บทที่ 3

ผล

1. ศึกษาชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบ และข้อของหน้าวัวในหลอดทดลองบนอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในทุกสูตรอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนของใบ ชิ้นส่วนข้อที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS, VW และ WPM ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดเท่ากัน 100 % รองลงมา คือ สูตรอาหาร ½ MMS (96%), MS (80%) และ LS (32%) สำหรับชิ้นส่วนใบที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร LS นั้น พบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 60% รองลงมา คือ สูตรอาหาร MMS (36%), ½ MMS (36%), VW (36%), MS (16%) และ WPM (12%) (ตารางที่ 1) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมี 2 ลักษณะ คือ มีลักษณะกลมแบบเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส (Meristematic nodular callus) (ภาพที่ 1ก) และเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (ภาพที่ 1ข, ค) ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ WPM เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ในขณะที่ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่น ๆ เกิดการพัฒนาเป็นเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส แคลลัสทั้งสองลักษณะเริ่มเกิดขึ้นหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM มีพัฒนาการที่เร็วกว่าเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์หลังการวางเลี้ยง (ภาพที่ 1ข,ค)

อย่างไรก็ตามเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เกิดขึ้นจากชิ้นส่วนข้อ บนอาหารสูตร MS และ WPM นั้น ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นระยะเวลาหนึ่ง เกิดสีน้ำตาลทั้งชิ้นส่วน เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนา และตายในที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้เมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MMS เพื่อใช้ในการชักนำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในการศึกษาต่อไป

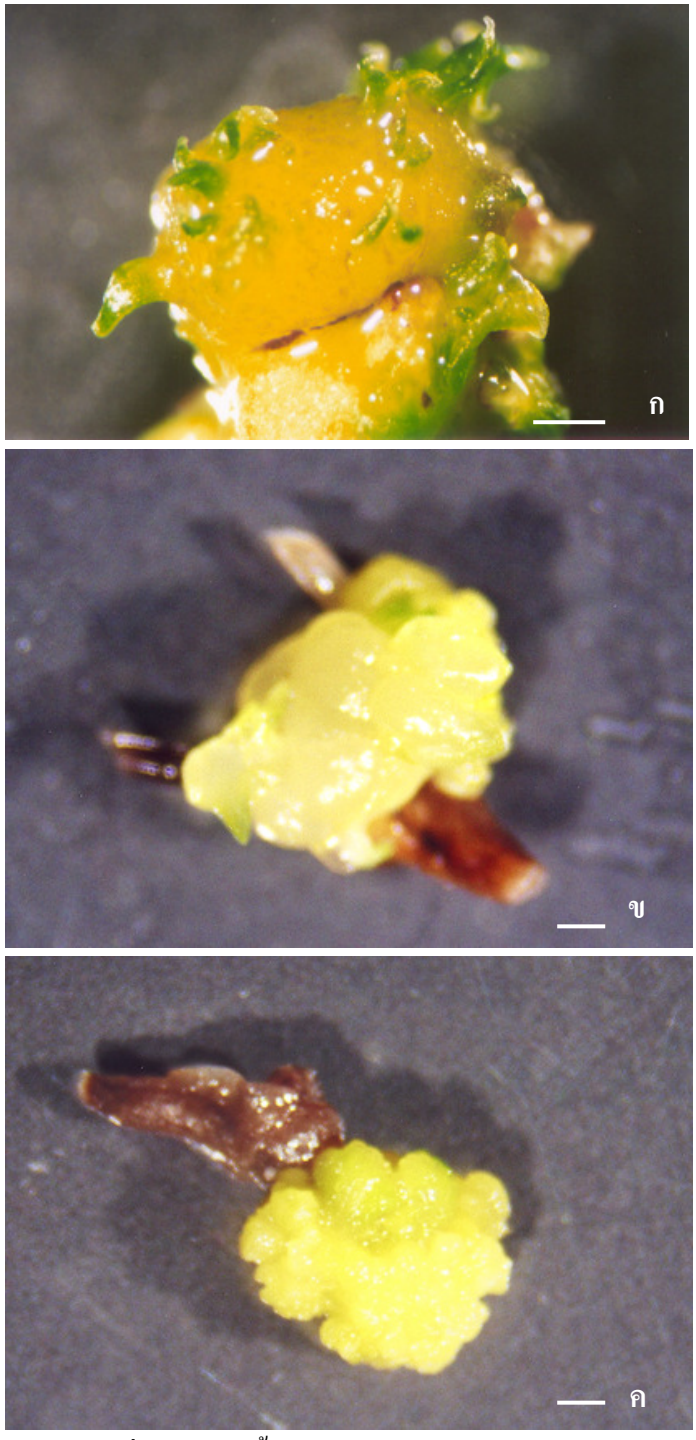
ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหาร และชิ้นส่วนพืชต่อการเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ชิ้นส่วนพืช	การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วน(%)	ขนาดแคลลัส (ซม.)	ลักษณะแคลลัส
MS	ใบ	16d	0.10e	MNC
	ข้อ	80ab	0.63bcde	EC
MMS	ใบ	36cd	1.26a	MNC
	ข้อ	100a	0.91abc	MNC
½ MMS	ใบ	36cd	0.62bcde	MNC
	ข้อ	96a	0.82abcd	MNC
LS	ใบ	60bc	0.13e	MNC
	ข้อ	32cd	0.40cde	MNC
VW	ใบ	32cd	0.43cde	MNC
	ข้อ	100a	1.03ab	MNC
WPM	ใบ	12d	0.32de	MNC
	ข้อ	100a	0.85abcd	EC
F-test		**	**	
C.V. (%)		29.86	48.22	

MNC: เมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส, EC: เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์สุลต่านวางเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1.0 มม.)

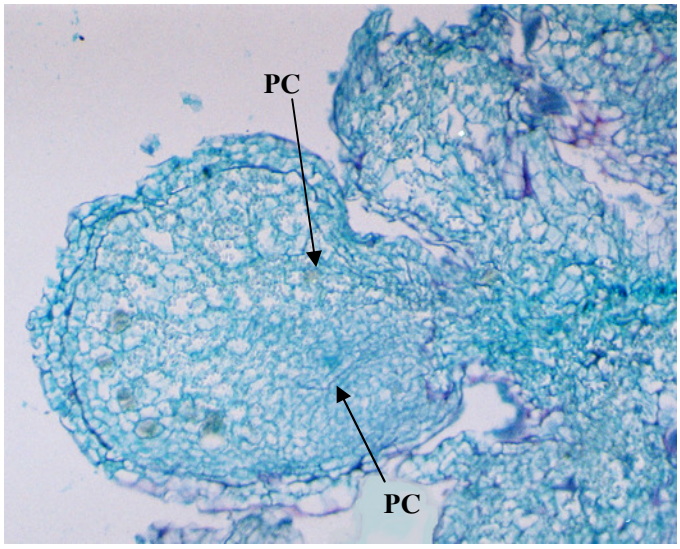
ก. ลักษณะของเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสที่เกิดบนอาหารสูตร MMS

ข. ลักษณะเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เกิดบนอาหารสูตร WPM

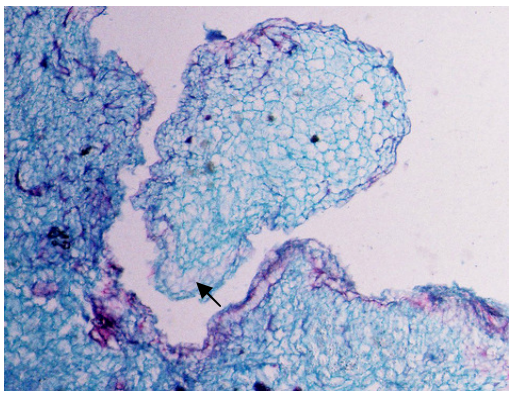
ค. ลักษณะเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เกิดบนอาหารสูตร MS

1.1 การตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยา

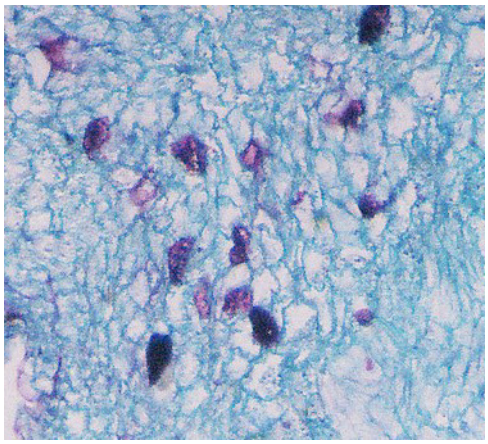
จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจากข้อหน้าวัวที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM พบว่า เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณผิวของชิ้นส่วน มีการเชื่อมต่อกันของโปรแคมเบียมระหว่างขั้วเจริญส่วนยอดและราก (ภาพที่ 2) เซลล์แต่ละเซลล์มีขนาดต่าง ๆ กัน มีรูปร่างคล้ายคลึง และเรียงตัวชิดกัน ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีฟาสท์กรีนโดยเฉพาะบริเวณเซลล์อีพิเดอมิสติดสีฟาสท์กรีนเข้มข้น เซลล์มีขนาดเล็กเรียงตัวกันแน่นทึบ มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง และมีการเจริญพัฒนาไปเป็นเมอริสเต็มมอยด์ พัฒนาจากระยะรูปกลมหัวใจ และระยะสร้างใบ ระยะรูปหัวใจมีการพัฒนาเห็นเป็นสองขั้วอย่างชัดเจน โดยที่เซลล์ส่วนบนเป็นส่วนของขั้วยอด และเซลล์ส่วนล่างเป็นซัสเพนเซอร์หรือขั้วราก (ภาพที่ 3) ภายในเซลล์ส่วนใหญ่มีเม็ดกลมเล็ก ๆ ย้อมติดสีแดงของแซฟรานิน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่สะสมภายในเซลล์ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสหน้าวัวระยะรูปกลม ซึ่งมีโปรแคมเบียม (PC) เชื่อมต่อกันระหว่างขั้วเจริญส่วนยอด และราก



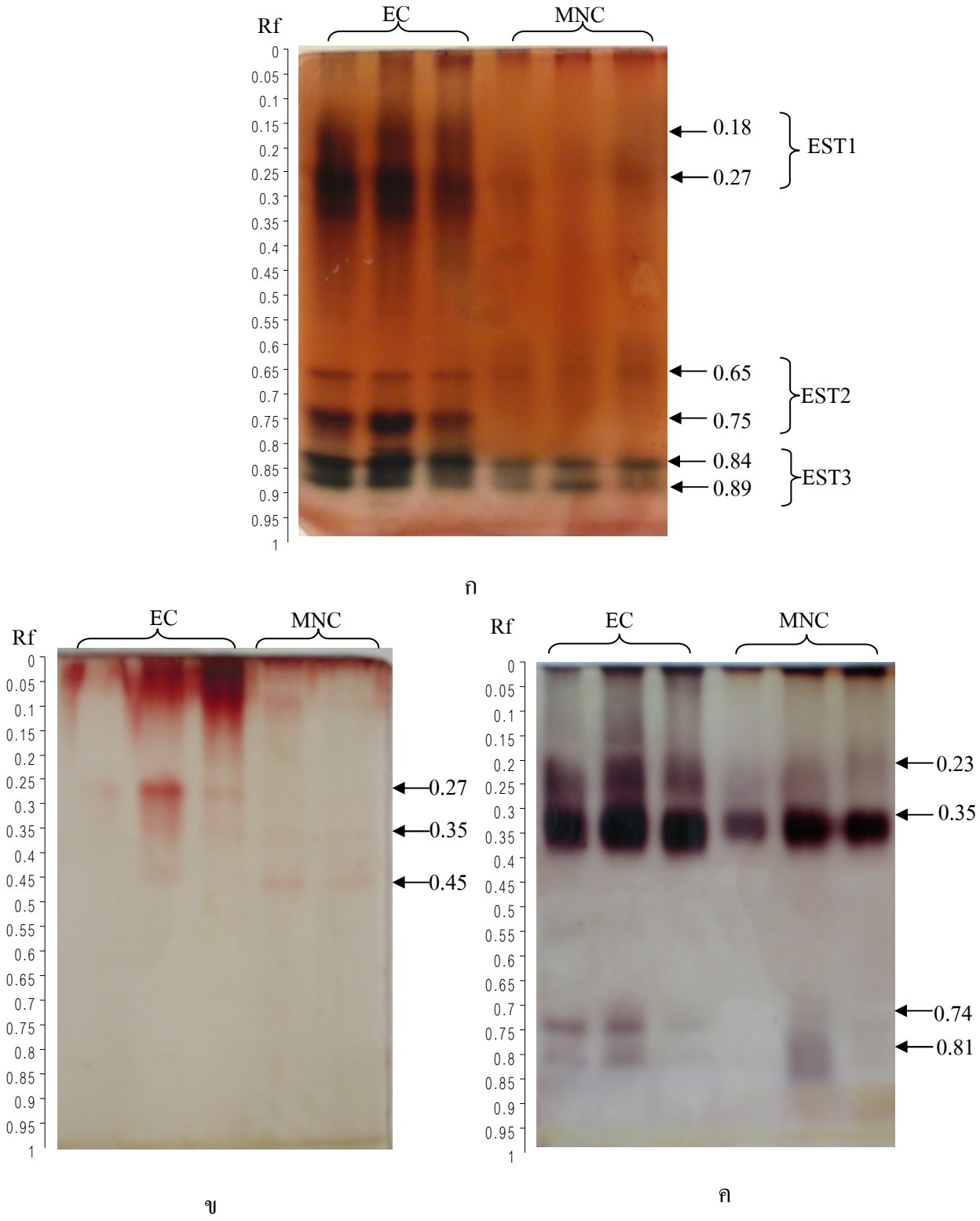
ภาพที่ 3 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสหน้าวัวระยะหลังระยะรูปกลม มีการพัฒนาสร้างซัสเพนเซอร์ (ศรชี้)



ภาพที่ 4 แสดงโปรตีนที่สะสมภายในเซลล์ของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสย้อมติดสีแดงของแซฟรานิน

1.2 การตรวจสอบเอนไซม์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

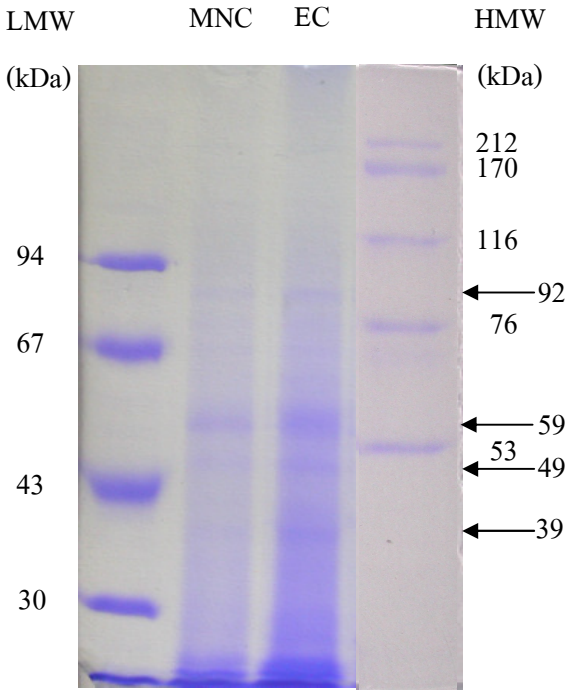
เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ระหว่างเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส และเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ในระบบสีย้อม 4 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอซิดฟอสฟาเทส พบว่า เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีรูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์เอสเตอเรส 3 กลุ่ม คือ EST1, EST2 และ EST3 เมื่อวัดอัตราการเคลื่อนที่ (Rf) ของแต่ละกลุ่ม พบว่า EST1 มี 2 แถบ มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.18 และ 0.27 ส่วน EST2 แยกได้ 2 แถบ มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.65, และ 0.75 และ EST3 แยกได้ 2 แถบ มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.84 และ 0.89 เมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสให้รูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์ 1 กลุ่ม (EST3) (ภาพที่ 5ก) เมื่อพิจารณาระบบเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีรูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์ 1 กลุ่ม แยกได้ 3 แถบ มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.27, 0.35 และ 0.45 โดยที่เมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสแสดง 2 แถบที่ Rf 0.35 และ 0.45 (ภาพที่ 5ข) สำหรับในระบบแอซิดฟอสฟาเทสนั้น พบรูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์สามารถแยกแถบได้ 4 แถบ มีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.23 0.35 0.74 และ 0.81 ในเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสปรากฏทั้ง 4 แถบ แต่เมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสนั้นปรากฏเพียง 2 แถบ ที่ Rf 0.23 และ0.35 (ภาพที่ 5ค) ส่วนในระบบมาเลทดีไฮโดรจีเนสนั้นไม่ปรากฏแถบของเอนไซม์ในแคลลัสทั้งสองชนิด



ภาพที่ 5 ความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์ของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (EC) ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส (MNC) ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในระบบเอนไซม์เอสเตอเรส (ก) เปอร์ออกซิเดส (ข) และแอซิดฟอสฟาเทส (ค)

1.3 การตรวจสอบโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

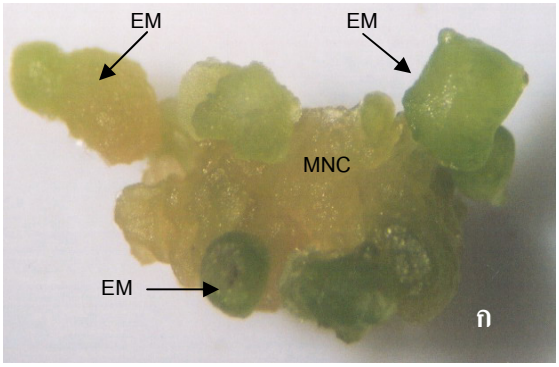
การตรวจสอบโปรตีนของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส โดยใช้ SDS-PAGE โดยย้อมสีโพลีอะคลิลาไมด์เจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 พบว่า เมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสให้แถบของโปรตีนปรากฏ 2 แถบ จากการคำนวณเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนที่พบมีขนาด 59 และ 92 kDa ส่วนเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสให้แถบของโปรตีนปรากฏ 4 แถบ ขนาด 39, 49, 59 และ 92 kDa (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 รูปแบบโปรตีนที่ได้จาก 7.5% Polyacrylamide gel electrophoresis ของเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส (MNC) และเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (EC)

2. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

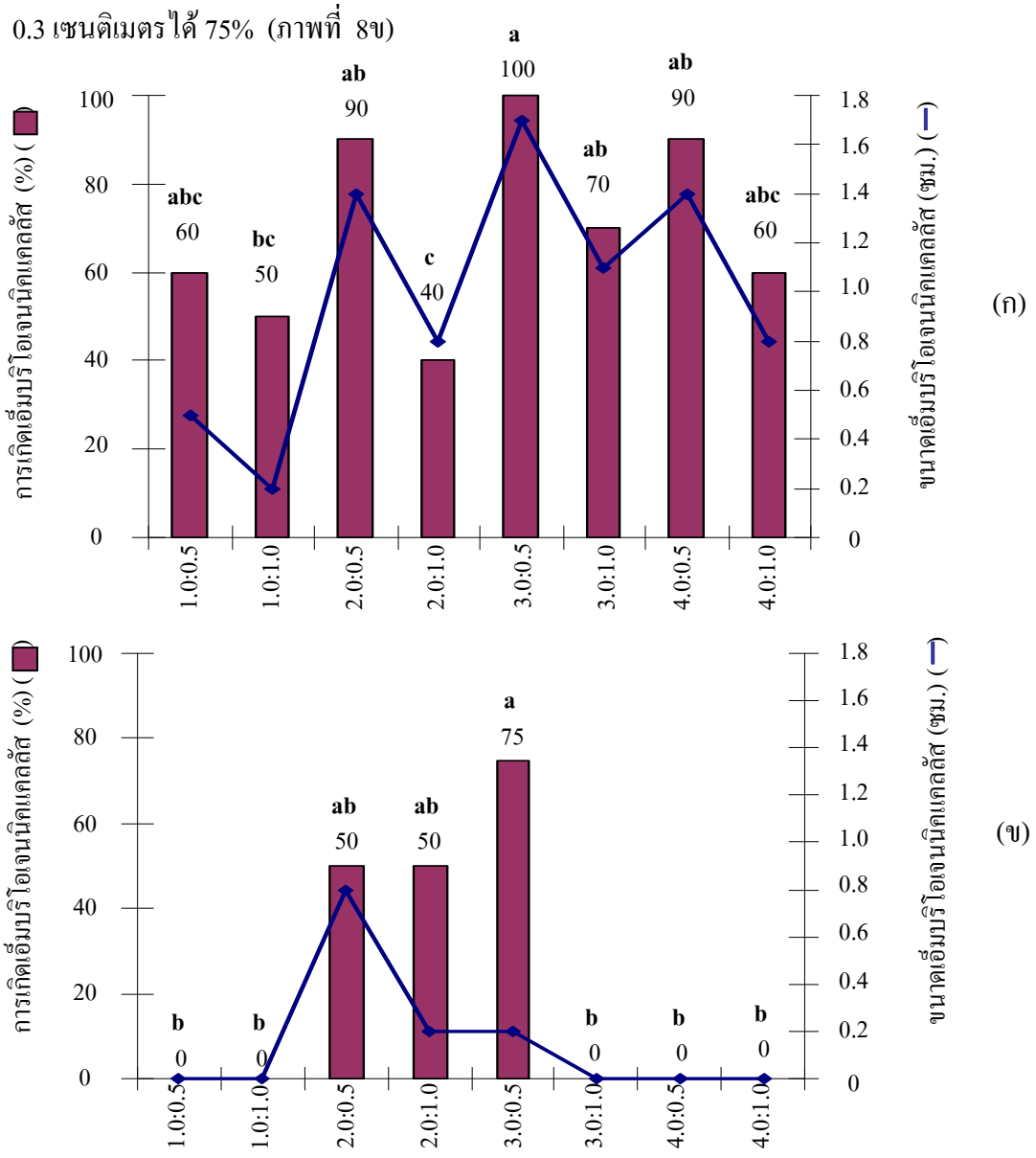
การทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยการเพาะเลี้ยงเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสหน้าวัวในอาหารแข็งสูตร MMS ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนสามารถสร้างเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้ในสัปดาห์ที่ 8 หลังการวางเลี้ยง และมีการสร้างต้นอ่อนในสัปดาห์ที่ 16 หลังการวางเลี้ยง ลักษณะของเอ็มบริโอมีโครงสร้างเป็นสองขั้ว (ภาพที่ 7ก) คือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด และส่วนราก ซึ่งจะมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป (ภาพที่ 7ข)



ภาพที่ 7 ลักษณะเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสของหน้าวัว (EM) (ก) ที่พัฒนาจากเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส (MNC) และการงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ (ข) หลังการเพาะเลี้ยง 16 สัปดาห์บนอาหารสูตร MMS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

2.1 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ kinetin หรือ BA

2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 1.6-1.8 เซนติเมตรได้ดี (100%) (ภาพที่ 8ก) ส่วนการใช้ร่วมกับ BA นั้น พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 0.1-0.3 เซนติเมตรได้ 75% (ภาพที่ 8ข)



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และขนาดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (ซม) บนอาหารสูตร MMS เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin (ก) หรือ BA (ข) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตรเดิม พบว่าในสัปดาห์ที่ 16 หลังการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการสร้างต้นอ่อนขึ้น บนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบการสร้างต้นอ่อน (100%) มีจำนวนเฉลี่ยสูง 8.7 ต้นต่อแคลลัส และในสูตรอาหารเดียวกันนี้พบการสร้างยอดสูง 87.5% จำนวน 3 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 2) ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ชิ้นส่วนสร้างต้นอ่อนได้สูงสุด 100% จำนวน 8 ต้นต่อแคลลัส และสร้างยอดได้ 100% จำนวนยอดเฉลี่ย 13 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของ 2,4-D และ kinetin ต่อการสร้างต้นอ่อน และการสร้างยอด หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

2,4-D	Kinetin	การสร้างต้นอ่อน(%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)	การสร้างยอด(%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)
— (มก/ล) —					
1.0	0.5	100a	6.8	22b	0.4b
1.0	1.0	100a	8.7	87.5a	3.0a
2.0	0.5	100a	7.4	83.3a	2.0ab
2.0	1.0	100a	8.0	83.3a	3.3a
3.0	0.5	100a	7.65	50ab	1.3ab
3.0	1.0	80b	4.9	40ab	2.0ab
4.0	0.5	77b	5.65	55.5ab	1.4ab
4.0	1.0	100a	8.05	50ab	0.8ab
F-test		*	ns	*	*
C.V. (%)		13.95	43.23	84.26	72.71

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 ผลของ 2,4-D และ BA ต่อการสร้างต้นอ่อน และการสร้างยอด หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

2,4-D	BA	การสร้างต้นอ่อน(%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)	การสร้างยอด(%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)
—(มก/ล)—					
1.0	0.5	100	8.0a	100a	13.0a
1.0	1.0	100	2.67bc	100a	6.0b
2.0	0.5	100	3.0b	100a	6.0b
2.0	1.0	50	1.5bcd	100a	4.51bc
3.0	0.5	100	2.25bcd	100a	1.5cd
3.0	1.0	66.66	0.67cd	50ab	0.5d
4.0	0.5	80	1.20cd	80ab	0.8d
4.0	1.0	60	0.64d	40b	0.4d
F-test		ns	**	*	**
C.V. (%)		48.83	55.43	43.88	73.55

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

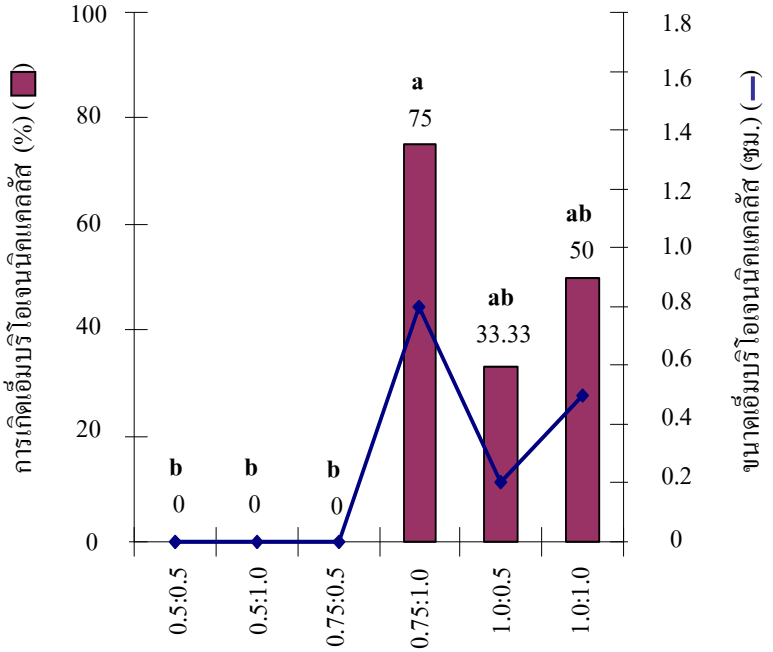
* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

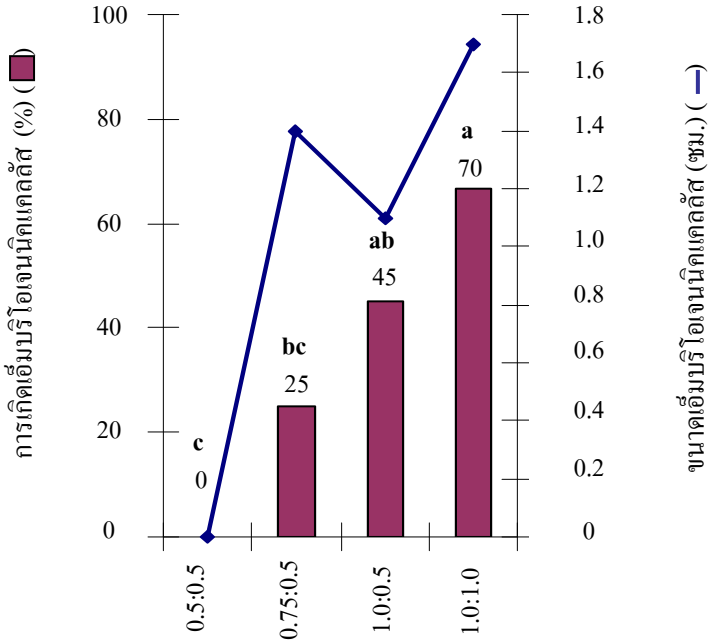
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

2.2 ผลของ TDZ ร่วมกับ kinetin หรือ BA

จากการศึกษา พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ การใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีการพัฒนาสร้างเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูงสุด (75%) โดยแคลลัสมีขนาด 0.7-0.9 เซนติเมตร (ภาพที่ 9ก) ส่วนการใช้ TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีการพัฒนาสร้างเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสขนาด 1.6-1.8 เซนติเมตร (66.67%) (ภาพที่ 9ข)



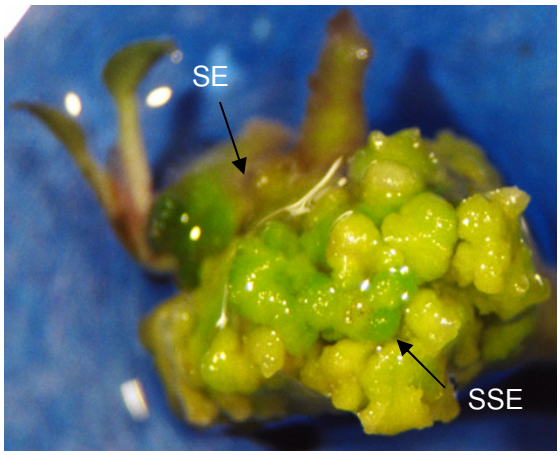
(ก)



(ข)

ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และขนาดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (ซม) บนอาหารสูตร MMS เติม TDZ ร่วมกับ kinetin (ก) หรือ BA (ข) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ในสัปดาห์ที่ 16 หลังการย้ายเลี้ยง ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่พบการสร้างต้นอ่อน แต่พบว่ามีกลุ่มของ secondary embryo เกิดขึ้น (ภาพที่ 10) ส่วนการเติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร จะไม่เกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส แต่จะสร้างต้นอ่อน (40%) และสร้างยอด (100%) (ตารางที่ 4) และการใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้การเกิดต้นอ่อนสูงสุด 100% มีจำนวนต้น 2.4 ต้นต่อแคลลัส และสร้างยอดรวมได้ 6.4 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 5) ส่วนการสร้างต้นอ่อนจะดีเมื่อความเข้มข้นของ TDZ ต่ำ (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 10 การงอกของโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryos: SE) และการสร้าง Secondary somatic embryo (SSE)

ตารางที่ 4 ผลของ TDZ และ BA ต่อการสร้างต้นอ่อน และการสร้างยอด หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นระยะเวลานาน 16 สัปดาห์

TDZ	BA	การสร้างต้นอ่อน(%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)	การสร้างยอด(%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)
—(มก/ล)—					
0.5	0.5	40	4.0	100a	17
0.75	0.5	45	6.3	75ab	13
1.0	0.5	0	0	55bc	13
1.0	1.0	0	0	33.33c	17
F-test		ns	ns	**	ns
C.V. (%)		36.71	85.31	32.75	20.44

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 5 ผลของ TDZ และ kinetin ต่อการสร้างต้นอ่อน และการสร้างยอด หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นระยะเวลานาน 16 สัปดาห์

TDZ	Kinetin	การสร้างต้นอ่อน(%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)	การสร้างยอด (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)
—(มก/ล)—					
0.5	0.5	66.67ab	1.67ab	100a	4.0ab
0.5	1.0	0b	0c	100a	2.33bc
0.75	0.5	100a	2.4a	100a	6.4a
0.75	1.0	50ab	1.5abc	25b	0.25c
1.0	0.5	33.33ab	0.3bc	33.33 b	0.67c
1.0	1.0	50ab	1.25abc	75ab	0.75c
F-test		*	*	*	**
C.V. (%)		86.06	57.81	46.26	51.08

* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

2.3 ผลของ TDZ หรือ TDZ ร่วมกับ 2,4-D

จากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส พบว่าการใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำไม่ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส แต่ส่งเสริมการสร้างต้นอ่อน การใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงชนิดเดียว สามารถสร้างต้นอ่อนได้ดี 100 % จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.75 ยอด/แคลลัส (ตารางที่ 6) ส่วนการใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถสร้างต้นอ่อนได้ดี 100 % จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.33 ยอด/แคลลัส (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ผลของ TDZ ต่อการสร้างต้นอ่อน ของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นระยะเวลานาน 16 สัปดาห์

TDZ (มก/ล)	การสร้างต้นอ่อน(%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต่อแคลลัส)
0.1	100	4.0
0.2	66	2.17
0.3	100	4.3
0.4	100	5.75
F-test	ns	ns
C.V. (%)	42.6	50.33

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 7 ผลของ TDZ ร่วมด้วย 2,4-D ต่อการสร้างต้นอ่อน ของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นระยะเวลานาน 16 สัปดาห์

TDZ (มก/ล)	2,4-D (มก/ล)	การสร้างต้นอ่อน (%)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย(ต่อแคลลัส)
0.1	4.0	100	5.33
0.2	4.0	80	4.0
0.3	4.0	100	4.33
0.4	4.0	75	1.75
F-test		ns	ns
C.V. (%)		43.31	57.15

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าในสดมภ์เดียวกัน

3. ศึกษาการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลว

จากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MMS ร่วมด้วยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสเกาะกันเป็นกลุ่ม ไม่แยกเป็นเอ็มบริโอเดี่ยว ๆ (ภาพที่ 11ก) การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูงสุด 15.72 กรัม (ตารางที่ 9) ส่วนการเติม2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย Kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตรให้น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส 13.45 กรัม (ตารางที่ 8) เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการเพิ่มปริมาณในสัปดาห์ที่ 8 หลังการเพาะเลี้ยง และเริ่มสร้างยอดรวมในสัปดาห์ที่ 12 หลังการเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสงอกทั้งหมดสัปดาห์ที่ 16 (ภาพที่ 11ข, ค,ง) ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูง 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วยการเติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสจะมีสีน้ำตาล และตายในสัปดาห์ที่ 16 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของการเติม 2, 4-D และ Kinetin ต่อการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MMS ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

2,4-D	Kinetin	น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (กรัม)				หมายเหตุ
(มก/ล)		4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	16 สัปดาห์	
1.0	0.1	0.5	2.26abc	6.2a	13.45a	-
1.0	0.5	0.5	2.71a	6.9a	5.49bc	-
1.0	1.0	0.5	0.99cd	1.34cd	1.82de	-
2.0	0.1	0.5	2.32abc	5.4a	11.3a	-
2.0	0.5	0.5	2.42ab	6.7a	12.6a	-
2.0	1.0	0.5	1.59abcd	3.5b	4.8bcd	-
3.0	0.1	0.5	1.35bcd	2.5bc	4.7bcd	-
3.0	0.5	0.5	1.8abcd	3.0bc	5.1bc	-
3.0	1.0	0.5	1.25bcd	1.5cd	0e	สีน้ำตาล
4.0	0.1	0.5	1.02cd	1.7c	3.1cd2	-
4.0	0.5	0.5	1.5abde	3.37b	7.0b	-
4.0	1.0	0.5	0.65d	0d	0e	สีน้ำตาล
F-test			**	**	**	
C.V. (%)			31.32	19.12	21.47	

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

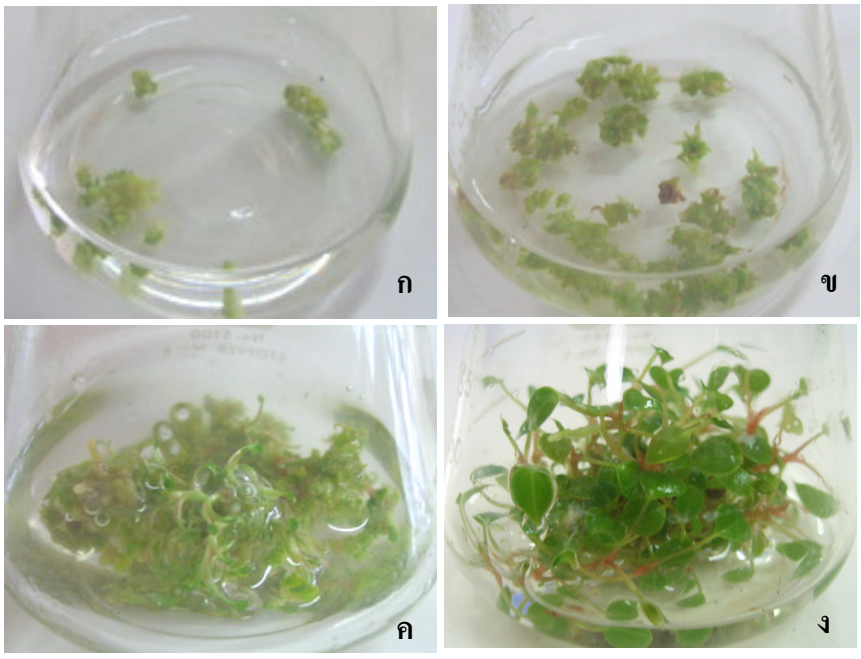
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 9 ผลของการเติม 2,4-D และ BA ต่อการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MMS ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

2,4-D	BA	น้ำหนักสดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (กรัม)			
(มก/ล)		4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	16 สัปดาห์
1.0	0.5	0.5	1.94b	4.0bc	7.7c
1.0	1.0	0.5	1.36b	2.8c	3.0d
2.0	0.5	0.5	2.14b	5.0b	11.0b
2.0	1.0	0.5	1.44b	3.0bc	2.76d
3.0	0.5	0.5	3.33a	9.9a	15.72a
3.0	1.0	0.5	1.42b	2.5c	3.4d
4.0	0.5	0.5	2.18b	4.26bc	4.0d
4.0	1.0	0.5	1.21b	2.18c	3.3d
F-test			**	**	**
C.V. (%)			23.64	18.89	16.62

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 โซมาติกเอ็มบริโอที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) 8 สัปดาห์ (ข) 12 สัปดาห์ (ค) และ 16 สัปดาห์ (ง)

4. ศึกษาการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

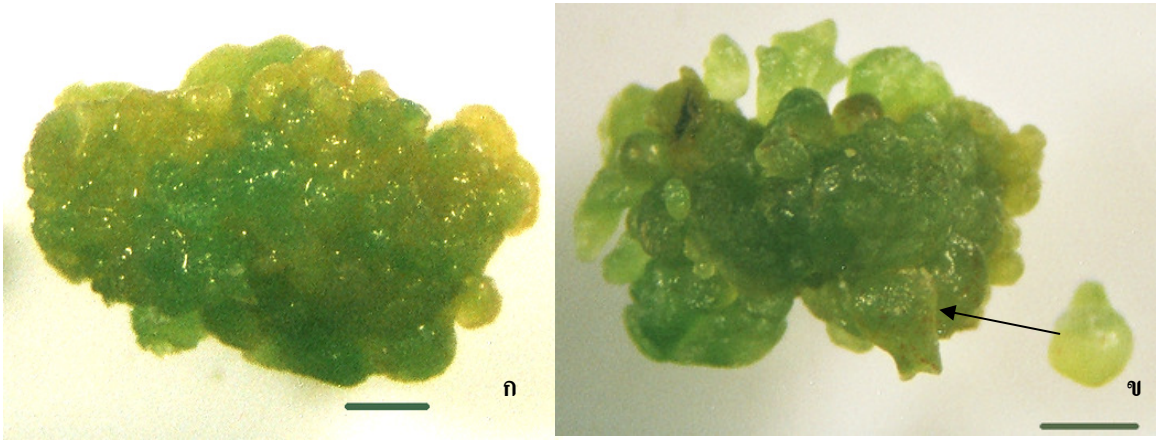
การชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสโดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS และ MS แต่ละสูตรอาหารเติม NAA และ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอในเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS สามารถสร้างยอดและรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 5 ราก/ยอด ยาว 1.5 เซนติเมตร และใบมีความยาวเฉลี่ย 1.35 เซนติเมตร ส่วนบนอาหารสูตร ½ MS มีการพัฒนาได้ช้ากว่า มีการสร้างรากเฉลี่ย 3.8 ราก/ยอด ยาว 1.95 เซนติเมตร และมีจำนวนใบเฉลี่ย 4.3 ใบ/ยอด ความยาวใบ 0.97 เซนติเมตร (ตารางที่ 10) เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมีการพัฒนาจากระยะรูปกลม (ภาพที่ 12ก) สร้างใบ (ภาพที่ 12ข) และเจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 13) การเติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรลงในอาหาร พบว่า ทำให้รากที่ได้ยาวและมีแตกแขนง ต้นอ่อนมีความสามารถในการตั้งตัวได้ดี ส่วนการเติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดคลอโรซีสทั้งต้นสูง 80-90% และการเติม IBA ทำให้เกิดคลอโรซีส 20 - 30% ในขณะที่การไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตจะไม่ทำให้เกิดคลอโรซีส

ตารางที่ 10 ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินต่อการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนราก เฉลี่ย/ยอด	ความยาวราก เฉลี่ย (ซม.)	จำนวนใบเฉลี่ย/ ยอด	ความยาวใบ เฉลี่ย (ซม.)	คลอโรซีส (%)
½ MS	3.8bc	1.95a	4.3a	0.97bc	0b
½ MS1IBA	5.7a	1.26bc	4.7a	1.2ab	20b
½ MS1NAA	3.0cd	1.41b	2.95b	1.0bc	90a
MS	5.0ab	1.51b	5.0a	1.35a	0b
MS1IBA	4.5ab	1.04cd	4.8a	1.08ab	30b
MS1NAA	2.2d	0.83d	2.32b	0.73c	80a
F-test	**	**	**	**	**
C.V. (%)	28.98	30.91	20.85	26.12	92.41

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 12 พัฒนาการระยะต่าง ๆ ของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (บาร์ = 1.0 มม.)
ก กลุ่มของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสระยะรูปกลม
ข เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสระยะสร้างใบ

ภาพที่ 13 ต้นอ่อนที่สมบูรณ์ชักนำจากเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตวางเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

5. ศึกษาชนิดของวุ้นที่มีผลต่อการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

การศึกษาการใช้วุ้น 4 ชนิด ได้แก่ Agar-Agar 0.75%, Phytagel 0.18%, Agarose 0.75% และ Bacto agar 0.75% ในการชักนำการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส บนอาหารสูตร MMS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า การเติม Agar-Agar 0.75% และ Phytagel 0.18% ส่งเสริมการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสได้สูงสุดเท่ากัน 100% มีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.83 และ 2.58 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของชนิดของวุ้นต่อการเกิดยอดของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เป็นเวลา 16 สัปดาห์

ชนิดวุ้น	ความงอก (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย
Agar-Agar 0.75%	100a	3.83a
Phytagel 0.18%	100a	2.58b
Agarose 0.75%	75ab	1.67bc
Bacto agar 0.75%	58.33b	0.92c
F-test	**	**
C.V.(%)	41.12	48.39

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

6. ศึกษาผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก และลักษณะผิดปกติ

แคลลัสหน้าวัวพันธุ์สุลต่านที่วางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมด้วย BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 18 เดือน ให้การพัฒนาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสสูงในช่วงเดือนที่ 3 (66.67%) เอ็มบริโอเริ่มงอกในเดือนที่ 6 หลังการวางเลี้ยง ต้นกล้าที่งอกมีลักษณะปกติ และพบอาการผิดปกติที่ส่วนของใบในเดือนที่ 12 ของการวางเลี้ยง ใบจะมีลักษณะเรียวเล็กคล้ายรูปหอก (ภาพที่ 14) และจะเกิดใบเรียวทั้งหมดในเดือนที่ 18 ของการย้ายเลี้ยง (ตารางที่ 12)

ภาพที่ 14 ต้นอ่อนที่พัฒนาให้ใบเรียว (ศรชี้) หลังทำการย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 เดือน บนอาหารสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางที่ 12 ผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และลักษณะผิดปกติของใบ

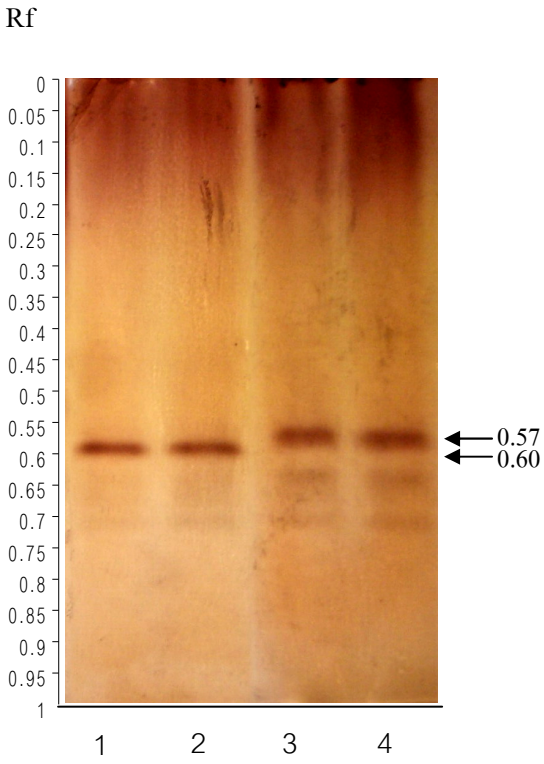
ระยะเวลา (เดือน)	ความงอก (%)	ใบเรียว (%)	ใบปกติ (%)
1	0d	0c	0c
3	33.33c	0c	100a
6	50bc	0c	100a
9	75ab	0c	100a
12	100a	30b	70b
15	100a	50	50b
18	100a	100a	0c
F-test	**	**	**
C.V.(%)	23.88	54.50	23.35

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

6.1 การตรวจสอบเอนไซม์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

การเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ระหว่างใบเรียว และใบปกติ ในระบบสีย้อม 4 ระบบ คือ เปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอซิดฟอสฟาเทส พบว่า ในระบบเปอร์ออกซิเดส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอซิดฟอสฟาเทส นั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบเอนไซม์ได้ ส่วนในระบบเอสเตอเรส จะสามารถพบจำนวนแถบ 1 กลุ่ม ที่ Rf แตกต่างกัน โดยที่ใบเรียวมีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.60 ส่วนใบปกติมีตำแหน่งของแถบที่ Rf 0.57 (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 รูปแบบเอนไซม์เอสเตอเรสของใบเรียว (เลน 1, 2) และใบปกติ (เลน 3, 4) หลังทำการย้ายเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 เดือน บนอาหารสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร