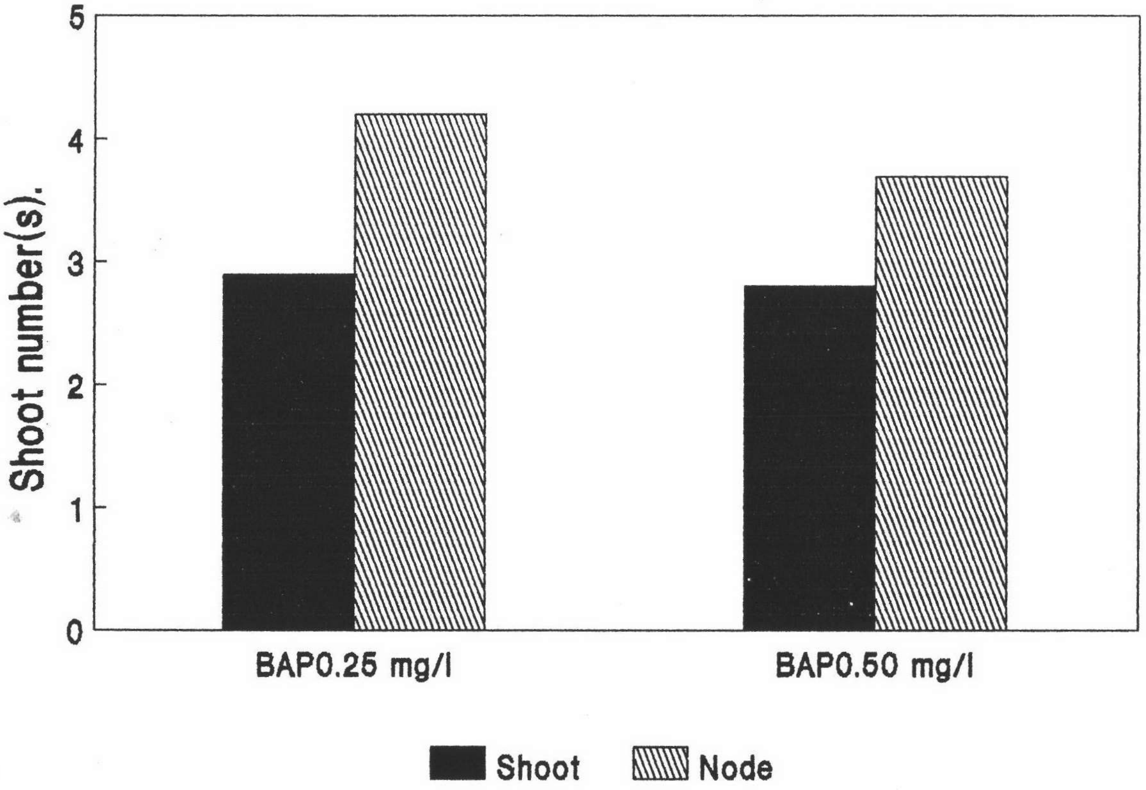
1.3 การเปลี่ยนแปลงสารบางตัวในสูตรอาหาร WPM

1.3.1 ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)

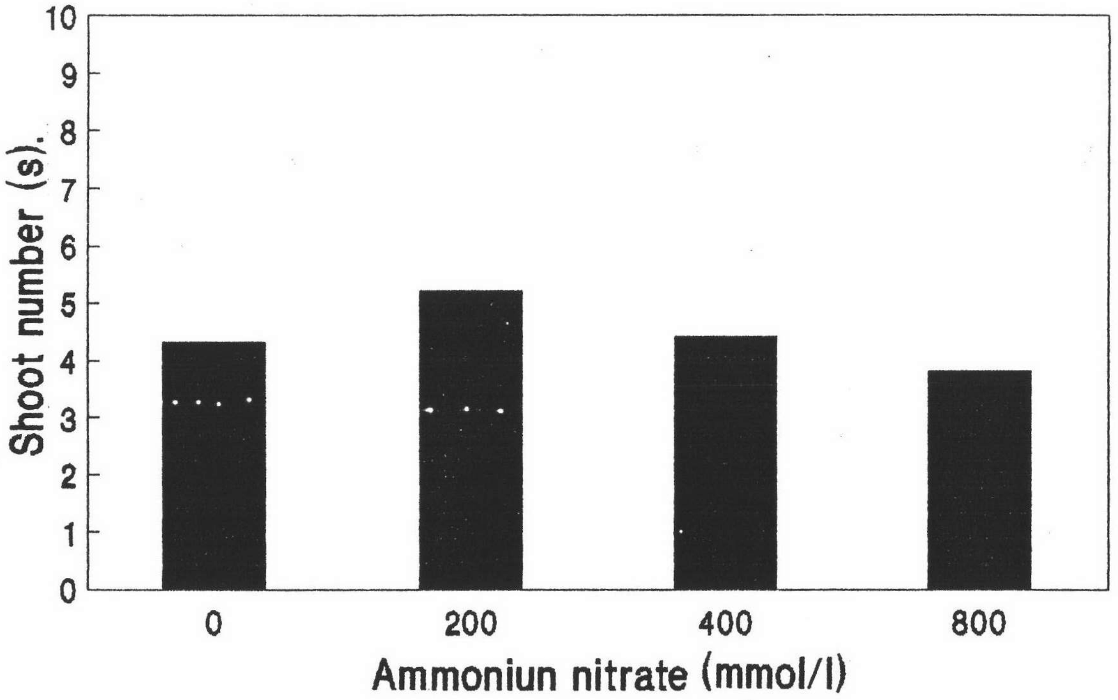
แอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 5.20 ยอด รองลงมาได้แก่ ความเข้มข้น 400 0 และ 800 มิลลิโมลต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.40 4.30 และ 3.80 ตามลำดับ (รูปที่ 3.29)

1.3.2 อัตราส่วนระดับความเข้มข้นของน้ำตาลและน้ำตาล-แอลกอฮอล์ (sorbital)

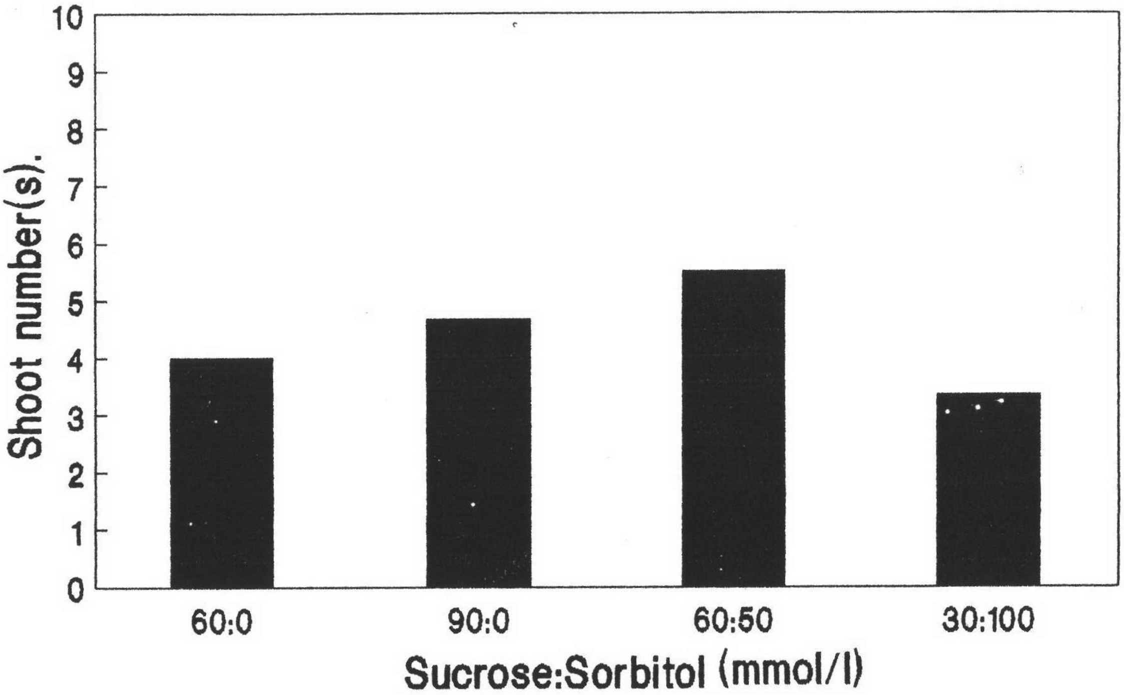
ระดับความเข้มข้นน้ำตาลที่เพิ่มจาก 60 มิลลิโมล(ร้อยละ 2) เป็น 90 มิลลิโมล (ร้อยละ 3) มีผลต่อการชักนำจำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 4.60 ยอด และเมื่อเปลี่ยนมาเพิ่มระดับน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sorbital) 50 มิลลิโมล พบว่าให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 5.50 ยอด ส่วนน้ำตาลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิโมล ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพียง 3.40 ยอด (รูปที่ 3.30)



รูปที่ 3.28 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอดและข้อ บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร(ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.29 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NH_4NO_3 0 200 400 และ 800 มิลลิโมล (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.30 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อ บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sorbital) อัตราส่วน 60:0 90:0 60:50 และ 30:100 มิลลิโมล (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

2. <u>สารเร่งการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด</u>

2.1 ผลของ BAP ความเข้มข้นที่ละเอียดเพิ่มขึ้น

ระดับความเข้มข้น BAP ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 มก.ต่อลิตร มีผลต่อการชักนำตายอดเพิ่มขึ้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 0.3 มก.ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ 0.25 0.4 0.5 0.2 0.1 และ 0 มก.ต่อลิตร ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.0 3.8 3.6 2.4 1.9 และ 1.0 ยอด (รูปที่ 3.31)

2.2 ผลการทำงานรวมกันของ BAP และ NAA

NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ที่ 0.1 และ 0.2 รวมกับ BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.90 และ 4.30 ยอด ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าที่ปราศจาก NAA ที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.80 ยอด เล็กน้อย (รูปที่ 3.32)

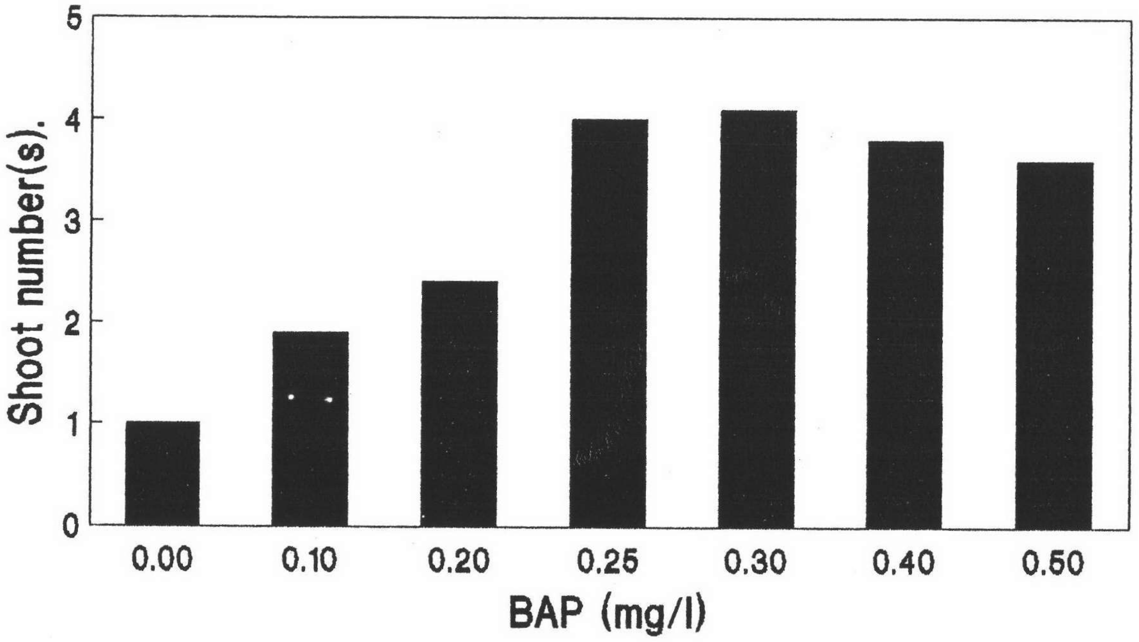
2.3 ระดับความเข้มข้นของ TDZ

TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลต่อการชักนำให้เกิดการเพิ่มตายอด สูงสุดที่ 0.25 มก.ต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.7 ยอด รองลงมาได้แก่ที่ 0.5 0.1 1.0 4.0 2.0 และที่ 0.0 8.0 ไม่มีผลในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด (รูปที่ 3.33)

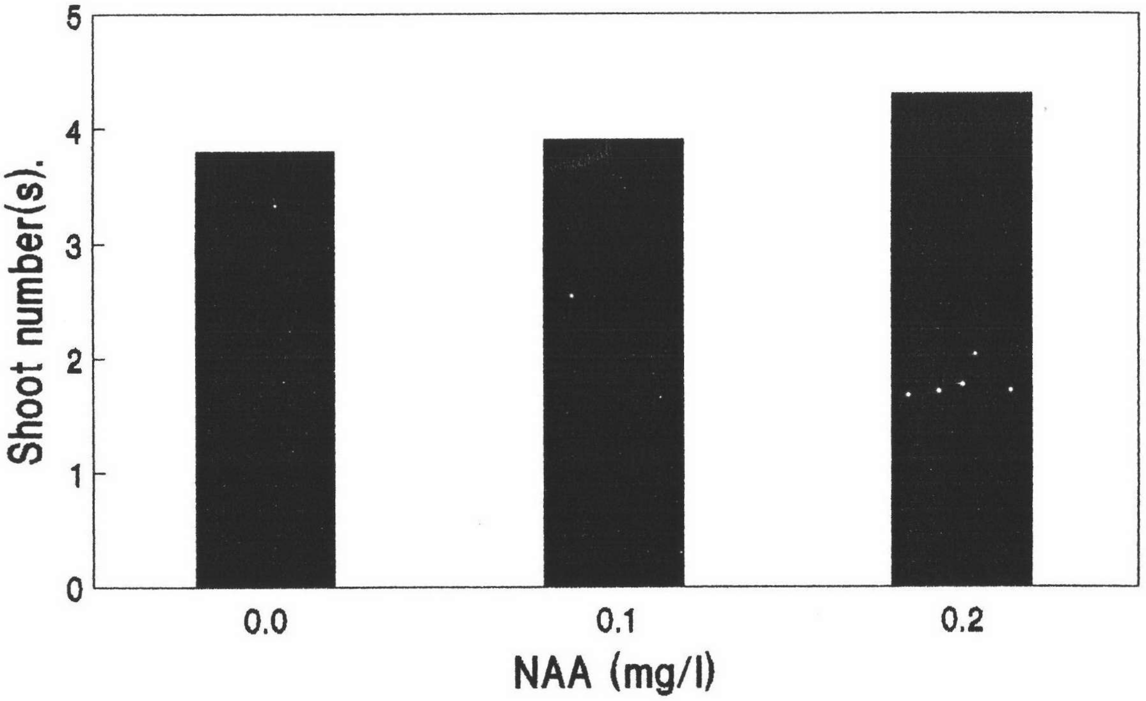
<u>ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการยืดตัวของตายอด</u>

1. <u>ระดับความเข้มข้นของ GA_3</u>

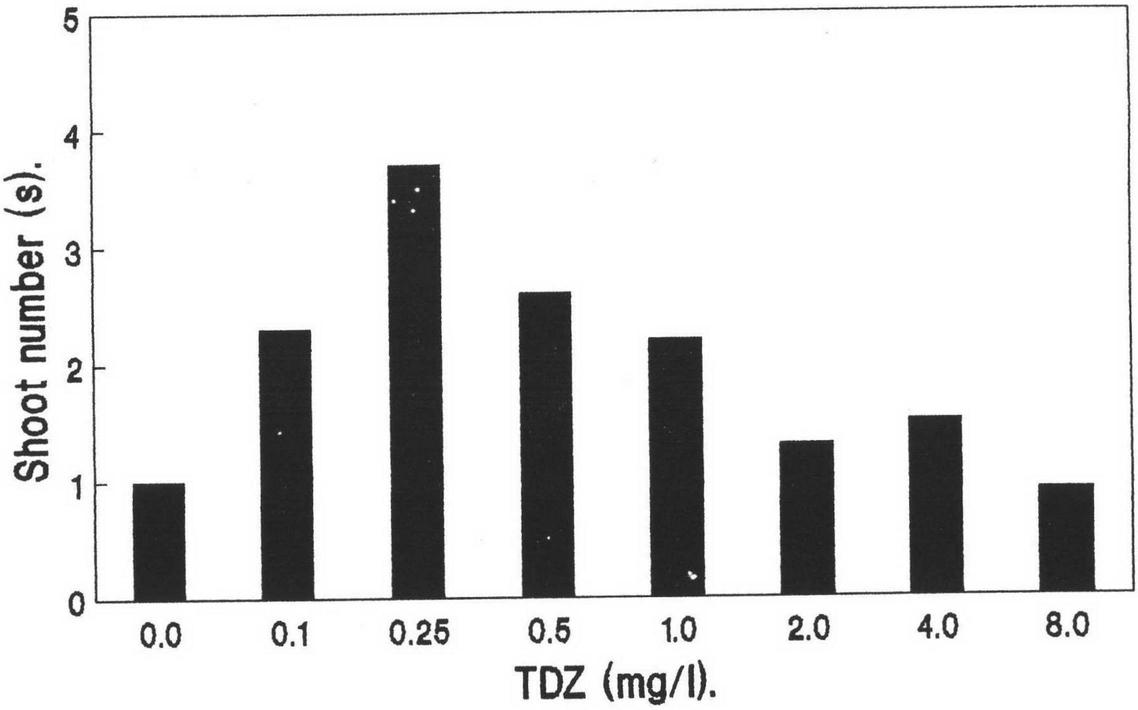
ในวิธีการทดลองที่ปราศจาก GA_3 ให้ยอดมีความยาวเฉลี่ยสูงสุดคือ 13.80 มม. รองลงมาได้แก่ GA_3 ระดับความเข้มข้น 1.0 4.0 2.0 0.25 0.5 และ 0.1 มก.ต่อลิตร ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ย 13.70 12.20 11.90 10.40 10.00 และ 8.20 มม. ตามลำดับ (รูปที่ 3.34) ลักษณะยอดที่ GA_3 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีลักษณะยืดตัวไม่ปกติ เมื่อย้ายลงในอาหารสูตร WPM มี NAA 1 มก.



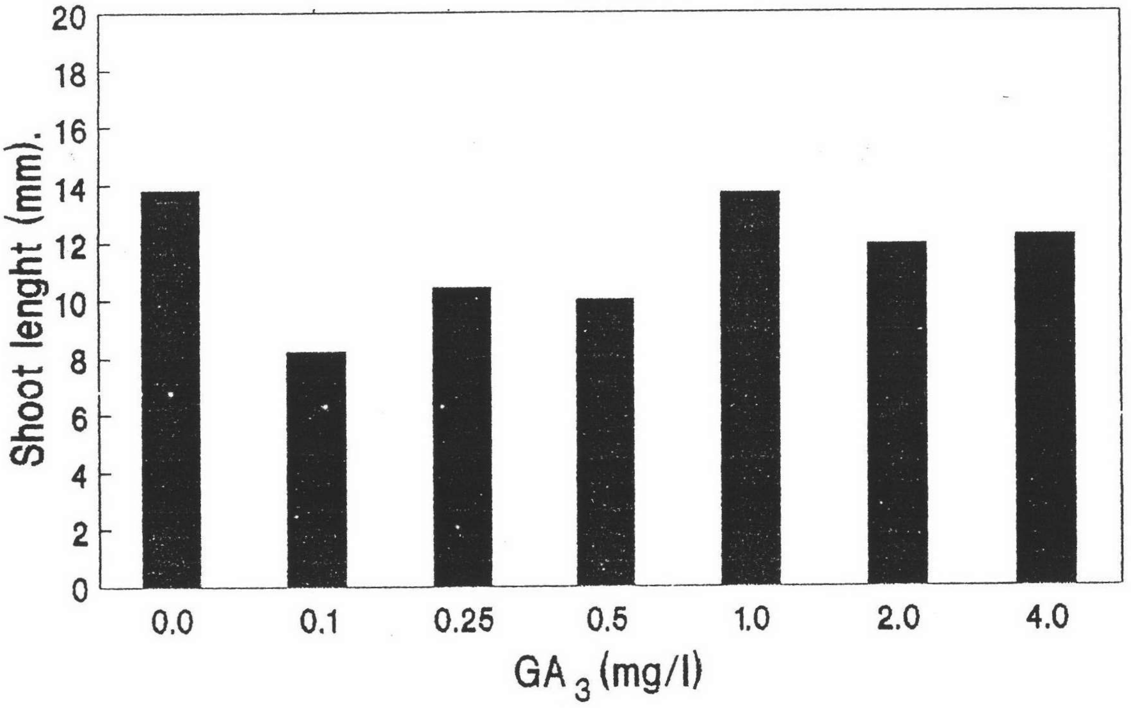
รูปที่ 3.31 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0 0.1 0.2 0.25 0.3 0.4 และ 0.5 มล.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.32 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ย จากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนยอด บนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 และ 0.2 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.33 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนข้อบนอาหารสูตร WPM มี TDZ 0 0.1 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.34 กราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ย (มม.) ที่ GA_3 ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร จากตายอดส่วนข้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

ต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก ในวิธีการทดลองที่ย้ายจาก GA_3 ระดับความเข้มข้น 0.1 ถึง 4.0 มก.ต่อลิตร ให้อัตราการเกิดราก ประมาณร้อยละ 10-30 ส่วนวิธีการทดลองที่ปราศจาก GA_3 ให้อัตราการเกิดรากประมาณร้อยละ 85

2. ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

น้ำตาลความเข้มข้นระดับร้อยละ 1.5-2.0 มีผลทำให้ตายอดจากส่วนข้อยืดดี มีความยาวประมาณ 20 มม. ตายอดจากส่วนยอดจะยืดตัวไว้ประมาณ 10 มม.ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ร้อยละ 1.5 และ 2.0 ต่อการยืดตัวของตายอดจากส่วนยอดไม่แตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 3.35)

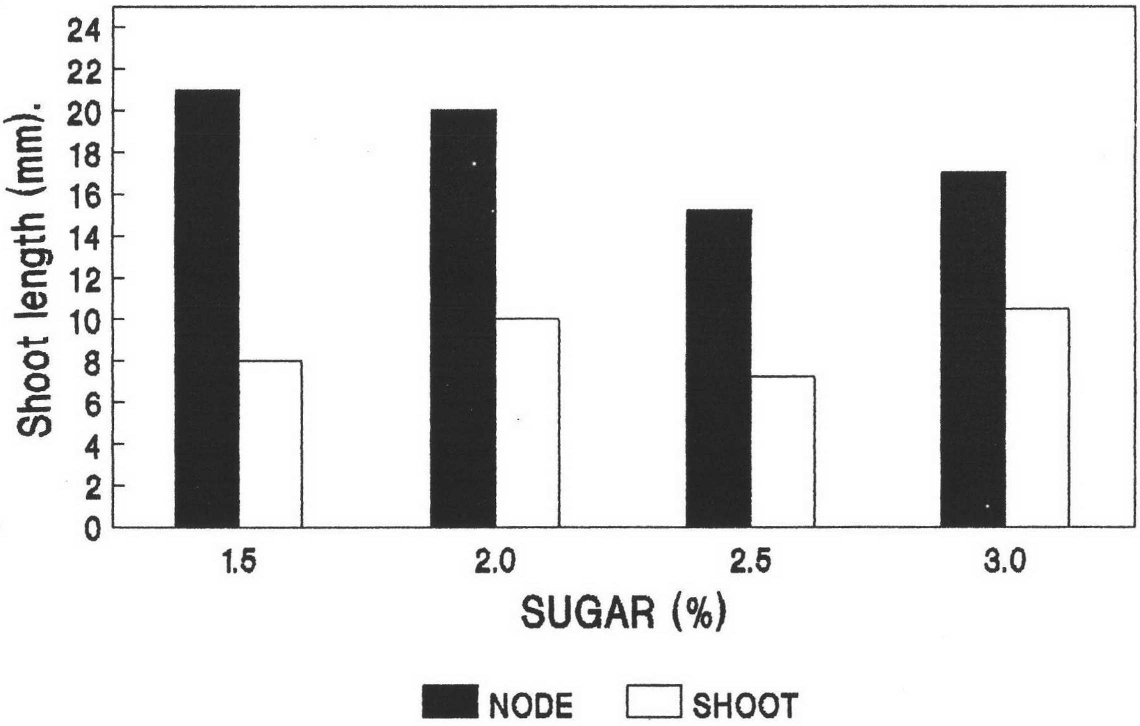
ปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก

1. การชักนำให้เกิดรากจากสารเร่งการเจริญเติบโต

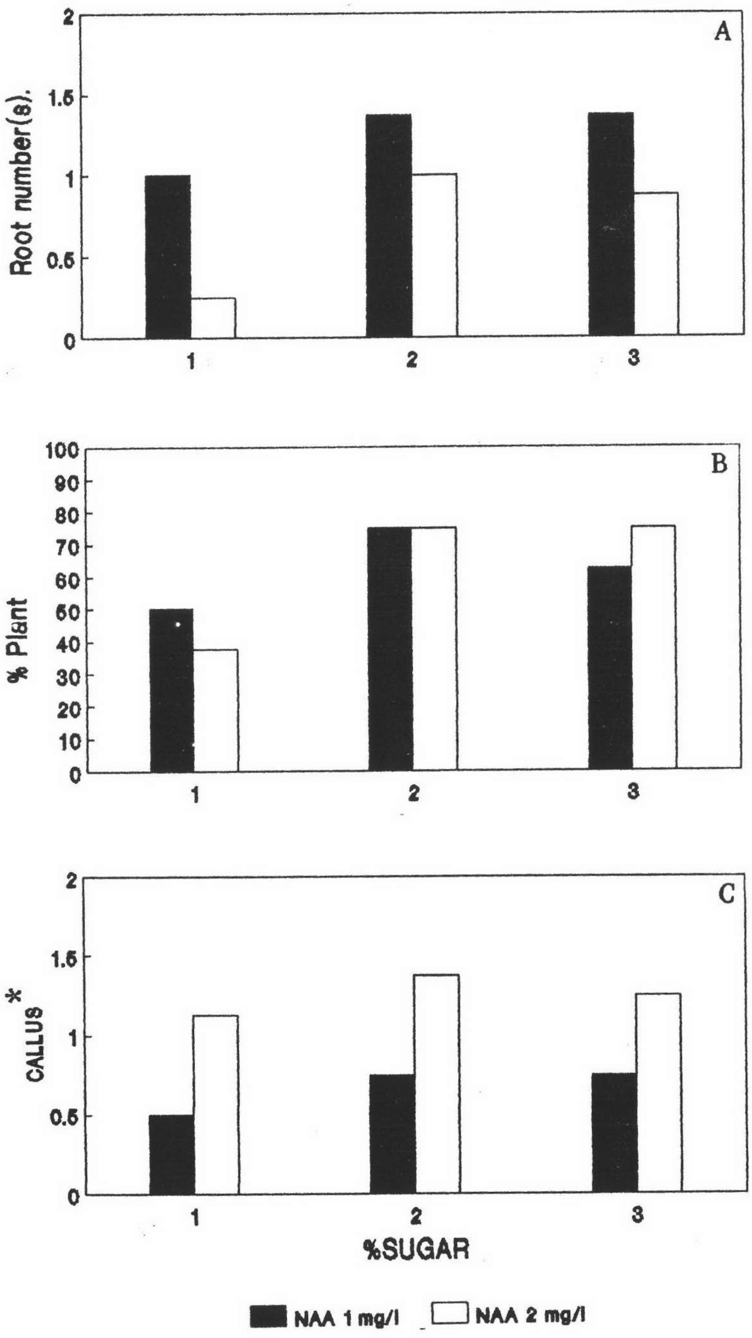
1.1 ความเข้มข้นของระดับน้ำตาล

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า สารเร่งการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้นระดับ 1.0-2.0 มก.ต่อลิตร ให้ผลในการชักนำรากจากส่วนข้อ จึงนำมาใช้ศึกษาถึงอิทธิพลร่วมกับความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในการชักนำให้เกิดรากจากส่วนกิ่ง ที่มีประมาณ 2-3 ข้อ พบว่า วิธีการทดลองที่มีน้ำตาลระดับร้อยละ 2 ให้ต้นที่เกิดรากสูงที่สุดร้อยละ 75 ใน NAA ทั้ง 2 ระดับ รองลงมาคือ ที่น้ำตาลร้อยละ 3 ต้นที่เกิดรากมีร้อยละ 75 และ 62.5 ที่ NAA 2 และ 1 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ และที่น้ำตาลร้อยละ 1 ให้ต้นเกิดรากร้อยละ 50 และ 37.5 ที่ NAA 1 และ 2 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ

NAA ระดับความเข้มข้น 2 มก.ต่อลิตร ให้จำนวนต้นเท่ากับที่ NAA 1 มก.ต่อลิตร แต่ให้จำนวนรากต่อต้นเฉลี่ยต่ำกว่า และทำให้เกิดแคลลัสมากกว่าในทุกระดับน้ำตาล (รูปที่ 3.36)



รูปที่ 3.35 กราฟแสดงความยาวยอดเฉลี่ย (มม.) ที่น้ำตาลระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 จากตายอดส่วนยอดและข้อ (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



* คะแนนการเกิดแคลลัส

(วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง)

0 = ไม่เกิดแคลลัส

1 < 0.5 ซม.

2 = 0.5 ถึง 1.0 ซม.

3 = 1.0 ถึง 1.5 ซม.

4 > 1.5 ซม.

รูปที่ 3.36 กราฟแสดงผลการชักนำด้วย NAA 1-2 มก.ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลร้อยละ 1 2 และ 3 ต่อการเกิดราก (A) ต้น (B) และแคลลัส (C) (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

1.2 สูตรอาหาร

อาหารสูตร WPM ให้จำนวนต้นที่เกิดรากสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 จำนวนร้อยละ 80 รองลงมาได้แก่ SH และ MS ให้จำนวนต้นสูงสุดจำนวนร้อยละ 66.67 และ 62 ในสัปดาห์ที่ 4 และ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 3.37)

1.3 ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหาร

อาหารสูตร WPM ที่ระดับความเข้มข้นปกติให้จำนวนต้นสูงสุดร้อยละ 91.67 รองลงมาคือ ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 0.5 เท่า ให้จำนวนต้นร้อยละ 83.33 และ 58.33 ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 3.38)

อาหารสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 เท่า ให้จำนวนยอดสูงสุดร้อยละ 75 และที่ MS ระดับความเข้มข้นปกติ ให้จำนวนต้นต่ำสุดร้อยละ 58.33 ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 3.39)

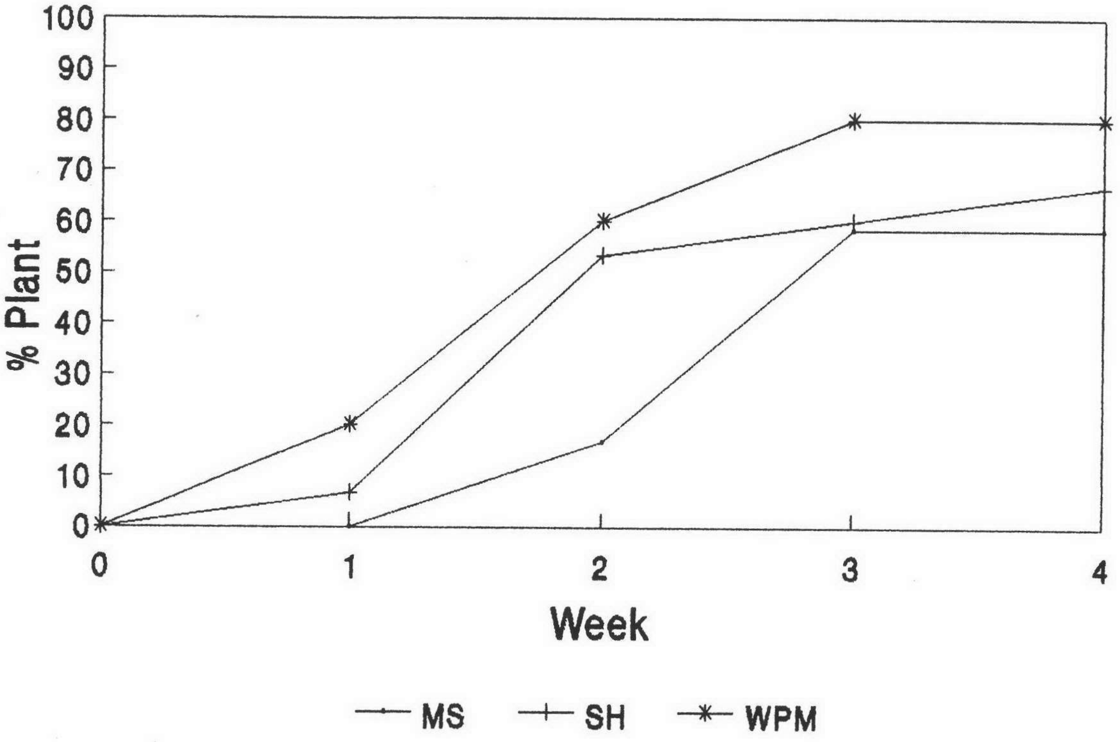
2. <u>การชักนำให้เกิดรากโดยแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes*</u>

หลังจากย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารเดิมที่เติม claforan 500 มก.ต่อลิตร ได้ประมาณ 10 วัน ใบจากต้นยาสูบจะเริ่มให้รากที่บริเวณรอยตัด ใบกวาวบนอาหารสูตร MS ใบจะเริ่มเหลือง เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนใบกวาวบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ต่อ BAP 0.5:0.5 มก.ต่อลิตร ใบจะให้แคลลัสแบบการชักนำแคลลัสปกติ (รูปที่ 3.40) โดยไม่เกิดมีราก

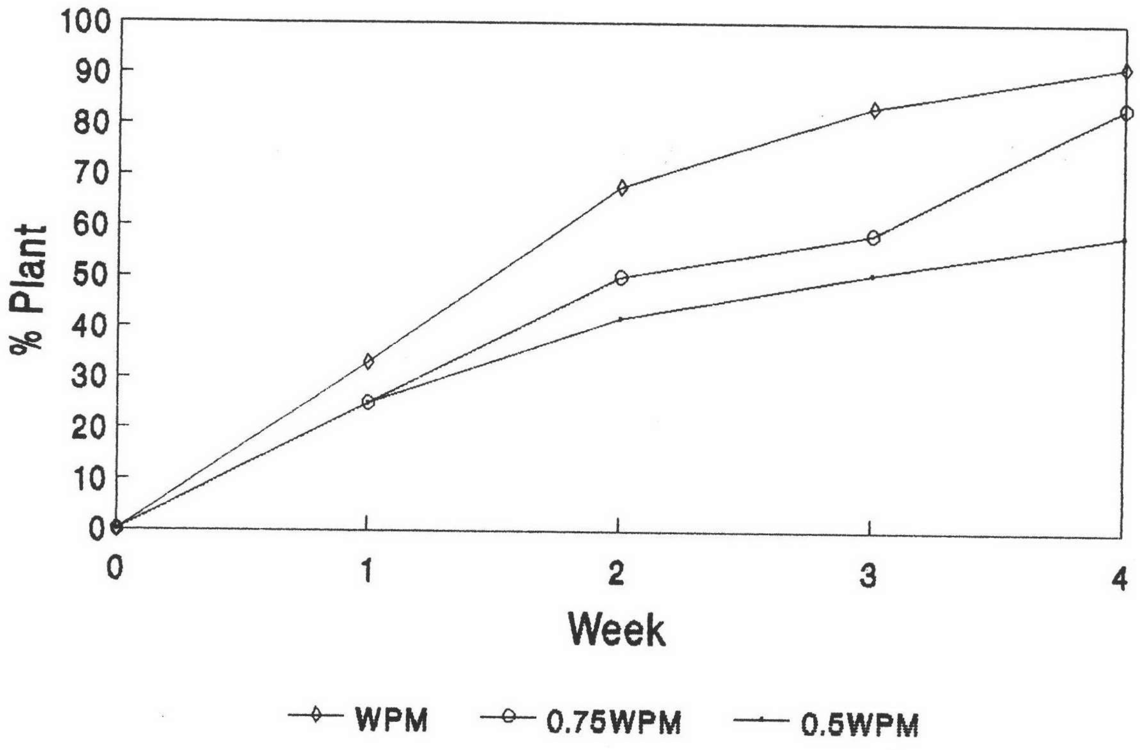
<u>ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรากพืชแบบแขวนลอย</u>

1. <u>สูตรอาหารที่เหมาะสม</u>

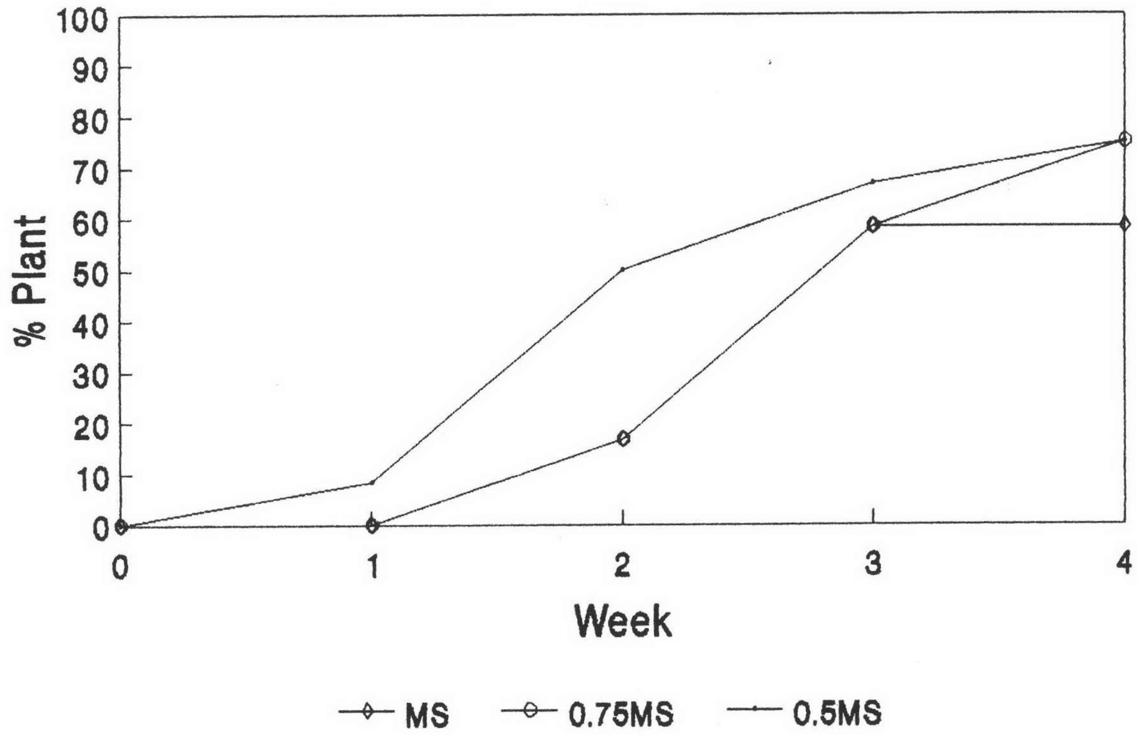
อาหารสูตร MS ให้น้ำหนักสดรากมากที่สุด 0.66 กรัม รองลงมา ได้แก่ สูตร SH WPM และ B5 ให้น้ำหนักสด 0.61 0.51 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 3.41)



รูปที่ 3.37 กราฟแสดงเปอร์เซนต์การเกิดต้นจากการชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่มี น้ำตาลร้อยละ 2 NAA 1 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



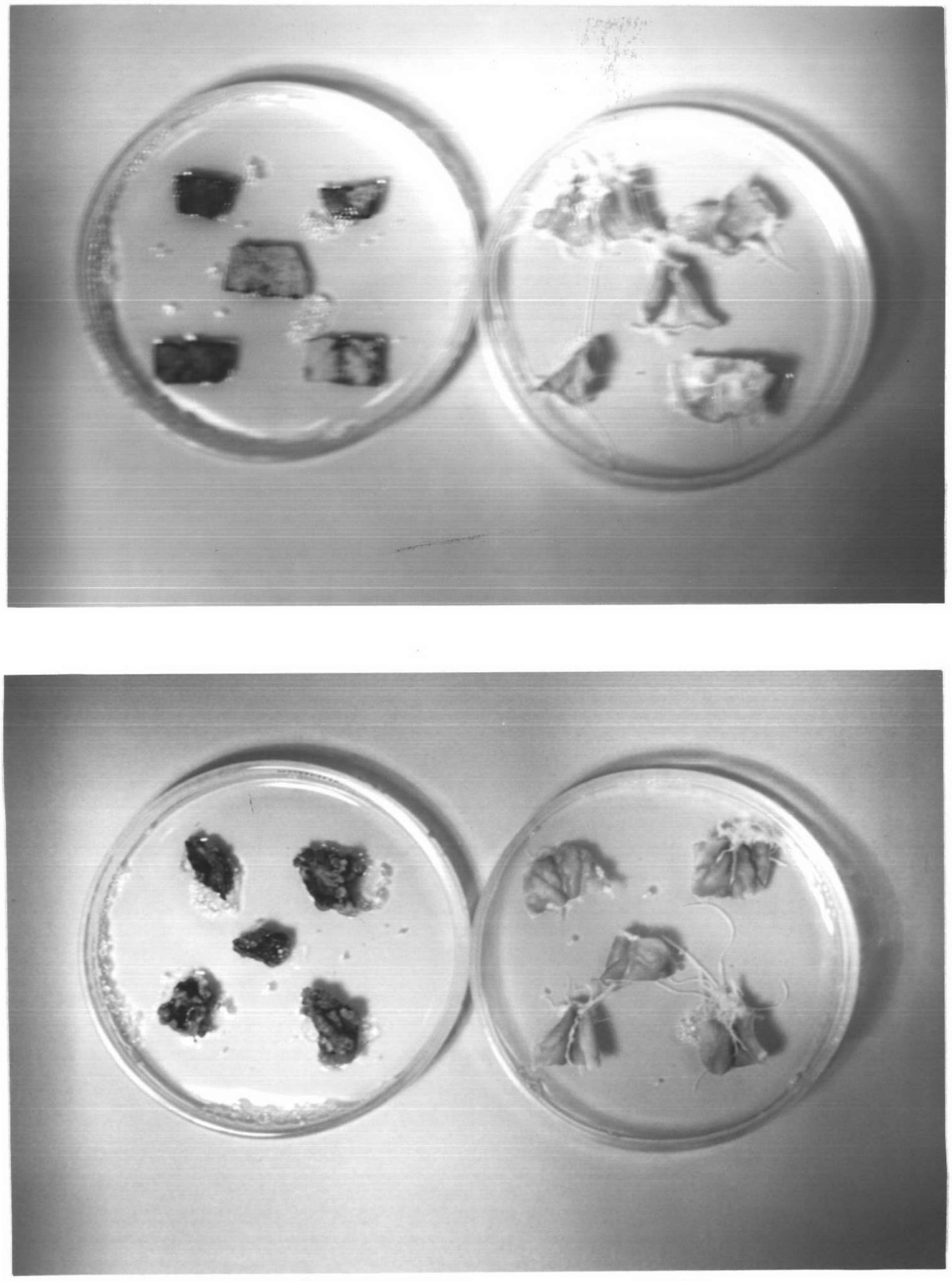
รูปที่ 3.38 กราฟแสดงผลของอาหารสูตร WPM ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 และระดับปกติ ต่อการชักนำให้เกิดราก (นระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.39 กราฟแสดงผลของอาหารสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 และระดับปกติ ต่อการชักนำให้เกิดราก (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

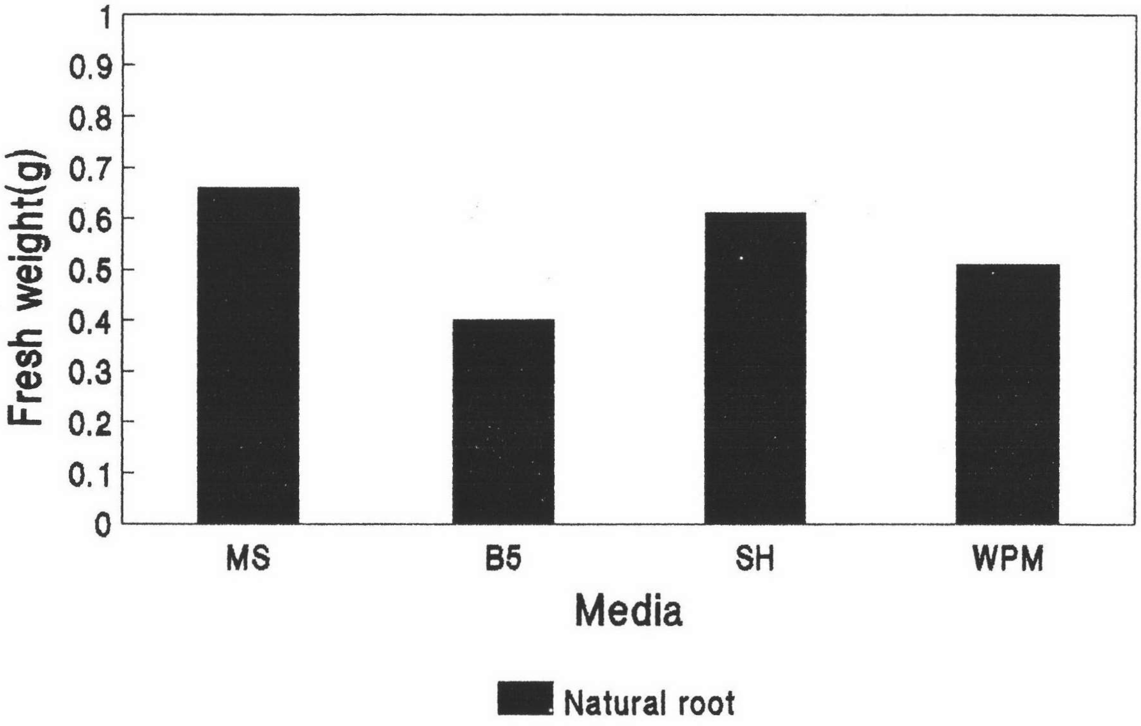
A

B



กวาวเครือขาว ยาสูบ

รูปที่ 3.40 ภาพแสดงผลการชักนำให้เกิดราก โดยแบคทีเรีย Agrobacterium rhizogenes ในอาหารสูตร MS (A) และ MS ที่มี NAA ต่อ BAP (B) 0.5:0.5 มก.ต่อลิตร ในกวาวเครือขาวเปรียบเทียบกับยาสูบ



รูปที่ 3.41 กราฟแสดงน้ำหนักสดของรากที่เพิ่มขึ้น ในอาหารเหลวสูตร MS B5 SH และ WPM (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

2. ระยะเวลาต่อการเจริญของราก

ในระยะเวลา 2 สัปดาห์แรก น้ำหนักสดรากมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก หลังจากสัปดาห์ที่ 2 น้ำหนักสดรากเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ให้น้ำหนักมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 คือ 0.23 และ 0.78 กรัม จากรากชักนำและรากธรรมชาติ ตามลำดับ หลังจากนั้นน้ำหนักสดรากเริ่มลดลง (รูปที่ 3.42)

3. ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

ระดับความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 3 ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยของรากสูงที่สุด 0.91 กรัม รองลงมา ได้แก่ระดับน้ำตาลร้อยละ 2 4 1 และ 5 ให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.81 0.63 0.62 และ 0.54 กรัม (รูปที่ 3.43)

4. ระดับความเข้มข้นของ NAA

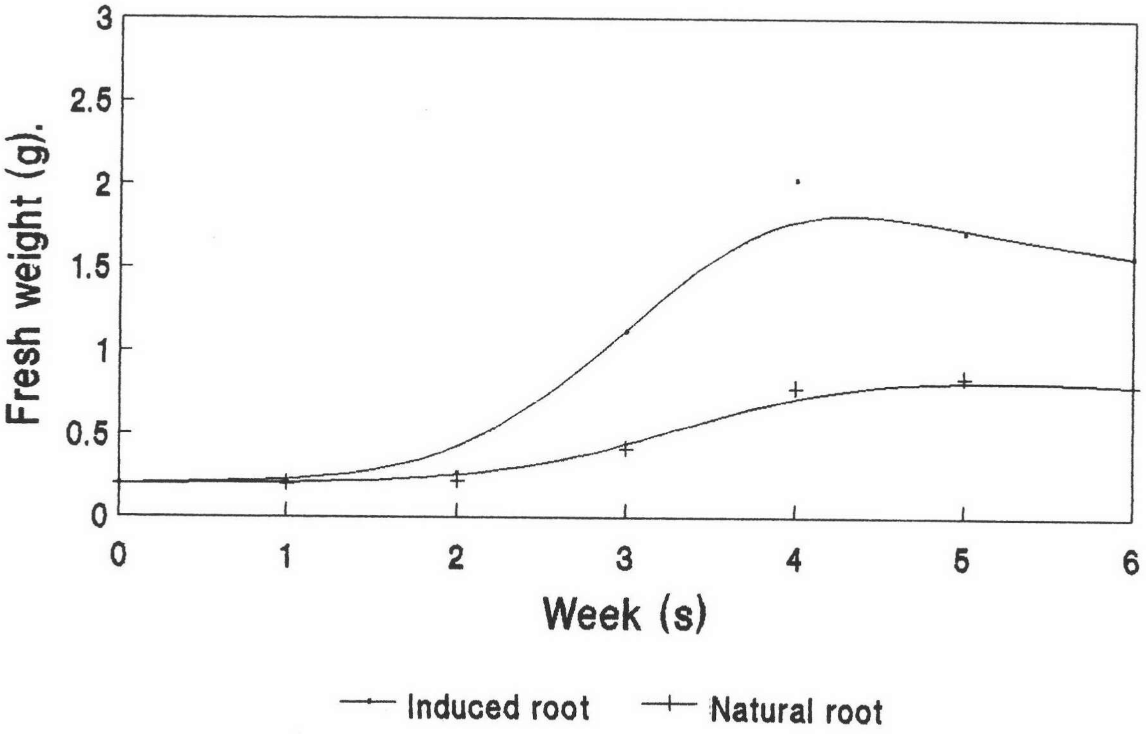
รากธรรมชาติ ให้น้ำหนักสดรากตามระดับความเข้มข้นของ NAA ให้น้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด 4.55 กรัม ที่ NAA 0.1 มก.ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ ที่ NAA 0.5 0.1 และ 0 มก.ต่อลิตร ซึ่งให้น้ำหนักเฉลี่ย 2.47 0.93 และ 0.62 กรัม ตามลำดับ

รากจากการชักนำด้วย NAA 1 มก.ต่อลิตร ให้น้ำหนักรากเฉลี่ยมากที่สุด 3.88 กรัม ที่ NAA 0.5 มก.ต่อลิตร รองลงมาได้แก่ ที่ NAA 1.0 0.1 และ 0 มก.ต่อลิตร ให้น้ำหนักเฉลี่ย 3.82 2.29 และ 1.42 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 3.44)

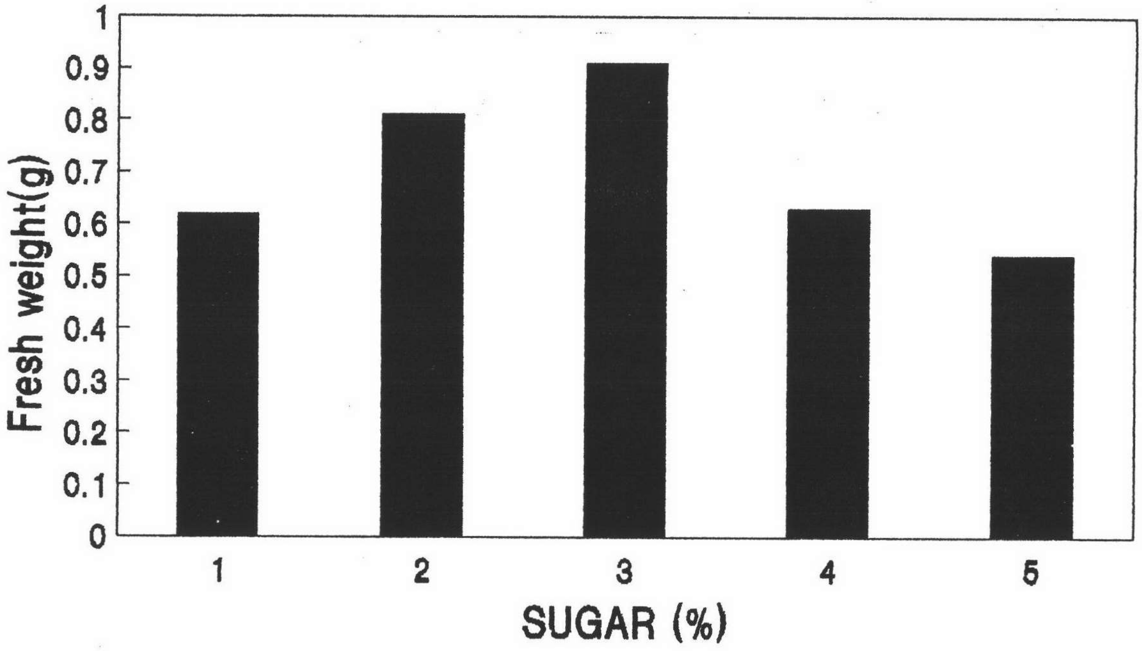
ปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ

1. สูตรอาหาร

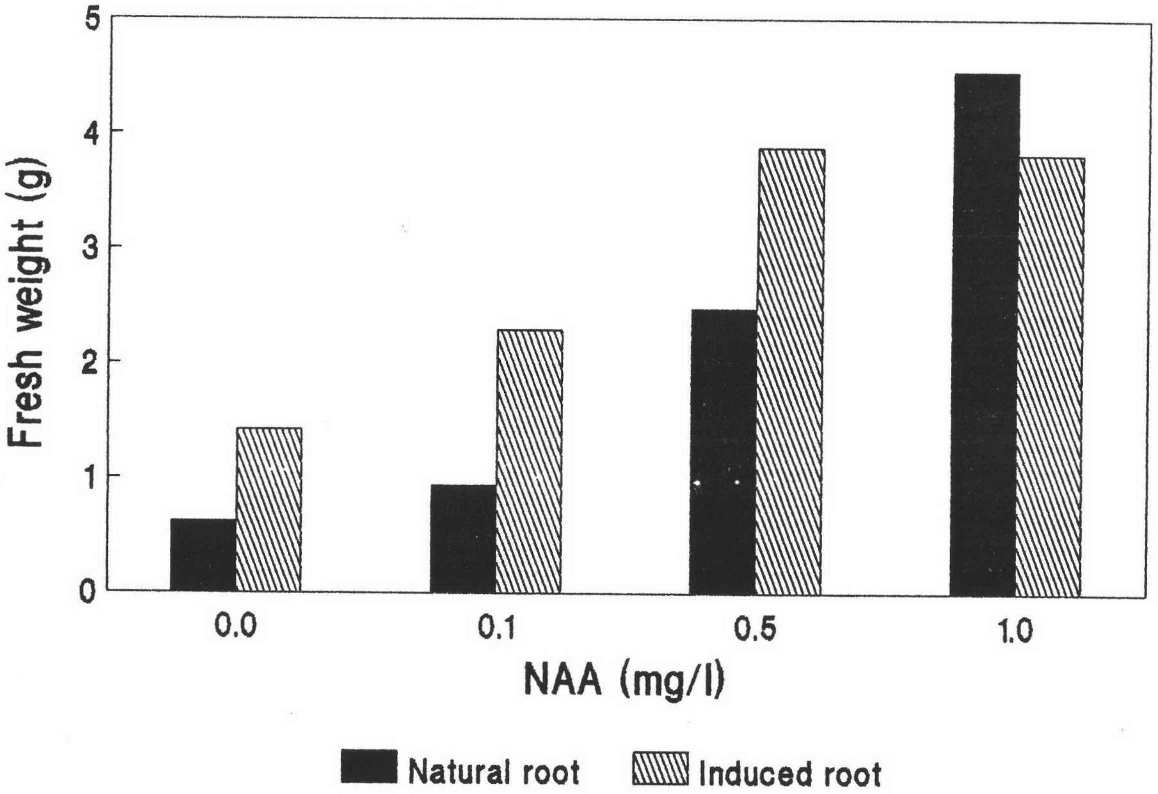
ต้นกวาวเครือขาวที่ได้จากอาหารสูตร WPM จะมีลักษณะต้นปกติกว่าต้นที่ได้จากอาหารสูตร MS แต่ยังมีลักษณะใบจุดบริเวณใบใหม่อยู่บ้าง ส่วนอาหารสูตร MS ได้ต้นลักษณะฉ่ำน้ำ เปราะและหักง่าย แสดงอาการใบจุดกระจายทั่วไป บางต้นมีการแตกกิ่งแขนงมาก ระบบรากในอาหารสูตร MS จะเจริญได้ค่อนข้างดีกว่าในสูตร WPM



รูปที่ 3.42 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักสดรากธรรมชาติ (—+—) และรากจากการชักนำ ด้วย NAA (—·—) ในอาหารสูตร MS (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.43 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักสดของรากชักนา ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 4 และ 5 (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)



รูปที่ 3.44 กราฟแสดงการเพิ่มน้ำหนักสดของรากธรรมชาติ (Natural root) และรากชักนำ (Induced root) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร (ในระยะเวลา 4 สัปดาห์)

2. <u>สารอาหารเพิ่มเติม</u>

ต้นกวาวเครือขาวที่ได้จากอาหารสูตร MS และ WPM ที่มีการเพิ่มธาตุเหล็ก 0.5 เท่า แสดงอาการใบจุดน้อยกว่าการทดลองที่ไม่มีการเพิ่มธาตุเหล็ก

การปลูกและขยายพันธุ์กวาวในสภาพแวดล้อมภายนอก

1. <u>การขยายพันธุ์โดยวิธีปักชำกิ่งในสภาพแวดล้อมภายนอก</u>

ในสัปดาห์แรกพบว่า ตาบริเวณข้อยืดตัวเล็กน้อยในกิ่งปักชำของทุกวิธีการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 2 กิ่งปักชำเริ่มแสดงอาการเน่า ในสัปดาห์ที่ 4 กิ่งปักชำตายเกือบทั้งหมด ในวิธีการที่แช่ในสารเร่งราก เหลือกิ่งรอดตายร้อยละ 5 ในระยะเวลา 2 เดือน

2. <u>ต้นกวาวที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองสู่สภาพแวดล้อมภายนอก ในสัปดาห์แรก</u>

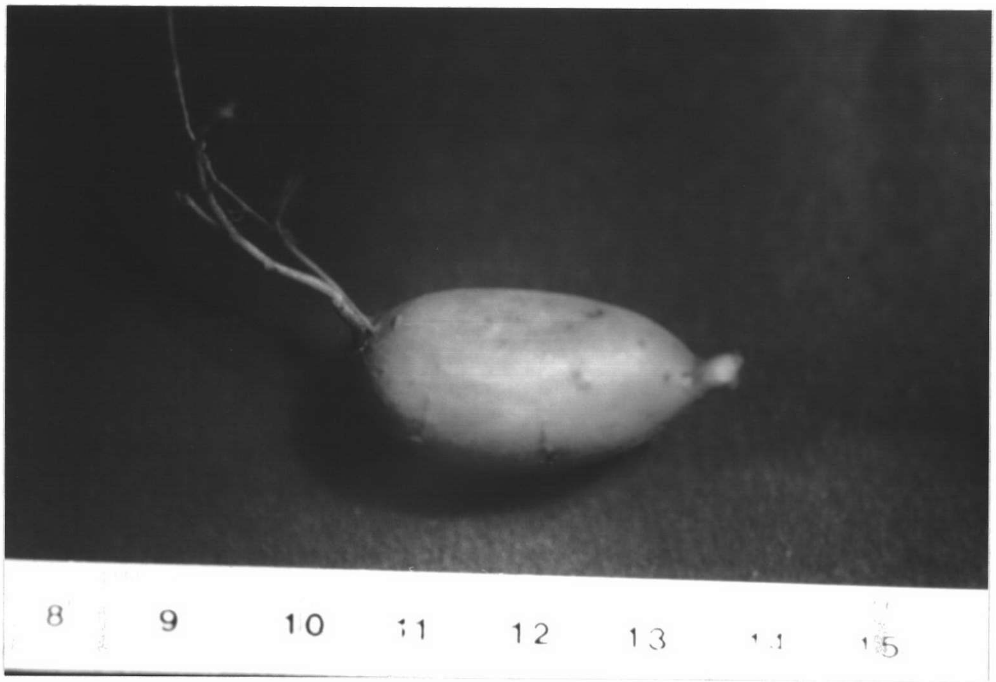
เมื่อนำกวาวเครือขาวที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อไปปลูกในเรือนเพาะชำ พบว่า หลัง 2 เดือน มีอัตราการรอดร้อยละ 60 และรากจากต้นชักนำสามารถเกิดหัวได้ตามปกติ (รูปที่ 3.45)

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากกวาวเครือขาว ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

หลังติดตามการแยกสารสกัดด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่า สารละลายสกัดจากหัวกวาวจากเรือนเพาะชำทั้งหัวที่เกิดจากรากธรรมชาติและรากชักนำให้ผลการแยกสารแนวเดียวกัน คือ สามารถแยกสารได้ 8 กลุ่มซึ่งให้ค่า R_f เท่ากับ 0.20 0.29 0.35 0.41 0.45 0.52 0.64 และ 0.72 ตามลำดับ (จากล่างขึ้นบน) ส่วนสารละลายที่สกัดจากพืชธรรมชาติและรากชักนำที่เลี้ยงในอาหารเหลว รวมทั้งแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนยอด, ข้อ, ใบและราก ในอาหารสูตรต่าง ๆ ให้ผลการแยกสารในแนวเดียวกัน คือสามารถแยกสารได้ประมาณ 7 กลุ่ม ซึ่งให้ค่า R_f

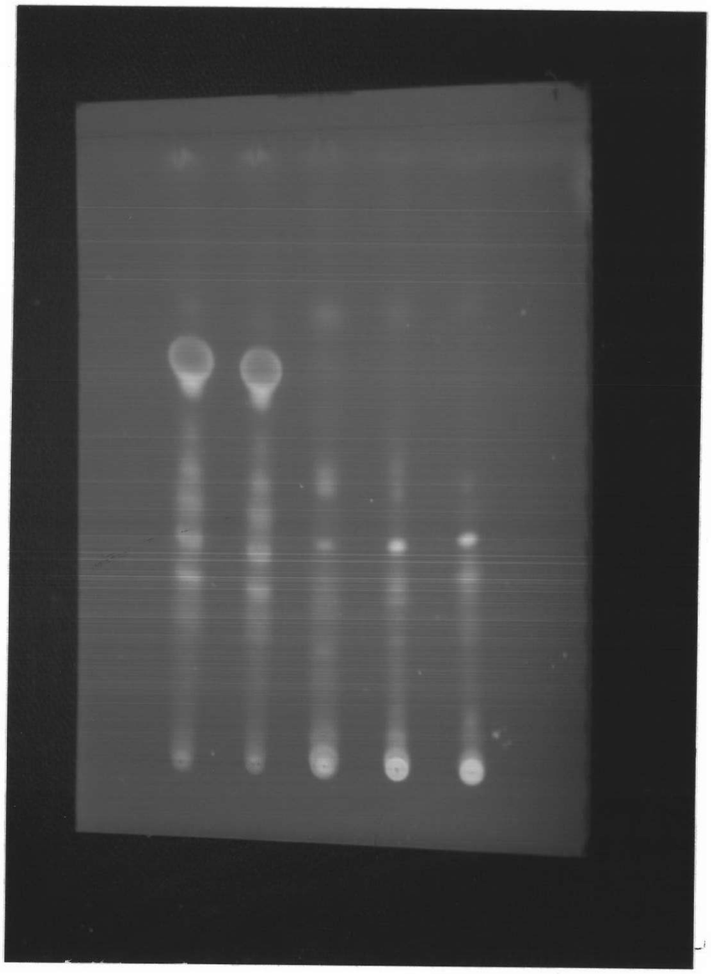
A

B



รูปที่ 3.45 ภาพแสดงต้นกวาวเครือขาว ที่ได้จากการขยายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ ในระยะเวลา 2 เดือน (A) และหัวกวาว ในระยะเวลา 6 เดือน (B) จากการปลูกในเรือนเพาะชำ

เท่ากับ 0.20 0.285 0.29 0.35 0.41 0.42 และ 0.72 ตามลำดับ (จากล่างขึ้นบน) จากภาพที่ 3.46 จะสังเกตเห็นว่า สารสกัดจากพืชในสภาพธรรมชาติและสภาพปลอดเชื้อ ให้สารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน ประมาณ 5 กลุ่ม ซึ่งคาดว่าอาจเป็นสารกลุ่มเดียวกัน โดยพืชในสภาพธรรมชาติ ให้สารหลายชนิดกว่าในสภาพแวดล้อมและให้ปริมาณสารมากกว่า (เปรียบเทียบโดยประมาณจากลักษณะกลุ่มสารที่ได้จากน้ำหนักสารเริ่มต้นที่เท่ากัน)



A B C D E

รูปที่ 3.46 ภาพแสดงการแยกสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวในเรือนเพาะชำ รากและแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อด้วยเอธานอลบนแผ่นซิลิกาเจล ที่มี คลอโรฟอร์ม : เมธานอล เป็นตัวชะ

1. สารสกัดจากหัวกวาวจากรากธรรมชาติ ในเรือนเพาะชำ
2. สารสกัดจากหัวกวาวจากรากชักนำ ในเรือนเพาะชำ
3. สารสกัดจากรากธรรมชาติ ในภาวะปลอดเชื้อ
4. สารสกัดจากรากชักนำ ในภาวะปลอดเชื้อ
5. สารสกัดจากแคลลัสจากราก ในอาหารสูตร MS ในภาวะปลอดเชื้อ