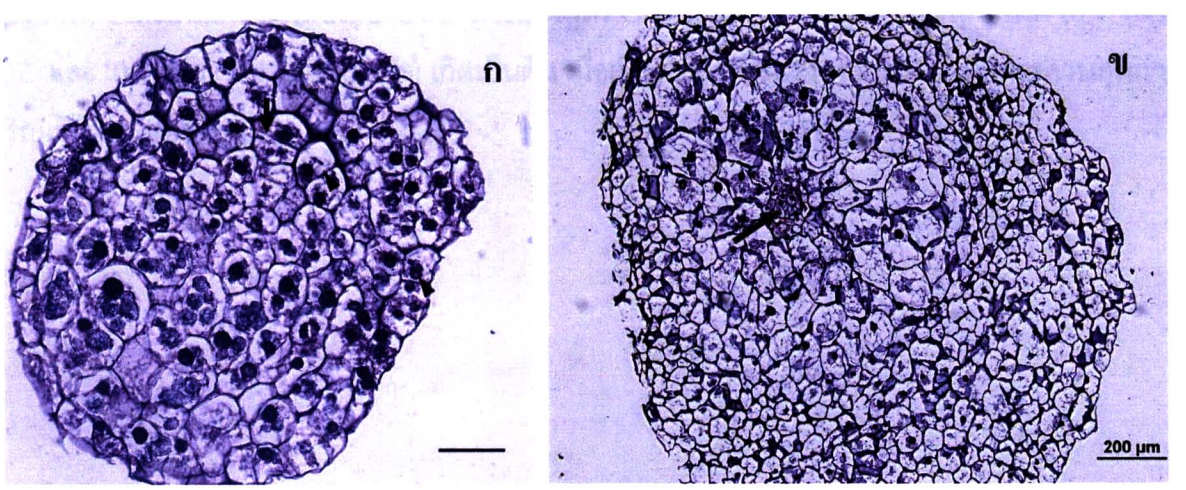
4. ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 : การทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพแคลลัส (การชักนำแคลลัสจากเมล็ด)

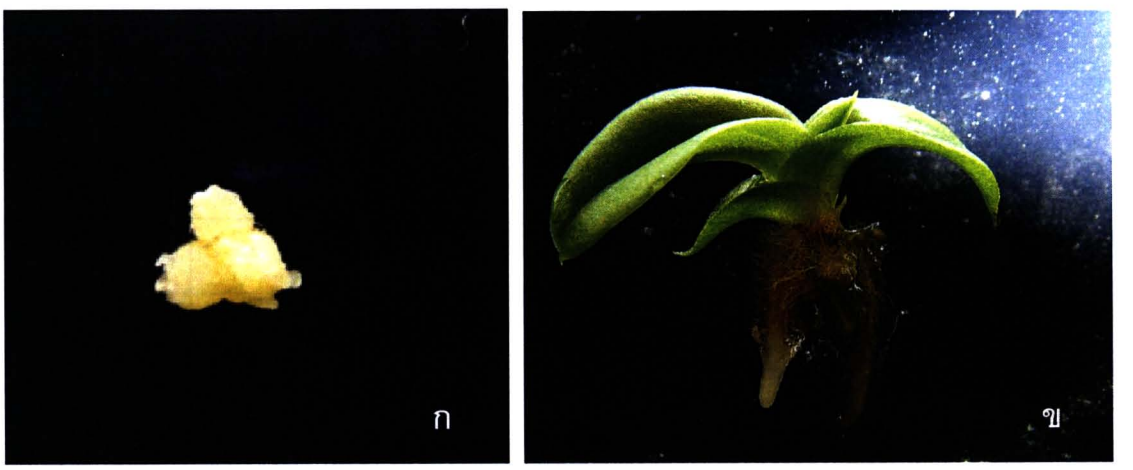
1.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4 D ต่อการเกิดเป็นแคลลัส

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) และที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ มีการเจริญของเมล็ดเพิ่มมากขึ้นในทุกชุดการทดลอง โพรโทคอร์มเกิดได้ดีที่สุดประมาณ 33.50 ± 3.02 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ระหว่างการเพาะเลี้ยง 2 เดือนแรก เมล็ดมีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เอ็มบริโอมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น โดยเปลี่ยนแปลงจากลักษณะรูปร่างยาวรีไปเป็นรูปร่างกลมสีเหลืองอ่อนและหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาหลังการเพาะเลี้ยง จะพบเอ็มบริโอในระยะนี้มีส่วนที่เกิดกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic activity) ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการขยายตัวและแบ่งตัวของเซลล์ บริเวณดังกล่าวนี้มีเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์อยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณส่วนปลาย (apical end) นอกจากนี้เซลล์ชั้นในของเอ็มบริโอมีระนาบการแบ่งเซลล์ทั้งแบบ anticlinal division (ภาพที่ 3 ข; หัวลูกศร) คือ ผนังเซลล์ใหม่จะตั้งฉากกับผิวเซลล์ที่ใกล้ที่สุด และ periclinal division (ภาพที่ 3 ข; ลูกศรชี้) คือ ผนังเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะขนานกับผิวเซลล์ที่ใกล้ที่สุด เซลล์ผิวชั้นนอกสุดมีระนาบการแบ่งเซลล์แบบตั้งฉากกับผิวเซลล์เป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3 ข; หัวลูกศร) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปในสภาพมีแสงจะมีการเจริญเป็นโพรโทคอร์ม ที่ปลายยอดมีแหลมและมีสีเขียว พบโครงสร้างคล้ายราก (rhizoid) บริเวณฐานของโพรโทคอร์ม เมื่อดูทางเนื้อเยื่อวิทยาจะพบโพรโทคอร์มมีลักษณะโครงสร้างรูปโดม (meristematic dome) ที่มีเซลล์เป็นลักษณะเซลล์เจริญ (meristematic cell) คือ เซลล์มีขนาดเล็ก แต่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (ภาพที่ 3 ข; ลูกศรชี้)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะแนวโน้มการเกิดโพรโทคอร์มหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล บนอาหารสูตร CIM (ก) เป็นเวลา 2 เดือน พบการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากกับผิวเซลล์ (หัวลูกศร) และแบ่งตัวในแนวขนานกับผิวเซลล์ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบเซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นเซลล์เจริญ (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร)

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารที่ร่วมด้วนฮอร์โมนความเข้มข้นต่างๆ สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส จากผลการทดลองจะเห็นว่าหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 3-4 เดือนบนอาหารแข็งสูตร CIM (callus induction medium) ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 mg/l และ 2,4-D เข้มข้น 1 mg/l ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 13.14 ± 2.67 % (ตารางที่ 1) แคลลัสที่ได้มีลักษณะรวมตัวแน่น หลุดจากกันได้ยาก (compact callus) และมีสีขาวอมเหลืองนวล (ภาพที่ 4 ก) ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) เมล็ดจะเกิดการพัฒนาเป็นโพรโทคอร์ม ดีที่สุดคือ 33.50 ± 3.02 % (ตารางที่ 1) และเจริญเป็นต้นที่แข็งแรง มีใบและรากสมบูรณ์ในเวลาต่อมา (ภาพที่ 4 ข)



ภาพที่ 4 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสและต้นหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า (ก) เกิดเป็นแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร CIM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (0.1 mg/l TDZ และ 0.1 mg/l 2,4-D) และ (ข) เกิดเป็นต้น เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CIM ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นแคลลัสและโพรโทคอร์ม หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร CIM ร่วมด้วยฮอร์โมน 2,4-D และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

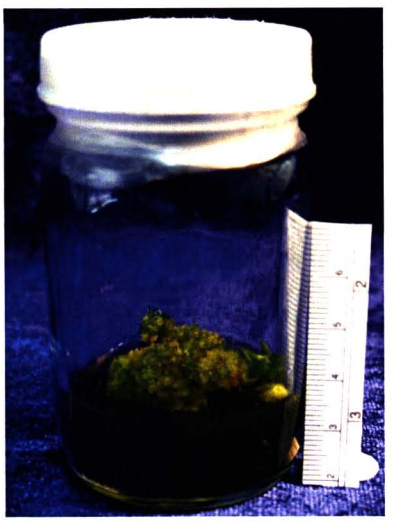
อาหาร CIM		% เกิดแคลลัส	% เกิดโพรโทคอร์ม
TDZ	2,4-D	Mean ± S.E.	Mean ± S.E.
0	0	3.64 ± 1.48^{bc}	33.50 ± 3.02^{a}
0	1	9.10 ± 2.71^{ab}	25.39 ± 5.01^{ab}
0	5	2.73 ± 1.39^{c}	29.96 ± 5.06^{ab}
0.1	0	1.82 ± 1.21^{c}	19.10 ± 5.32^{ab}
0.1	1	13.14 ± 2.67^{a}	18.17 ± 3.57^{ab}
0.1	5	6.06 ± 2.62^{bc}	20.89 ± 6.20^{ab}
0.5	0	4.55 ± 2.03^{bc}	16.37 ± 4.01^{b}
0.5	1	1.82 ± 1.21^{c}	28.07 ± 3.91^{ab}
0.5	5	2.73 ± 1.94^{c}	19.09 ± 7.94^{ab}

50.0 µm

ตอนที่ 2 การศึกษาจากแคลลัสที่มีอยู่แล้ว

2.1. การเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการทดลองเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มีประสิทธิภาพ(ภาพที่ 5) โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงร่วมกับการให้แสง สามารถเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้ (unpublished data)



ภาพที่ 5 แสดงแคลลัสที่มีอยู่แล้ว เพื่อใช้ทำการศึกษา

2.2. การชักนำ PLBs /เพิ่มปริมาณ PLBs จากแคลลัส

สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มีฮอร์โมนชนิด TDZ ร่วมกับ NAA และหากร่วมด้วยปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม จะทำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่มีประสิทธิภาพและมีศักยภาพที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้ ดังผลการทดลองต่อไปนี้

2.2.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเกิดเป็น PLBs

จากผลการทดลองพบว่าการสร้าง PLBs ในอาหารแข็งสูตร PLBIM ในชุดการทดลองที่เติม TDZ เข้มข้น 0.5 mg/l และ NAA เข้มข้น 0.5 mg/l ส่งเสริมการสร้าง PLBs ได้ดีที่สุด (น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 0.3483 ± 0.04 กรัม) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบน อาหารแข็งสูตร PLBIM ในชุดการทดลองที่เติม TDZ เข้มข้น 0.5 mg/l และ NAA เข้มข้น 0.1 mg/l (น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 0.3300 ± 0.03 กรัม) เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์ความมีชีวิตอยู่รอดร่วมกับลักษณะความเขียวสดของ PLBs ที่ได้รับ จะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร PLBIM ที่มี TDZ 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้แคลลัสเปลี่ยนแปลงเป็น PLBs เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 80 % และให้ PLB ที่มีสีเขียวสดมากที่สุด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และความเขียวสดของ PLBs หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต(mg/l)		น้ำหนัก PLB ที่เพิ่มขึ้น (กรัม) Mean ± S.E	เปอร์เซนต์การรอดชีวิต	ความเขียวสดของ PLB
TDZ	NAA			
0	0	0.1410 ± 0.04^{b}	70 %	+
0	0.1	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0	0.5	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0.5	0	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0.5	0.1	0.3300 ± 0.03^{a}	80%	+++
0.5	0.5	0.3483 ± 0.04^{a}	60%	++
1	0	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
1	0.1	0.2557 ± 0.05^{ab}	70%	+
1	0.5	0.3060 ± 0.05^{ab}	50%	+

ความเขียวสดของ PLB ในระดับน้อย (+),ระดับปานกลาง (++) และ ระดับมาก (+++)

ภาพที่ 6 แสดงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วย 0.5 mg/l TDZ และ 0.1 mg/l NAA

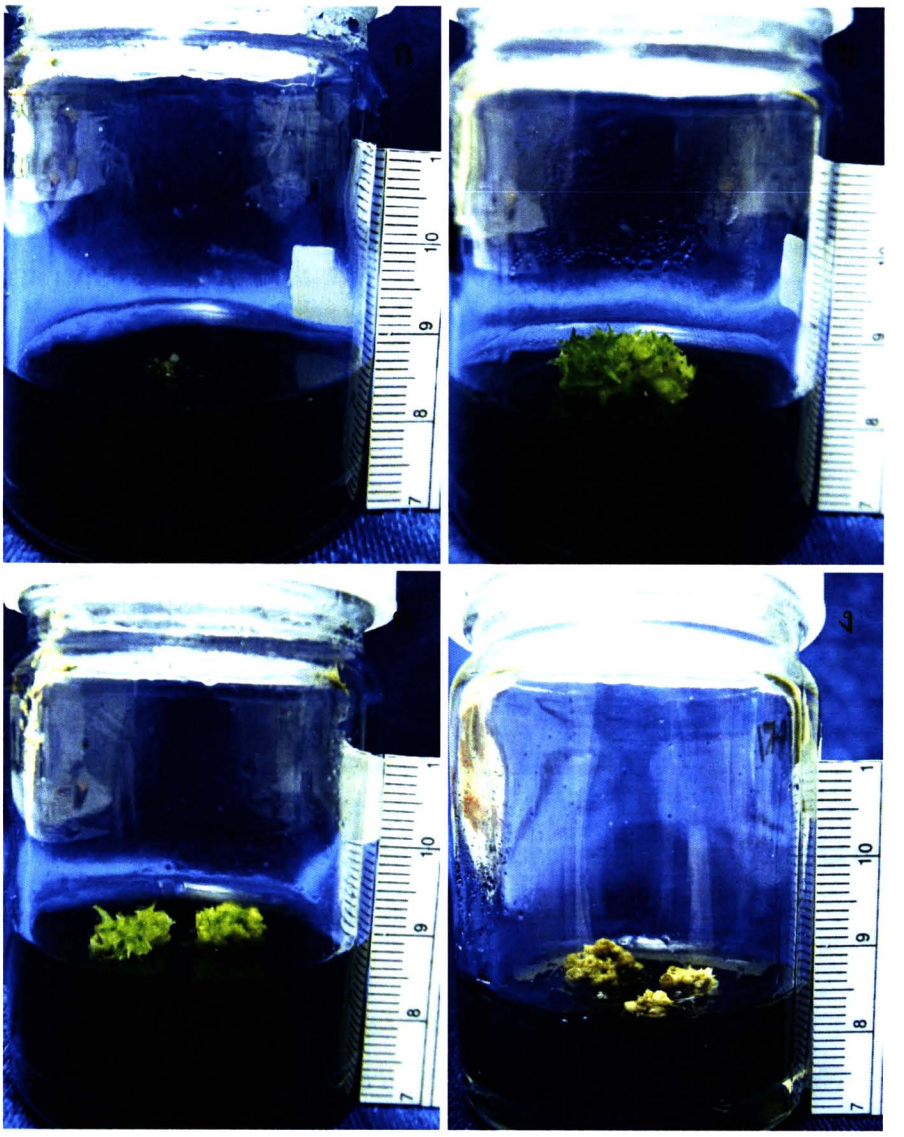
2.2.2. ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้หรือ PLBs

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (NAA ร่วมกับ TDZ) ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส(ชุดที่ 1) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่เจริญเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ภาพที่ 7 ก) ส่วนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 2) สามารถสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 7 ข) คือ 142.86 ± 84.52 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3) รองลงมาคือในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัม (48.14 ± 31.74 มิลลิกรัม) และ 30 กรัมต่อลิตร (28.00 ± 28.00 มิลลิกรัม) โดยโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จะมีลักษณะสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 7 ค) และสีเหลืองซีด (ภาพที่ 7 ง) ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ถึงแม้จะเติมหรือไม่เติมน้ำตาลซูโครส (ชุดการทดลองที่ 5-8) แคลลัสจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้น และเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญต่อไปและตายในที่สุด ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 ที่เติมเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส

ตารางที่ 3 ผลของน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

ชุดการทดลอง	สารควบคุมการเจริญเติบโต	น้ำตาลซูโครส (ก./ล.)	น้ำหนักสดของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้* (มิลลิกรัม ± S.E.)	การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (เปอร์เซ็นต์)	หมายเหตุ
1	+	0	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
2	+	10	142.86 ± 84.52 a	57.16	
3	+	20	48.14 ± 31.74 ab	28.58	
4	+	30	28.00 ± 28.00 b	14.29	
5	-	0	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
6	-	10	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
7	-	20	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
8	-	30	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**

- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ
- * เป็นน้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น
- ** แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในเวลาต่อมา



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส (ก) น้ำตาลซูโครส 0 ก./ล. พบแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ข) น้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์-บอดี้มีสีเขียว (ค) น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีสีเขียวอ่อน (ง) น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีสีเหลืองซีด

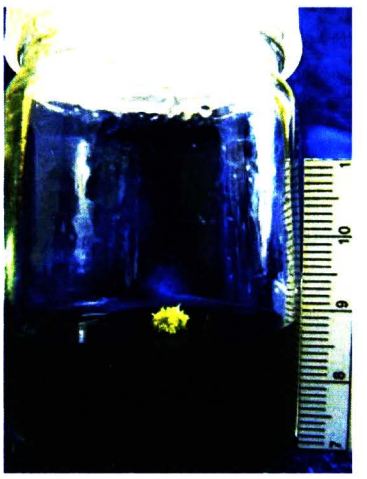
2.3. การชักนำ PLBs ให้เป็นต้น

จากการศึกษาพบว่าการชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดีให้เป็นต้นอ่อนนั้น ไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ ลงในสูตรอาหาร แต่จำเป็นต้องเติมอินทรีย์สารที่เหมาะสม ดังผลการทดลองต่อไปนี้

2.3.1. ผลของฮอร์โมนต่อการเกิดเป็นต้น

ย้ายเลี้ยง PLBs ลงในอาหารสูตรเดิม

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารแข็งสูตรเดิม (PLBIM) ร่วมด้วย TDZ 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l และหลังการเพาะเลี้ยงไปประมาณ 1-2 เดือน พบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บางส่วนมีการเจริญเติบโตเพิ่มเล็กน้อยและมีสีเหลืองขุ่น (ภาพที่ 8) และอีกบางส่วนตายไป ทำให้ทราบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ไม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในสภาวะดังกล่าว



ภาพที่ 8 แสดงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ หลังการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร PLBIM (สูตรเดิม) เป็นเวลา 1-2 เดือน พบว่ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีสีเหลืองขุ่น

2.3.2. ผลของสารอินทรีย์ (กล้วยบดและมันฝรั่งบด) ต่อการเกิดเป็นต้น

เมื่อนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบด(0, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 4 เดือน (ตารางที่ 4) พบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด (89.58 ± 45.47 ยอดต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมทั้งมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบด (ชุดการทดลองที่ 1) และเกิดรากได้ดีที่สุด (3.00 ± 1.32 รากต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม) เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5) โดยส่วนรากเริ่มปรากฏหลังการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน

เมื่อดูความสมบูรณ์ของต้นในแต่ละชุดการทดลอง (ตารางที่ 4) จะเห็นว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์ของต้นมากที่สุดพบยอดและรากที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 9 ก; ลูกศรชี้) รองลงมาคือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรและที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามลำดับ โดยต้นที่ได้จะมียอดขนาดใหญ่แต่รากมีขนาดเล็ก สำหรับต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมมันฝรั่งบด จะมีความสมบูรณ์น้อยต้นที่ได้จะมียอดขนาดเล็กและมีรากเกิดขึ้นน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่เติม

มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปยอดที่เกิดขึ้นไม่สามารถยืดยาวและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 9 ข)

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ที่ได้จากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 10 ก) พบการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ที่มีทั้งส่วนขั้วปลายยอด (ภาพที่ 10 ข; หัวลูกศร) และขั้วปลายราก (ภาพที่ 10 ข; ลูกศรชี้ ต่อมาจะพบว่าส่วนปลายยอดสามารถเจริญยืดยาว มีลำต้นสูงขึ้น และส่วนรากยืดยาวเพิ่มขึ้น รากมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนและมีขนรากปกคลุม และต้นที่ได้มีการเจริญเติบโตเบียดกันแน่นในขวด (ภาพที่ 11 ก) เมื่อทำการแยกและย้ายต้นมาเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ (ใช้สูตรอาหารเดิม) ทำให้ต้นเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ต้นที่ได้จะมีลักษณะสมบูรณ์ โดยส่วนยอดจะมีใบสีเขียว ท้องใบมีลายจุดสีม่วง (ภาพที่ 11 ข; ลูกศรชี้) และรากมีขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อน มีขนรากปกคลุมจำนวนมาก ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับต้นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และสามารถนำต้นกล้วยไม้ออกจากขวดมาปลูกในเรือนเพาะชำ (ความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) โดยต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถมีชีวิตรอดได้

ตารางที่ 4 ผลของมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

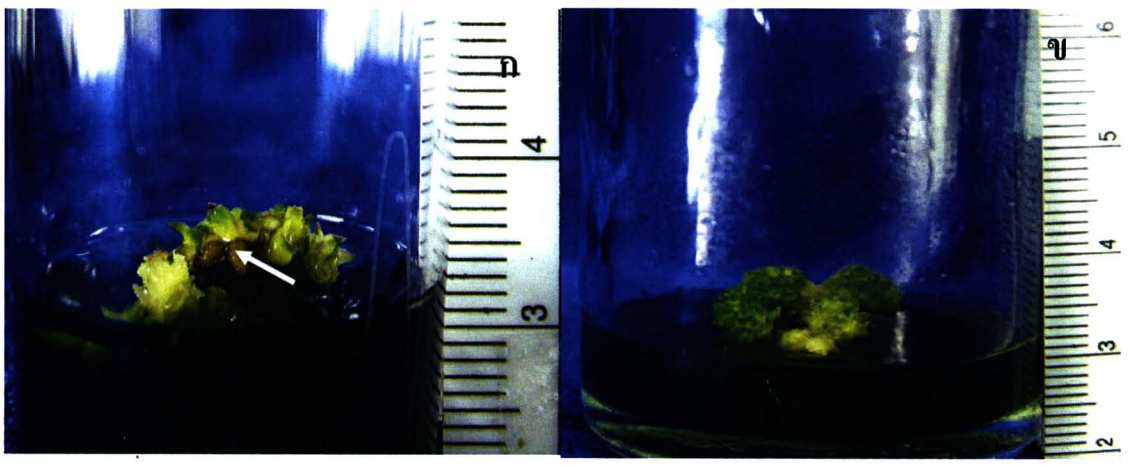
ชุดการทดลอง	สารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ		จำนวนยอดเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้	จำนวนรากเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้	ความสมบูรณ์ของต้น
	มันฝรั่งบด (ก./ล.)	กล้วยหอมบด (ก./ล.)	10 มิลลิกรัม ± S.E.	10 มิลลิกรัม ± S.E.	
1	0	0	16.65 ± 4.17 b	0.80 ± 0.80 ab	+++
2	20	0	39.70 ± 18.09 ab	0.13 ± 0.13 b	++
3	50	0	58.14 ± 37.62 ab	0.17 ± 0.17 b	++
4	0	20	89.58 ± 45.47 a	1.00 ± 0.76 ab	+++
5	0	50	31.77 ± 17.59 ab	3.00 ± 1.32 a	++++

- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ

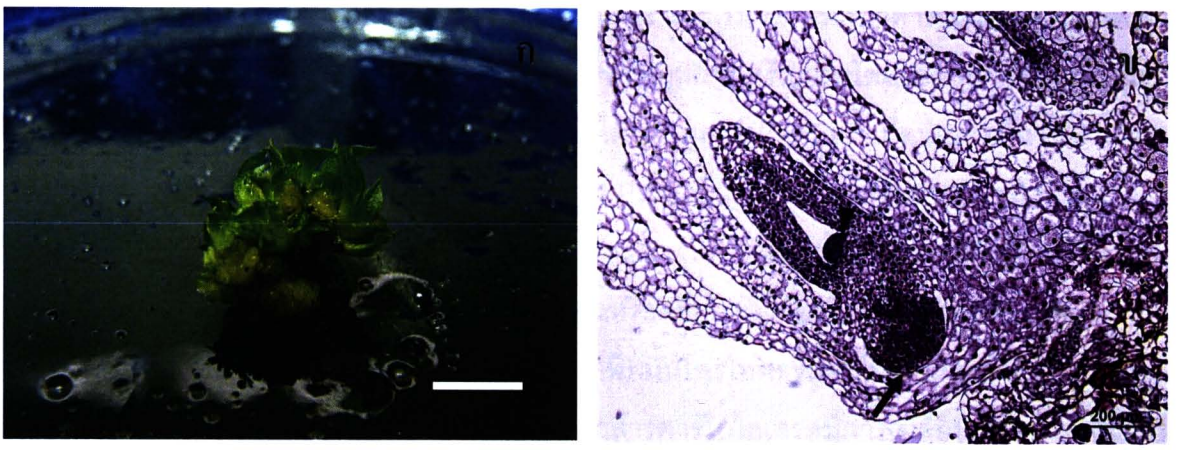
- สัญลักษณ์ ++ หมายถึง ยอดมีขนาดเล็กและมีรากเกิดขึ้นน้อยมาก

+++ หมายถึง ยอดมีขนาดใหญ่แต่รากมีขนาดเล็ก

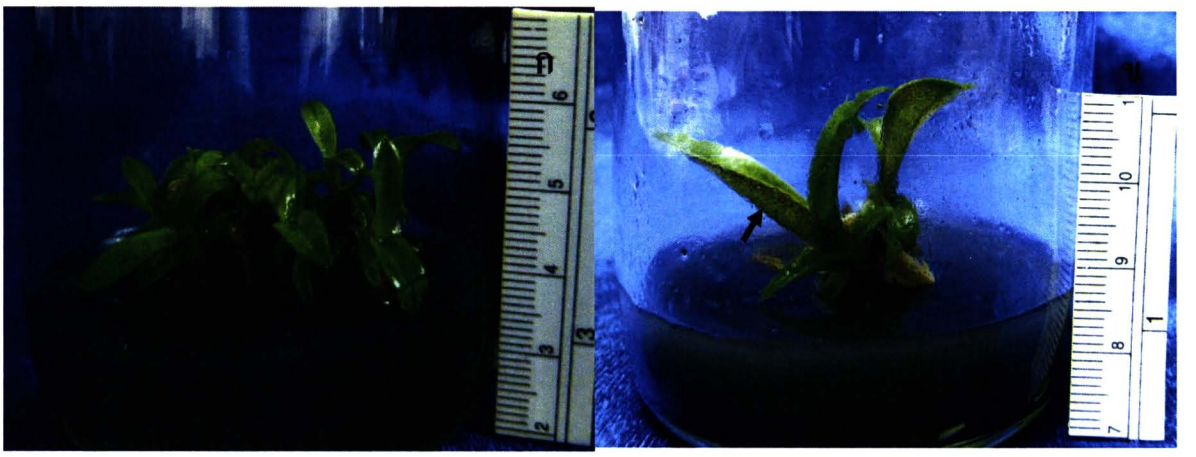
++++ หมายถึง ยอดและรากมีขนาดใหญ่



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้บนอาหารสูตร SLIM นาน 4 เดือน (ก) ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. เกิดทั้งส่วนยอดและราก (ลูกศรชี้) มีขนาดใหญ่ (ข) ที่เติมมันฝรั่งบด 50 ก./ล. เกิดส่วนยอดขนาดเล็กที่ไม่สามารถเจริญยืดยาวต่อไปได้



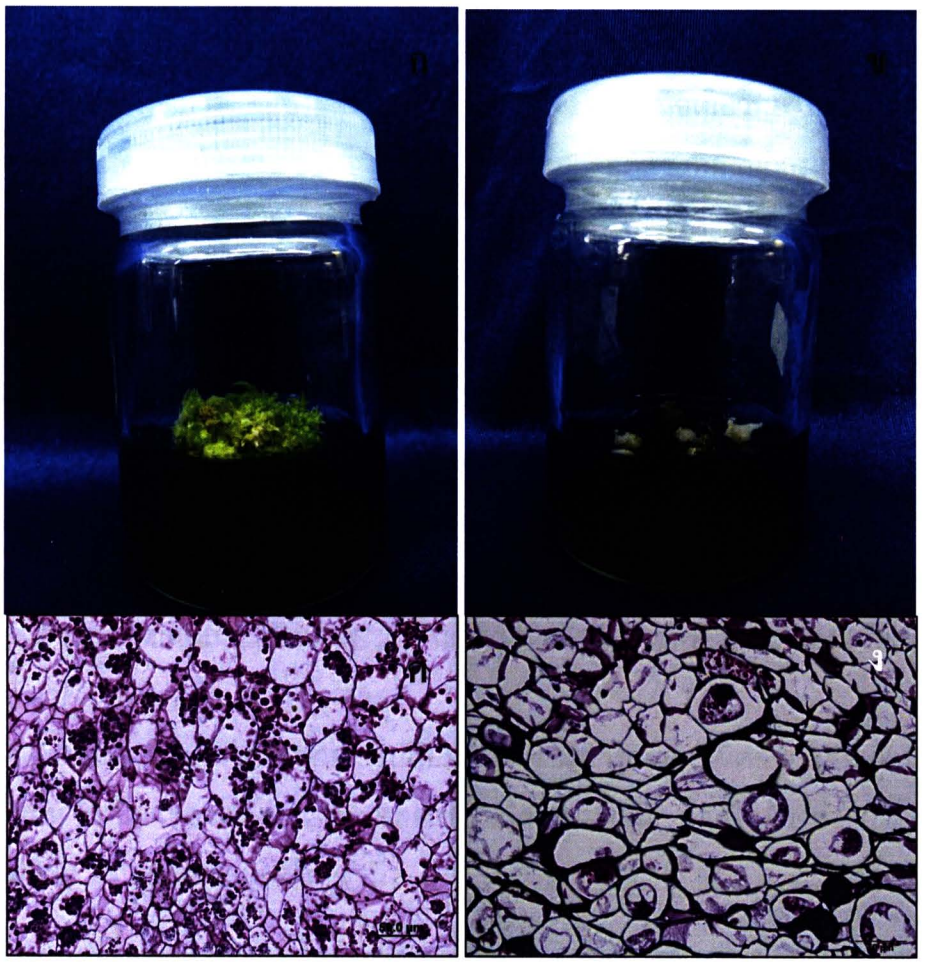
ภาพที่ 10 แสดงต้นอ่อนที่เจริญจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ก) ต้นที่ได้หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 4 เดือน (Bar = 0.6 เซนติเมตร) (ข) ต้นที่สมบูรณ์เกาะอยู่บนก้อนแคลลัส มีทั้งส่วนขั้วปลายยอด (หัวลูกศร) และขั้วปลายราก (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. (ก) เป็นเวลา 10 เดือน (ข) เมื่อแยกต้นเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมครบ 12 เดือน ต้นอ่อนเจริญสมบูรณ์ เห็นท้องใบมีลายจุดสีม่วง (ลูกศรชี้)

การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 C) **โดยวิธี** vitrification

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาชิ้นส่วนพืชมาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง พบว่าชิ้นส่วนในรูปแบบแคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และเริ่มซีดเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จึงได้เพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลซูโครส (สูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้)) จนได้โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ เพื่อนำมาเป็นชิ้นส่วนในการทำการทดลองครั้งนี้ จากการศึกษาโดยการแช่ในสาร PVS 2 ในระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าแนวโน้มในการแช่โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ใน PVS 2 เป็นระยะเวลา 120 นาที ให้ผลการเก็บรักษาตัวอย่างที่ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารที่พบภายในเซลล์มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อก่อนการทดลองมากที่สุด ขณะที่การแช่ใน PVS 2 ระยะเวลาน้อยๆ (เช่น 60 นาที) นั้นโพรโทคอร์มจะไม่สามารถเจริญต่อไปได้และค่อยๆตายไป ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่พบว่าสารคาร์โบไฮเดรตมีการเปลี่ยนแปลงและเสียรูปไปเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อก่อนการทดลอง (ภาพที่ 12)

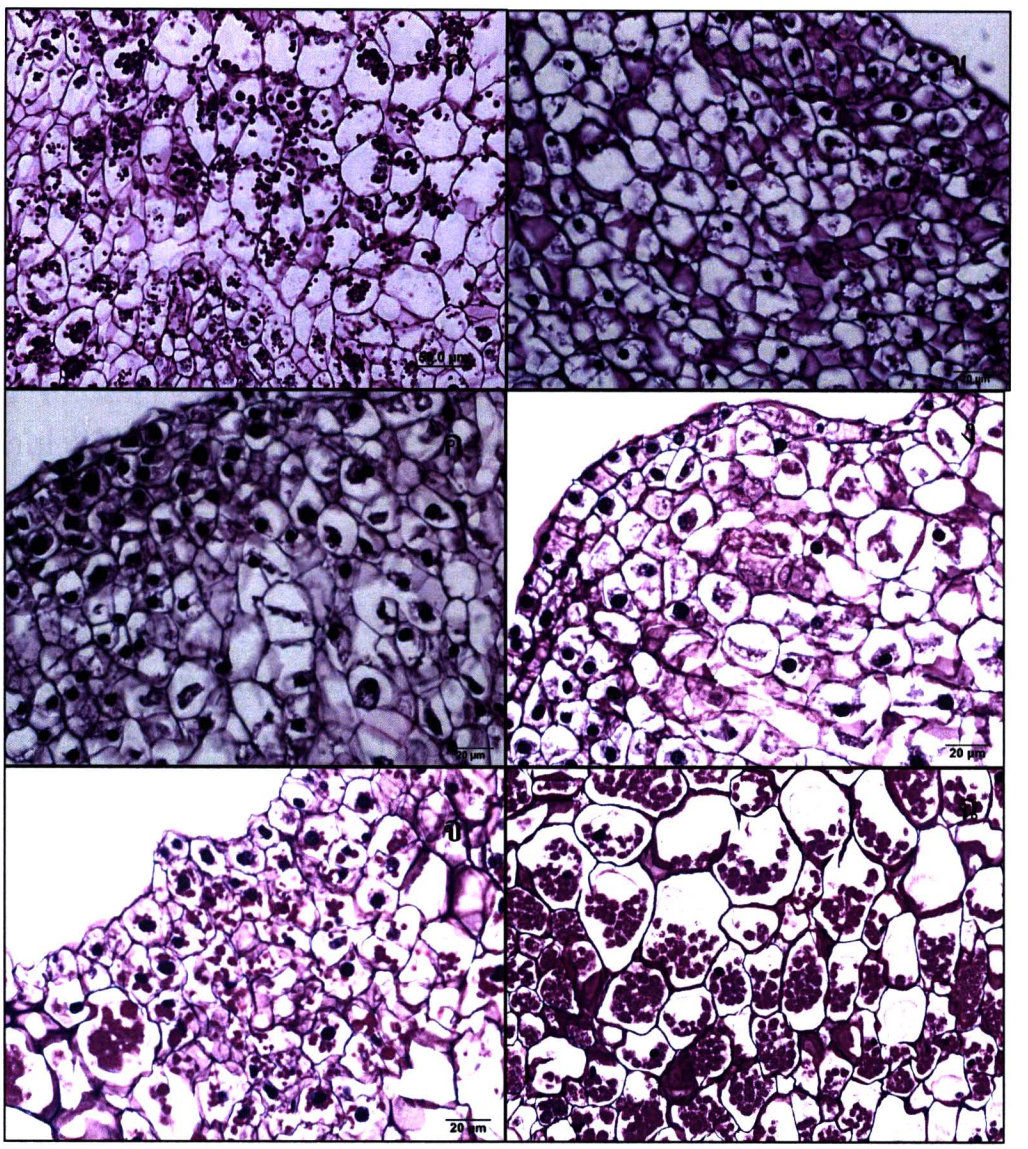


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และสารคาร์โบไฮเดรต ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (ก) โพรโทคอร์มก่อนนำมาทำการศึกษามีสีเขียวสด (ข) หลังแช่ใน PVS 2 เพียง 60 นาทีแล้วนำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำไม่พบการเจริญเติบโตต่อไป และชิ้นส่วนพืชตายทั้งหมดในเวลาต่อมา สอดคล้องกับผลการศึกษาทางฮีสโตเคมีของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ค) ก่อนนำมาศึกษาพบเซลล์มีการสะสมสารคาร์โบไฮเดรต และ (ง) เมื่อนำมาแช่ใน PVS 2 (60 นาที) แล้วเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ พบว่าบางเซลล์ไม่มีสารคาร์โบไฮเดรต หรือมีน้อยมาก (ภาพ ค-ง PAS reaction)

ผลการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 C) พบว่าหลังทำการทดลองและนำเนื้อเยื่อมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยการย้อมด้วย PAS เพื่อตรวจดูการสะสมคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์พบว่า ชุดการทดลองที่ผ่านการแช่สารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 120 นาที (ชุดการทดลองที่ 7) มีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตจำนวนมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ สังเกตจากการติดสีชมพูอมม่วง โดยก่อนทำการเก็บรักษาโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ในอุณหภูมิต่ำพบว่าภายในเซลล์ของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีการสะสมสารคาร์โบไฮเดรตค่อนข้างมาก (ภาพที่ 13 ก) แต่เมื่อทำการทดลองโดยแช่ในสารละลาย PVS 2 ระยะเวลาต่างๆ (0-120 นาที) ก่อนนำไปแช่ในอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หากไม่แช่โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ใน PVS 2 (0 นาที) สารภายในเซลล์เกิดการเสียสภาพเปลี่ยนแปลงไป และเมื่อแช่ใน PVS 2 เป็นระยะเวลา 20-80 นาที (ภาพที่ 13 ข- ง) พบว่ามีสารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตน้อยมาก เมื่อแช่เป็นเวลา 100 นาทีเห็นการสะสมสารดังกล่าวดีขึ้น (ภาพที่ 13 จ) และเห็นสารสะสมชัดเจนเมื่อแช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 120 นาที (ภาพที่ 13 ฉ) และให้ผลเหมือนกับการพบสะสมสารคาร์โบไฮเดรตก่อนทำการทดลอง

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมชนิดอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ไขมัน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ยังไม่ชัดเจนมากนัก จำเป็นต้องทำการศึกษาเก็บข้อมูลอีกครั้ง จึงไม่นำมาเสนอรายละเอียดในครั้งนี้



ภาพที่ 13 แสดงสารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ก) ก่อนทำการศึกษา (ข) แช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 20 นาที (ค) 40 นาที และ (ง) 80 นาที แล้วนำไปแช่ในอุณหภูมิต่ำ 1 ชั่วโมงพบการสะสมสารคาร์โบไฮเดรตน้อยมากหรือไม่มีเลย (จ) แช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 100 นาที คาร์โบไฮเดรตไม่สลายไปหรือสลายน้อยมากและสามารถเห็นการสะสมคาร์โบไฮเดรตดีขึ้น (ฉ) เมื่อแช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 120 นาที พบว่าสารคาร์โบไฮเดรตมีอยู่มากภายในเซลล์เหมือนกับก่อนทำการทดลอง