บทที่ 3

ผลการทดลอง

การพัฒนาเทคนิคเพื่อผลิตเมล็ดพืชเทียมของแครอทโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แบ่งการรายงานผลการศึกษาเป็น 8 ขั้นตอนดังนี้

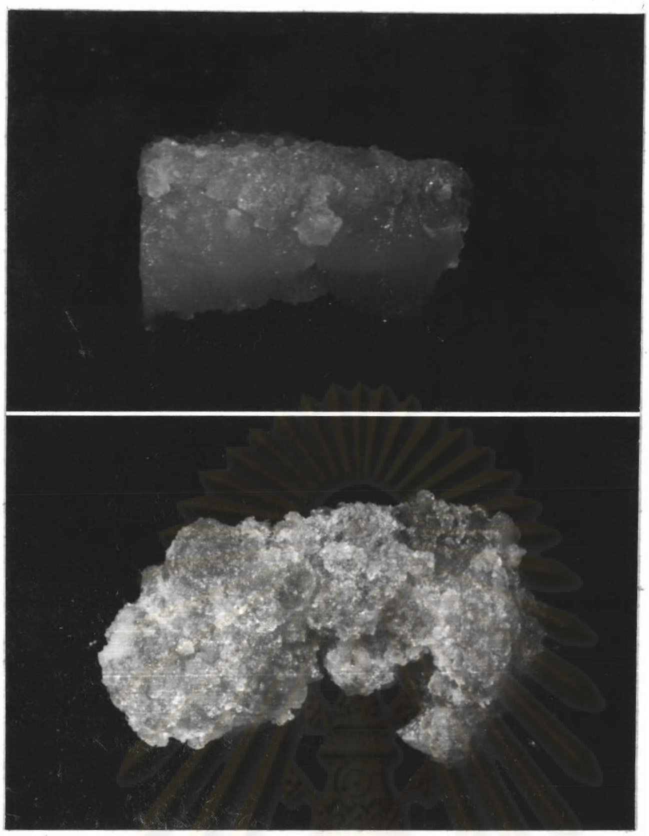
1. ผลการชักนำให้เกิด somatic embryo
2. ผลการผลิตเมล็ดพืชเทียม
3. ผลของอุณหภูมิและแสงที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม
4. ผลของวิธีการทำแห้ง และเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่มีต่อการงอกหลังการrehydrate ของเมล็ดพืชเทียม
5. ผลของการทำแห้งที่มีต่อการเก็บรักษาและการงอกของเมล็ดพืชเทียม
6. ผลการศึกษาระยะที่เหมาะสมของ somatic embryo ในการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดยใช้ ABA (abscisic acid)
7. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ ABA ที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้ง
8. ผลของเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้งซึ่งผ่านการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดย ABA

1. ผลการชักนำให้เกิด somatic embryo

เมื่อชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนแคมเบียม(cambium) ของหัวแครอทในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige และ Skoog (1962) โดย Halperin และ Wetherell (1964) ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าประมาณ 1-2 สัปดาห์ จะเริ่มเกิดแคลลัสจากบริเวณรอยตัด และแคมเบียม โดยแคลลัสที่ได้มีเนื้อแน่นสีเขียว ประกอบด้วยเซลล์ที่จับกันแน่นและจะเพิ่มมากขึ้นโดยรอบทุกส่วนของพืชเมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก.

ข.

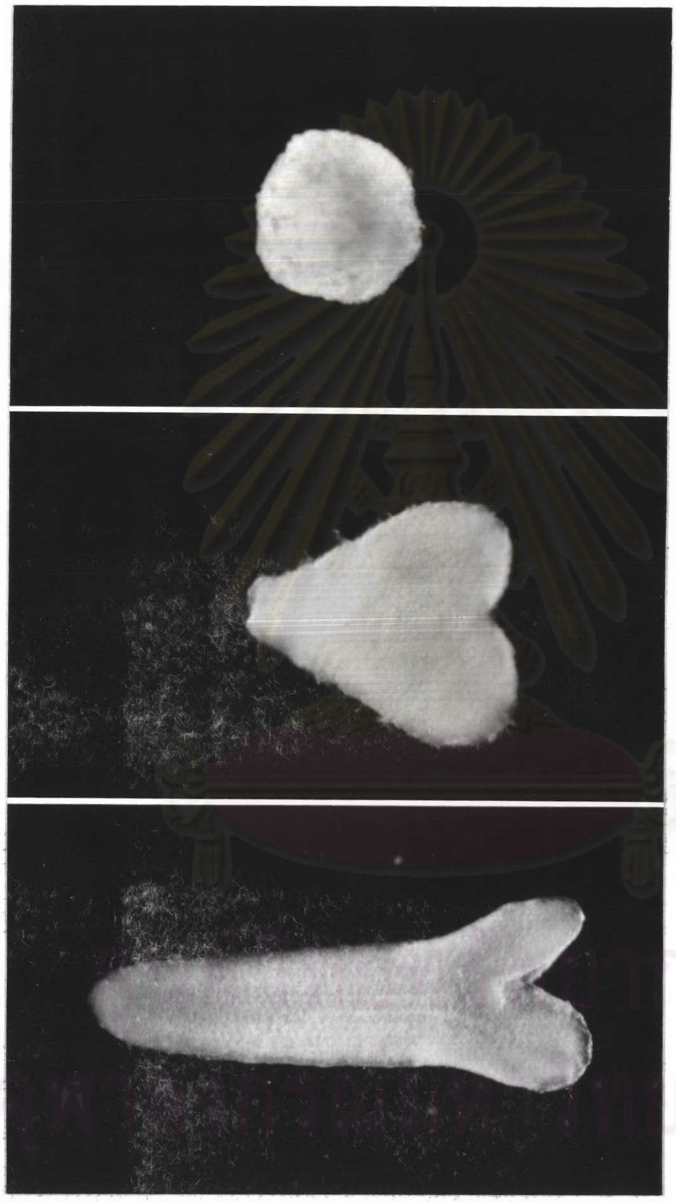
ภาพที่ 1 แคลลัสที่ชักนำจากส่วนแคมเบียมของหัวแครอท

ก. แคลลัส อายุ 2 สัปดาห์

ข. แคลลัส อายุ 4 สัปดาห์

เมื่อย้ายแคลลัสที่ถูกแยกให้เป็นชิ้นเล็กๆ ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมบนเครื่องเขย่า เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสจะแยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ นอกจากนี้พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นด้วย นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มากรองและนำเซลล์ที่มีขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร มาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ในวันที่ 4 หลังจากย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo เริ่มพบ somatic embryo ในระยะ globular shape มีรูปร่างค่อนข้างกลม และพบเป็นจำนวนมากในวันที่ 6 ต่อมาในวันที่ 8 เริ่มพบ somatic embryo ระยะ heart shape มีรูปร่างคล้ายรูปหัวใจ ซึ่งหลังจากนั้นพบว่าจำนวน somatic embryo ในระยะ globular shape ลดน้อยลง เนื่องจาก globular shape ได้พัฒนาไปเป็น somatic embryo ระยะ heart shape ซึ่งต่อมามีการพัฒนาไปเป็น somatic embryo ระยะ torpedo shape ซึ่งมีรูปร่างคล้ายตอร์ปิโด ในวันที่ 10 และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่12 ถึง 14 หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo บนเครื่องเขย่า (ภาพที่ 2)



ก.

ข.

ค.

<u>ภาพที่ 2</u> การเกิด somatic embryogenesis ระยะต่างๆในแครอท

ก. เอมบริโอระยะ globular shape

ข. เอมบริโอระยะ heart shape

ค. เอมบริโอระยะ torpedo shape

2. ผลการผลิตเมล็ดพืชเทียม

เมื่อกลุ่มเซลล์พัฒนาไปเป็น somatic embryo ระยะ torpedo shape แล้วนำมากรองเพื่อแยก somatic embryo ขนาด 4 มิลลิเมตร เพื่อนำมาผลิตเมล็ดพืชเทียม (ภาพที่ 3) เมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้มีลักษณะกลม ใส คล้ายเมล็ดสาคู มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7-8 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) มีอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ทำหน้าที่เป็นเอนโดสเปอร์มเทียม ซึ่งเป็นแหล่งอาหารเลี้ยง somatic embryo และมี calcium alginate ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง sodium alginate กับ calcium nitrate ทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ดพืชเทียม ซึ่งมีลักษณะอ่อนนุ่มเป็นเจลค่อนข้างแข็ง สามารถรักษาสภาพการคงตัวได้ดี เลือกเมล็ดพืชเทียมที่มีเพียง 1 somatic embryo ใช้ในการทดลองต่อไป

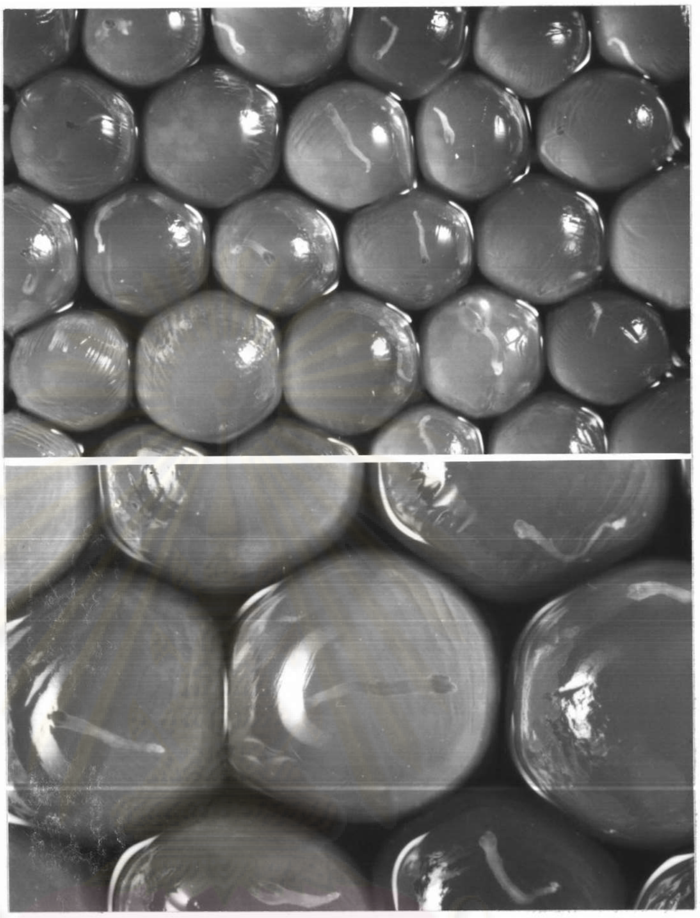
ก. ข. ค.

ภาพที่ 3 วิธีการผลิตเมล็ดพืชเทียม

ก. somatic embryo ระยะ torpedo ขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร

ข. torpedo-shaped embryo ใน sodium alginate

ค. การหยดลงใน calcium nitrate



<u>ภาพที่ 4</u> เมล็ดพืชเทียมแครอท

3. ผลของอุณหภูมิและแสงที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม

ปัจจัยทางกายภาพที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมแครอท ได้แก่ อุณหภูมิ และสภาพของแสงโดยเก็บเมล็ดพืชเทียมแครอทที่ผลิตได้ใน flask ขนาด 200 มิลลิลิตร โดยบรรจุ flask ละ 15 เมล็ด ปิดปากขวดด้วยแผ่นอลูมิเนียมเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ และที่มืด ศึกษาการงอกและการตายในระหว่างเก็บรักษา หลังจากนั้นนำเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ และสภาพของแสงต่างๆกัน มาเพาะทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) ของเมล็ดพืชเทียมแครอทหลังการเก็บในสภาวะต่างๆกันเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าเมื่อเก็บเมล็ดพืชเทียมแครอทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีการงอกและการตายในระหว่างการเก็บรักษาตลอด 3 สัปดาห์ทั้งในที่มีแสงและที่มืด ในขณะที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เมล็ดพืชเทียมมีการงอกในระหว่างการเก็บรักษาตั้งแต่สัปดาห์แรก จนในสัปดาห์ที่ 3 มีการงอกถึง 57.3 เปอร์เซนต์ในที่มีแสง และ 53.3 เปอร์เซนต์ในที่มืด เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับเมล็ดพืชเทียมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มีแสงและที่มืดพบว่าในระหว่างเก็บรักษา เมล็ดพืชเทียมเกือบทุกเมล็ดมีการงอกเกิดขึ้นตามปกติ แต่ในระหว่างการเก็บรักษาในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 พบว่าเมล็ดพืชเทียมที่เก็บในที่มีแสงมีเปอร์เซนต์การงอกมากกว่าเมล็ดพืชเทียมที่เก็บในที่มืด และเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำเมล็ดพืชเทียมที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส มาทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปอร์เซนต์การงอกรวมลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานขึ้น แต่ไม่พบว่าในช่วง 3 สัปดาห์ที่เก็บรักษามีการตายของ somatic embryo เกิดขึ้น ซึ่งเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการเก็บเป็นเวลา 3 สัปดาห์ในที่มีแสงมีเปอร์เซนต์การงอกรวม 60.0 เปอร์เซนต์ และ 57.3 เปอร์เซนต์เมื่อผ่านการเก็บในที่มืด ส่วนเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาทดสอบการงอกพบว่าเปอร์เซนต์การงอกรวมลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานขึ้นเช่นกัน โดยเมื่อผ่านการเก็บเป็นเวลา 3 สัปดาห์ในที่มีแสงมีเปอร์เซนต์การงอกรวม 65.3 เปอร์เซนต์ และ 60.0 เปอร์เซนต์ในที่มืด เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าการเก็บในที่มีแสงและที่มืดให้เปอร์เซนต์การงอกรวมไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิ 4 หรือ 15 องศาเซลเซียสก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกรวมหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์พบว่าให้อัตราการงอกรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4, แผนภาพที่ 1 และ 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลของอุณหภูมิและแสงที่มีต่อการงอก และการตายของเมล็ดพืชเทียมในระหว่างการเก็บรักษา และการงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) ของเมล็ดพืชเทียมหลังการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเก็บ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ (แต่ละการทดลองใช้ 15 เมล็ด 5 ซ้ำ)

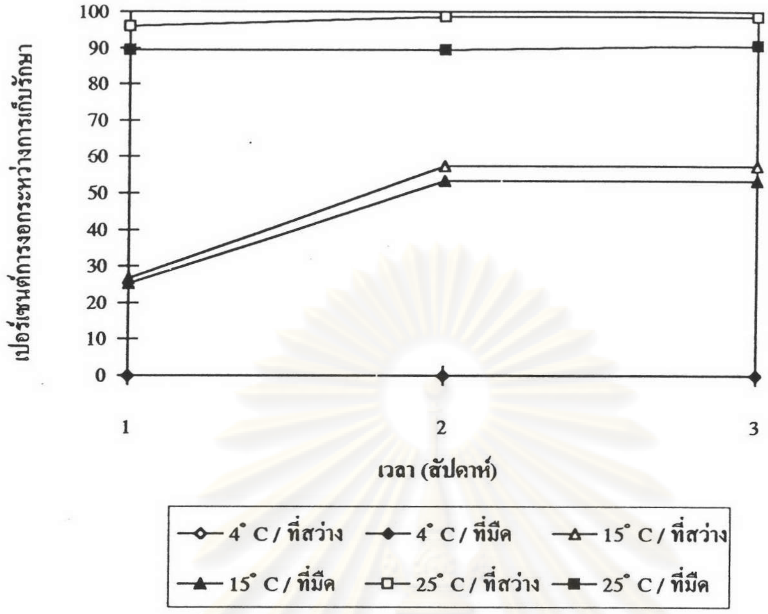
อุณหภูมิ (^{0}C)	เปอร์เซนต์การงอก ระหว่างการเก็บรักษา			เปอร์เซนต์การตาย ระหว่างการเก็บรักษา			เปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 ^{0}C ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน		
	เวลา (สัปดาห์)			เวลา (สัปดาห์)			เวลา (สัปดาห์)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
4L	0.0^{e}	0.0^{e}	0.0^{e}	0.0^{b}	0.0^{b}	0.0^{b}	86.7^{b}	70.7^{c}	60.0^{de}
4D	0.0^{e}	0.0^{e}	0.0^{e}	0.0^{b}	0.0^{b}	0.0^{b}	85.3^{b}	68.0^{cd}	57.3^{e}
15L	26.7^{d}	57.3^{c}	57.3^{c}	0.0^{b}	0.0^{b}	0.0^{b}	89.3^{b}	72.0^{c}	65.3^{cde}
15D	25.3^{d}	53.3^{c}	53.3^{c}	0.0^{b}	0.0^{b}	0.0^{b}	86.7^{b}	68.0^{cd}	60.0^{de}
25L	96.0^{ab}	98.7^{a}	98.7^{a}	0.0^{b}	0.0^{b}	1.3^{b}	98.7^{a}	98.7^{a}	98.7^{a}
25D	89.3^{b}	89.3^{b}	90.7^{b}	0.0^{b}	0.0^{b}	8.0^{a}	96.0^{ab}	96.0^{ab}	92.0^{ab}

- ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

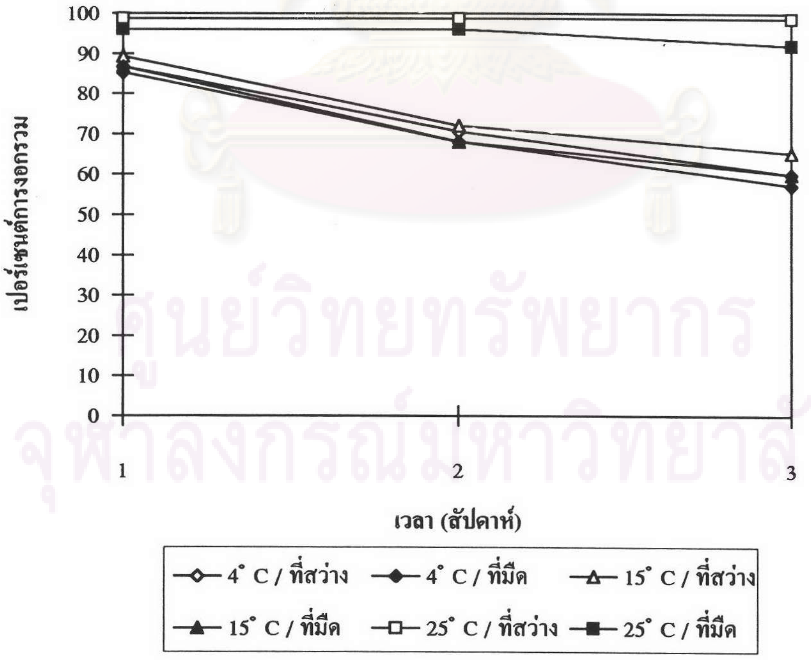
L = เก็บในที่มีแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

D = เก็บในที่มืด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>แผนภาพที่ 1</u> เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มีแสงและที่มืด ระยะเวลาในการเก็บ 1, 2 และ 3 สัปดาห์



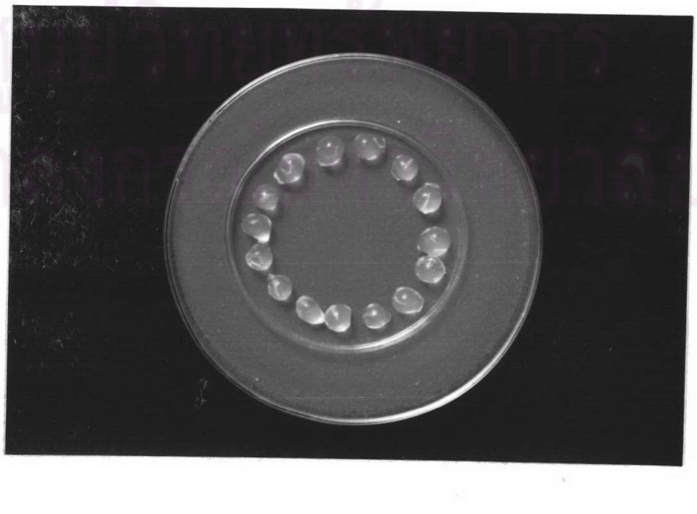
<u>แผนภาพที่ 2</u> เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) ของเมล็ดพืชเทียม หลังการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในที่มีแสงและที่มืด ระยะเวลาในการเก็บ 1, 2 และ 3 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลของวิธีการทำแห้ง และเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียม

การศึกษาผลของวิธีการทำแห้งของเมล็ดพืชเทียมโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดความชื้น (ภาพที่ 5)เปรียบเทียบกับการใช้ลมเป่าใน laminar flow โดยกำหนดให้เมล็ดพืชเทียมมีการสูญเสียน้ำ 0, 20, 40, 60, 70 และ 80 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ภาพที่ 6) พบว่าการใช้ silica gel สามารถทำให้เมล็ดพืชเทียมแครอทขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร เสียน้ำไป 10 เปอร์เซนต์ต้องใช้เวลา 4.5 ชั่วโมง ขณะที่การใช้ลมเป่าใน laminar flow ใช้เวลาเพียง 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดมาทำการ rehydrate ทันที และศึกษาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำระดับต่างๆ พบว่า เมื่อเมล็ดพืชเทียมมีการสูญเสียน้ำ 20 และ 40 เปอร์เซนต์จะให้เปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ไม่แตกต่างกันทางสถิติจากเมล็ดพืชเทียมที่ไม่ได้ผ่านการทำแห้ง (ตารางที่ 5) แต่เมื่อทำให้เมล็ดสูญเสียน้ำมากขึ้น คือ 60, 70 และ 80 เปอร์เซนต์ มีผลทำให้การงอกลดลงตามลำดับ โดยที่เมื่อเมล็ดเสียน้ำไปถึง 60 เปอร์เซนต์ ด้วยวิธีการใช้ silica gel หรือใช้ลมเป่าใน laminar flow เปอร์เซนต์การงอกยังสูงอยู่มาก คือ 88.0 และ 82.7 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่ก็ยังงอกน้อยกว่าเมื่อเมล็ดเสียน้ำไปเพียง 40 เปอร์เซนต์ ซึ่งเมื่อทดสอบค่าทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดพืชเทียมที่ไม่ได้ผ่านการทำแห้ง (ตารางที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำให้แห้งด้วย silica gel และลมเป่าใน laminar flow พบว่าที่ระดับการเสียน้ำ 20, 40 และ 60 เปอร์เซนต์ให้ผลเหมือนกัน แต่ถ้าให้มีการสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 70 และ 80 เปอร์เซนต์ พบว่าวิธีทั้งสองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมล็ดพืชเทียมที่ทำให้แห้งด้วย silica gel มีเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate สูงกว่าวิธีทำแห้งโดยใช้ลมเป่า



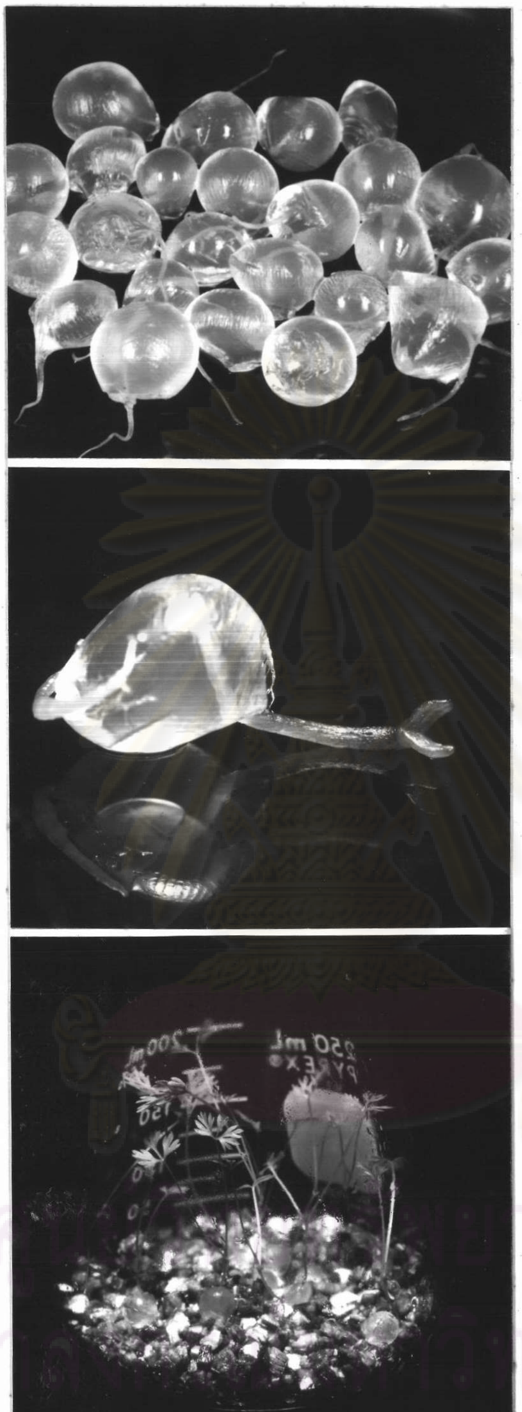
ภาพที่ 5 การทำเมล็ดพืชเทียมให้แห้งโดยใช้ silica gel

<u>ตารางที่ 5</u> ผลของวิธีการทำแห้งและเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำระดับต่างๆที่มีต่อเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียม (แต่ละการทดลองใช้ 15 เมล็ด 5 ซ้ำ)

การสูญเสียน้ำ (เปอร์เซนต์)	เปอร์เซนต์การงอก	
	silica gel	laminar flow
0	98.8[a]	98.8[a]
20	97.3[a]	97.3[a]
40	94.7[ab]	92.0[ab]
60	88.0[bc]	82.7[c]
70	74.7[d]	66.7[e]
80	53.3[f]	42.7[g]

- ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

<u>ภาพที่ 6</u> ลักษณะของเมล็ดพืชเทียมที่มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำระดับต่างๆ



ก.

ข.

ค.

<u>ภาพที่ 7</u> ลักษณะการงอก และการเจริญตามลำดับของเมล็ดพืชเทียมหลังการ rehydrate

ก. การงอกรากของเมล็ดพืชเทียม

ข. การเกิดยอดของเมล็ดพืชเทียม

ค. การเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

5. ผลของการทำแห้งที่มีต่อการเก็บรักษา และการงอกของเมล็ดพืชเทียม

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้ทำให้แห้งโดยใช้ silica gel ให้มีอัตราการสูญเสียน้ำ 0, 20, 40, 60, 70 และ 80 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แล้วนำมาเก็บในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 200 มิลลิลิตรขวดละ 15 เมล็ดปิดฝาขวดด้วยแผ่นอลูมิเนียม โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ

ได้ผลตามตารางที่ 6 ซึ่งอธิบายได้ว่าเมล็ดพืชเทียมเมื่อทำให้แห้งโดยมีการสูญเสียน้ำเพียง 20 เปอร์เซนต์ พบว่าเอมบริโอเริ่มงอกตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ซึ่งสูงถึง 77.3 เปอร์เซนต์ และเมื่อเก็บไว้ถึงสัปดาห์ที่ 3 เปอร์เซนต์การงอกเพิ่มขึ้นเป็น 90.7 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการสูญเสียน้ำงอกได้ถึง 98.7 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำให้มีการสูญเสียน้ำมากขึ้นถึง 40 เปอร์เซนต์ พบว่าในระหว่างการเก็บรักษายังมีเมล็ดงอกบ้างโดยที่สัปดาห์แรกงอกเพียง 26.7 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเก็บเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ปรากฏว่าเปอร์เซนต์การงอกยังสูงอยู่คือ 60.0 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเมล็ดทำให้แห้งมากขึ้นโดยมีการสูญเสียน้ำสูงถึง 60 เปอร์เซนต์ การงอกในระหว่างการเก็บรักษาจะลดลงอย่างมากแต่ก็นับว่ายังสูงอยู่ (30.7 เปอร์เซนต์) และถ้าให้สูญเสียน้ำมากกว่านี้คือ 70 และ 80 เปอร์เซนต์ พบว่าการงอกในระหว่างเก็บรักษา 3 สัปดาห์นั้นลดลงไปมากเหลือเพียง 6.7 และ 0 เปอร์เซนต์ตามลำดับในสัปดาห์ที่ 3

เมื่อพิจารณาการตายในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าถ้าเมล็ดพืชเทียมมีการสูญเสียน้ำมากขึ้นจะมีการตายสูงขึ้นตามลำดับ โดยเมื่อเก็บเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีการตายระหว่างการเก็บสูงถึง 37.3 เปอร์เซนต์

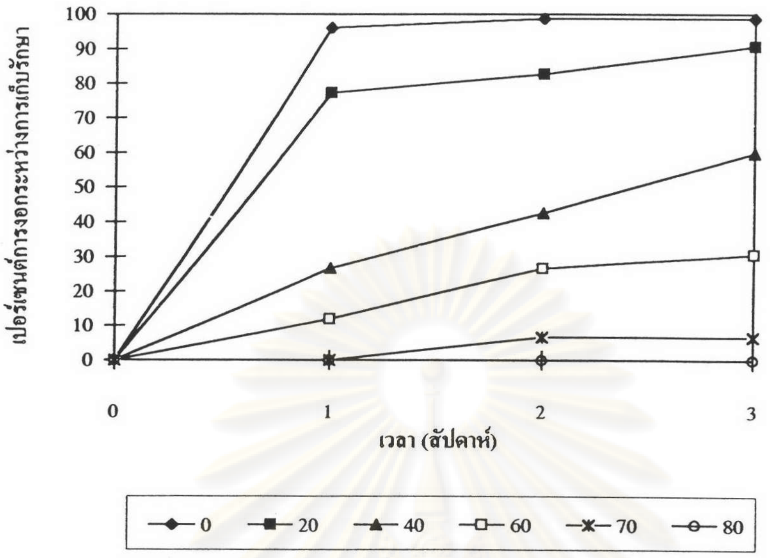
และเมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) ของเมล็ดพืชเทียมหลังเก็บรักษาไว้ระยะหนึ่งคือ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ แล้วนำมา rehydrate และนำไปทดสอบการงอก พบว่าแม้ว่าในระหว่างเก็บรักษาโดยทำให้เมล็ดแห้งลงไปถึง 80 เปอร์เซนต์ และเก็บไว้นานถึง 3 สัปดาห์ ยังมีเปอร์เซนต์การงอกรวมถึง 40 เปอร์เซนต์ และอัตราการงอกรวมสูงขึ้นอีกเมื่อเมล็ดสูญเสียน้ำน้อยลง โดยที่ถ้าสูญเสียน้ำถึง 70 เปอร์เซนต์ แต่เก็บไว้เพียงสัปดาห์เดียวแล้วจึง rehydrate เปอร์เซนต์การงอกรวมยังสูงอยู่คืองอกได้ถึง 73.3 เปอร์เซนต์ และถ้าเก็บนานขึ้นเป็น 2 และ 3 สัปดาห์ เปอร์เซนต์การงอกรวมจะลดลงเหลือเพียงถึง 66.7 และ 60.0 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่ถ้าทำให้สูญเสียน้ำน้อยกว่านี้คือเพียง 60 เปอร์เซนต์ การงอกรวมหลังการ rehydrate ยังสูงอยู่ โดยที่เมื่อเก็บไว้นานถึง 3 สัปดาห์ เปอร์เซนต์การงอกรวมหลังการ rehydrate ยังสูงถึง 76.0 เปอร์เซนต์ ซึ่งใกล้เคียงกับการทำให้แห้ง 40 เปอร์เซนต์ ซึ่งพบว่าเมื่อเก็บนาน 3 สัปดาห์ เมล็ดพืชเทียมมีเปอร์เซนต์การงอกรวมถึง 80 เปอร์เซนต์ซึ่งนับว่าสูงมาก (ตารางที่ 6 แผนภาพที่ 3, 4 และ 5)

<u>ตารางที่ 6</u> ผลของการทำให้เมล็ดพืชเทียมมีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่ระดับต่างๆต่อการงอก และการตายในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ และการงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) หลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียม (แต่ละการทดลองใช้ 15 เมล็ด 5 ซ้ำ)

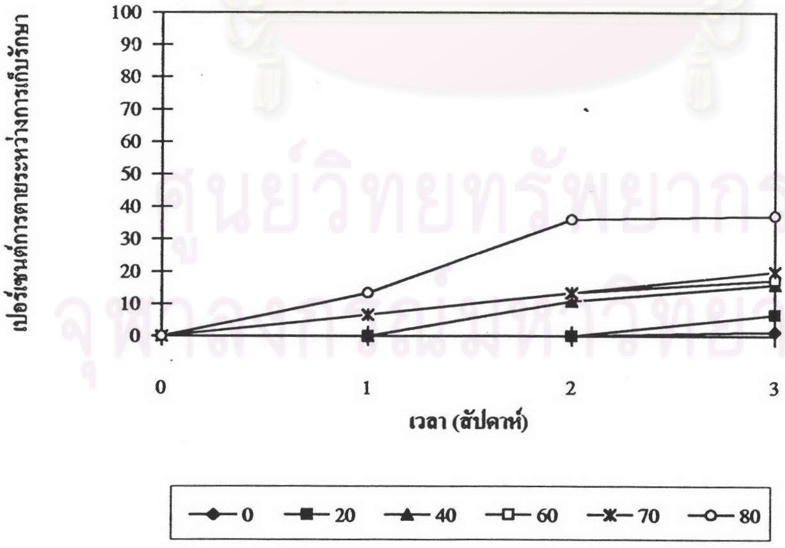
การสูญเสียน้ำ (%)	เปอร์เซนต์การงอกระหว่างการเก็บรักษา			เปอร์เซนต์การตายระหว่างการเก็บรักษา			เปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) หลังการ rehydrate ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน			
	เวลา (สัปดาห์)			เวลา (สัปดาห์)			เวลา (สัปดาห์)			
	1	2	3	1	2	3	0	1	2	3
0	96.0^{ab}	98.7^{a}	98.7^{a}	0.0^{b}	0.0^{b}	1.3^{b}	98.7^{a}	98.7^{a}	98.7^{a}	98.7^{a}
20	77.3^{c}	82.7^{c}	90.7^{b}	0.0^{b}	0.0^{b}	6.7^{bd}	97.3^{ab}	97.3^{ab}	94.7^{abc}	90.7^{bcd}
40	26.7^{f}	42.7^{b}	60.0^{d}	0.0^{b}	10.7^{cd}	16.0^{bc}	96.0^{abc}	90.7^{bcd}	80.0^{ef}	80.0^{bf}
60	12.0^{g}	26.7^{f}	30.7^{f}	6.7^{bd}	13.3^{bcd}	17.3^{bc}	89.3^{cd}	86.7^{de}	80.0^{ef}	76.0^{f}
70	0.0^{h}	6.7^{gh}	6.7^{gh}	6.7^{bd}	13.3^{bcd}	20.0^{b}	76.0^{f}	73.3^{f}	66.7^{g}	60.0^{h}
80	0.0^{h}	0.0^{h}	0.0^{h}	13.3^{ecd}	36.0^{a}	37.3^{a}	53.3^{i}	52.0^{i}	42.7^{i}	40.0^{j}

- ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

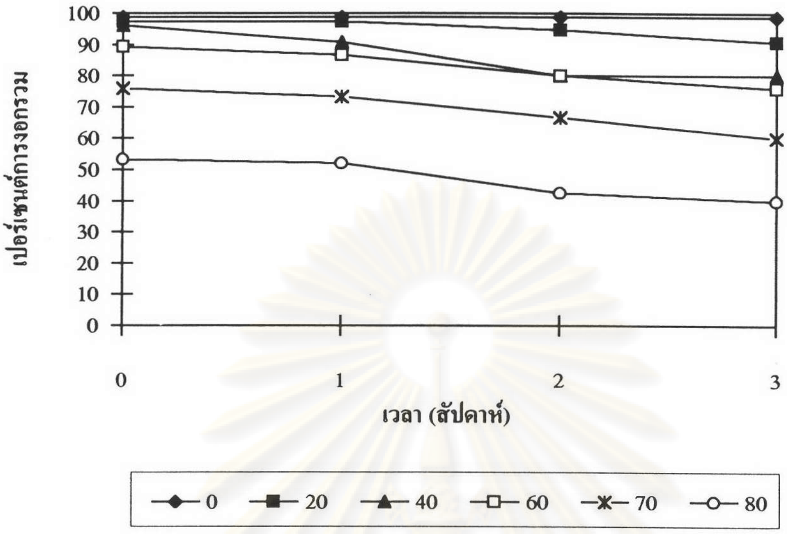
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>แผนภาพที่ 3</u> เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมที่มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำระดับต่างๆ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์



<u>แผนภาพที่ 4</u> เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การตายในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมที่มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำระดับต่างๆ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์



แผนภาพที่ 5 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) หลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมที่มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำระดับต่างๆ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์

6 ผลการศึกษาระยะที่เหมาะสมของ somatic embryo ในการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดยใช้ ABA (abscisic acid)

ในการศึกษาหาระยะการเจริญที่เหมาะสมของ somatic embryo เพื่อชักนำให้เกิด desiccation tolerance ด้วย ABA ในเมล็ดพืชเทียมแห้ง พบว่าเมื่อนำ somatic embryo ที่มีอายุการเจริญต่างๆกัน มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่า somatic embryo ระยะ globular shape และ heart shape มีการเจริญไปเป็น somatic embryo ระยะ torpedo shape ในระหว่างเลี้ยงในอาหารที่เติม ABA (ตารางที่ 7) โดย somatic embryo มีสีเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีค่อนข้างเหลือง เมื่อเทียบกับ somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งไม่เติม ABA นอกจากนี้พบว่าเปอร์เซนต์การงอกยังขึ้นอยู่กับอายุของsomatic embryoโดย somatic embryo ที่มีอายุต่ำกว่า 10 วัน เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม ABA ไม่สามารถงอกได้หลังจากการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการทำแห้ง 80 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ somatic embryo ที่มีอายุ 10 วันขึ้นไปสามารถงอกและเจริญเป็นต้นได้หลังการ rehydrate ของ

เมล็ดพืชเทียมแห้ง โดย somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo เป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม ABA ให้เปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้งสูงสุด คือ 76.0 เปอร์เซนต์ ส่วน somatic embryo ที่มีอายุ 16 วัน ให้เปอร์เซนต์การงอกสูงรองลงมา คือ 69.3 เปอร์เซนต์ เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple range test พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 7 และแผนภาพที่ 6)

ตารางที่ 7 ขนาดและระยะการเจริญของ somatic embryo ในระหว่างการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน และผลของอายุ somatic embryo ต่อเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ (แต่ละการทดลองใช้ 15 somatic embryo 5 ซ้ำ)

อายุเอมบริโอ (วัน)	ก่อน ABA treatment		หลัง ABA treatment		เปอร์เซ็นต์การงอก
	ความยาว	ระยะการเจริญ	ความยาว	ระยะการเจริญ	
4	0.5	G	1.5	T	0.0^{d}
6	0.7	G	1.6	T	0.0^{d}
8	1.0	G+H	1.8	T	0.0^{d}
10	1.4	T	1.9	T	10.7^{c}
12	1.9	T	2.4	T	50.7^{b}
14	2.6	T	3.0	T	76.0^{a}
16	2.9	T	3.3	T	69.3^{a}
18	3.4	T	3.8	T	52.0^{b}
20	4.0	T	4.3	T	52.0^{b}

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

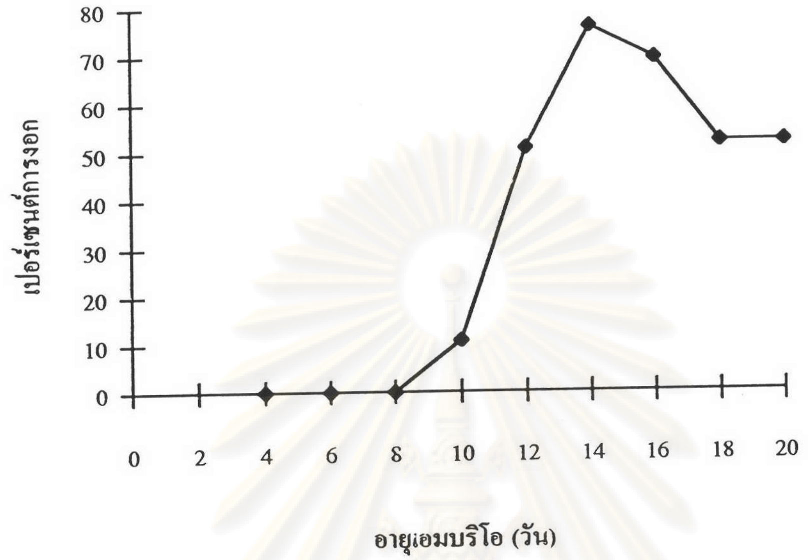
G = เอมบริโอระยะ globular shape

H = เอมบริโอระยะ heart shape

T = เอมบริโอระยะ torpedo shape

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18760440



แผนภาพที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ ซึ่งเมล็ดพืชเทียมได้จาก somatic embryo ที่มีอายุต่างๆกัน เลี้ยงในอาหารที่เติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน

7. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ ABA ที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้ง

นำ somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo เป็นเวลา 14 วัน ย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มีความเข้มข้นของ ABA 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาผลิตเมล็ดพืชเทียม และทำเมล็ดพืชเทียมแห้งโดยใช้ silica gel ให้มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ แล้วนำมา rehydrate และทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อพบว่า เปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมจะสูงสุดเมื่อ somatic embryo เลี้ยงในอาหารที่เติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรก่อนผลิตเมล็ดพืชเทียมแห้ง โดยมีอัตราการงอกหลังการ rehydrate ถึง 77.3 เปอร์เซนต์ ส่วนความเข้มข้นของ ABA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมหลังการrehydrate รองลงมาคือ 72.0 เปอร์เซนต์ เมื่อทดสอบค่าทางสถิติด้วย Duncan's multiple range test พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อใช้ ABA ความ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

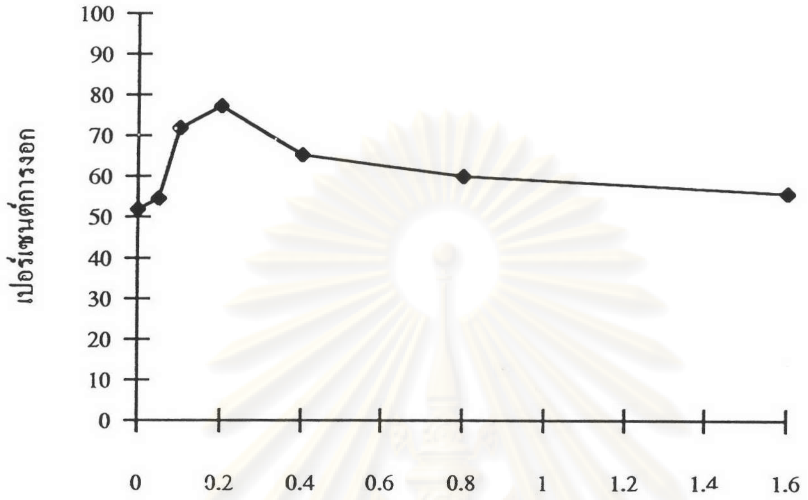
เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดพืชเทียมเหล่านี้สามารถเจริญเป็นต้นได้ตามปกติ ส่วนเมล็ดพืชเทียมที่ได้จาก somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม ABA มีเปอร์เซนต์การงอกเพียง 52.0 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเมล็ดพืชเทียมที่ได้จาก somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติม ABA ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถงอกได้หลังการ rehydrate แต่ต้นที่ได้จะไม่แข็งแรงเท่ากับใช้ความเข้มข้นของ ABA ในระดับต่ำๆ (ตารางที่ 8 และแผนภาพที่ 7)

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้น ABA ระดับต่างๆ ในอาหารเลี้ยง somatic embryo เป็นเวลา 7 วัน ก่อนการผลิตเมล็ดพืชเทียม ต่อเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ (แต่ละการทดลองใช้ 15 เมล็ด 5 ซ้ำ)

ความเข้มข้น ABA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซนต์การงอก
0	52.0[d]
0.05	54.7[d]
0.1	72.0[ab]
0.2	77.3[a]
0.4	65.3[bc]
0.8	60.0[cd]
1.6	56.0[d]

- ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>แผนภาพที่ 7</u> เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ ซึ่งเมล็ดพืชเทียมได้จาก somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งมีความเข้มข้น ABA ระดับต่างๆกัน เป็นเวลา 7 วัน

8. ผลของเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้งซึ่งผ่านการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดย ABA

เมื่อนำ somatic embryo ระยะ torpedo shape ที่มีอายุ 14 วัน เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 7 วัน นำมาผลิตเมล็ดพืชเทียมและทำเมล็ดพืชเทียมแห้งโดยใช้ silica gel ให้มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ เก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ จากนั้นนำมา rehydrate และทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งพบว่า เมล็ดพืชเทียมซึ่งผ่านการเก็บเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์มีเปอร์เซนต์การงอก 74.7 และ 72.0 เปอร์เซนต์ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซนต์การงอกไม่แตกต่างทางสถิติจากเมล็ดพืชเทียมแห้งซึ่งทำการ rehydrate ทันทีโดยไม่ผ่านการเก็บรักษา ส่วนเมล็ดพืชเทียมแห้งซึ่งผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อนการ rehydrate จะมีเปอร์เซนต์การงอกลดลง คือ 64.0 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีการ

งอกต่ำกว่าเมล็ดพืชเทียมแห้งที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 1 และ 2 สัปดาห์ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้งที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ โดยเมล็ดพืชเทียมผลิตได้จาก somatic embryo อายุ 14 วัน ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองใช้ 15 เมล็ด 5 ซ้ำ)

เวลา (สัปดาห์)	อัตราการงอกหลังการ rehydration (เปอร์เซ็นต์)
0	76.0[a]
1	74.7[a]
2	72.0[a]
3	64.0[b]

- ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย