บทที่ 4

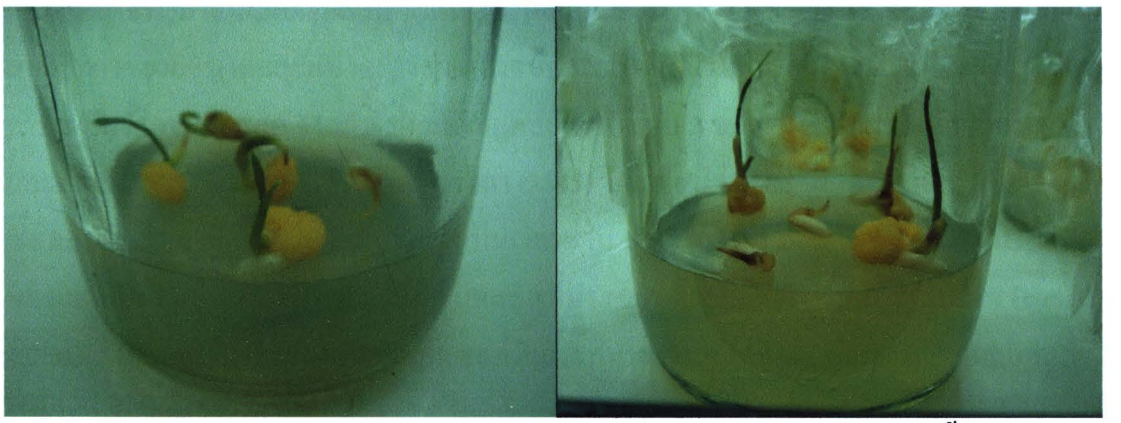
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105

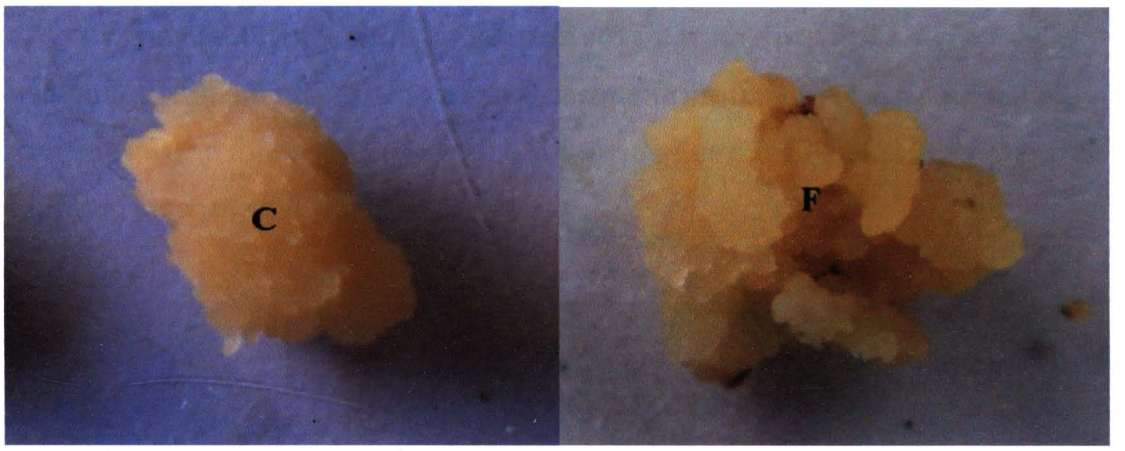
การทดลองที่ 1.1 ระดับ pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะของเมล็ดข้าวเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

1. การเกิดแคลลัสและสีของแคลลัส

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะของเมล็ดข้าว พันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงถ่าน 0.05 กรัมต่อลิตร และปรับให้มี pH ของอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 9 ระดับ นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-5 วัน เมล็ดข้าวเริ่มงอกเป็นต้นกล้าขึ้นมา และหลังจากนั้น 1 สัปดาห์ พบกลุ่มเซลล์ของแคลลัสสีเหลืองอ่อนปรากฏขึ้นบริเวณ scutellum ซึ่งอยู่บริเวณส่วนฐานที่ต้นกล้างอกขึ้นมา (ภาพที่ 4.1) โดยแคลลัสมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ และพบว่าแคลลัสที่ได้มี 2 ชนิด คือ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact callus) และแคลลัสเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) (ภาพที่ 4.2)



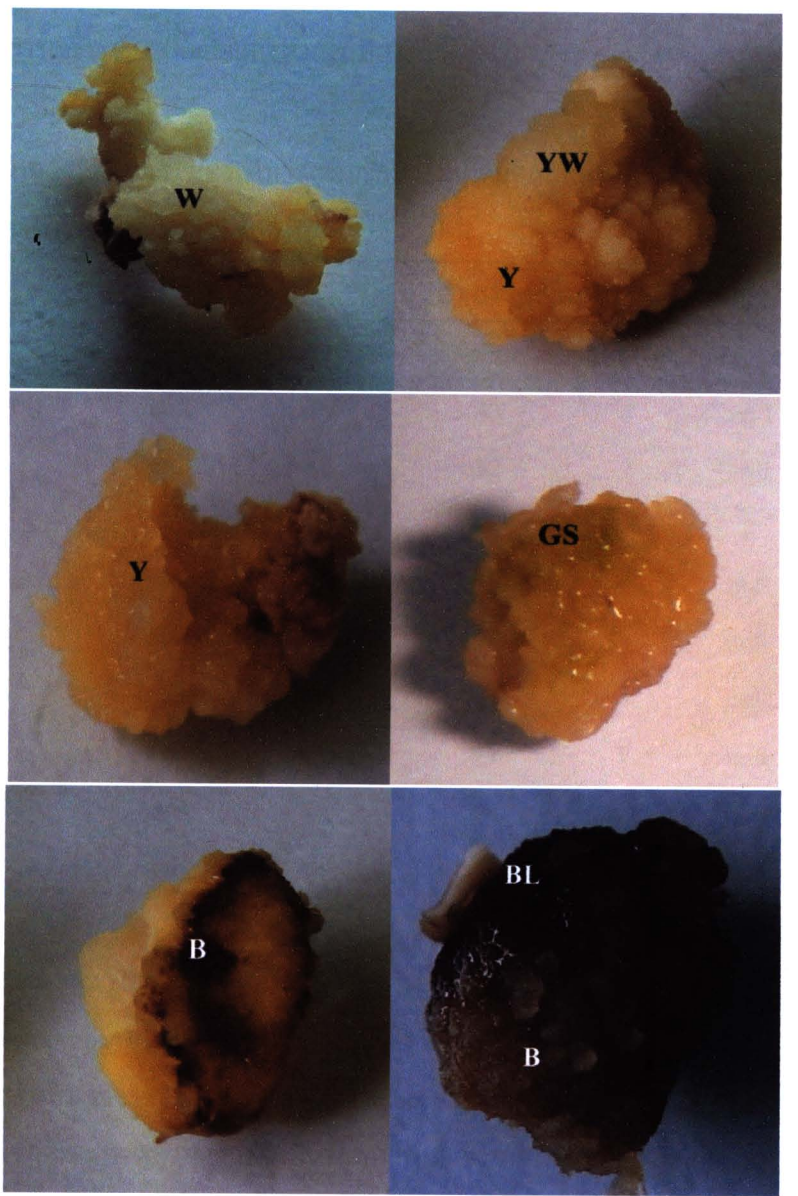
ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเกิดของแคลลัสบริเวณส่วนฐานของต้นกล้า หลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของแคลลัสหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน แคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (C = compact callus) และแคลลัสที่เกาะตัวกันหลวม (F = friable callus)

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวส่วนของคัพภะจะงอกเกิดยอดอ่อนหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3-4 วัน (ประภาและพรทิพย์, 2537) จากนั้นจะสังเกตุเห็นแคลลัสเกิดขึ้นจากบริเวณที่เรียกว่า scutellum ซึ่งอยู่บริเวณส่วนฐานที่ต้นกล้างอกขึ้นมาและแคลลัสเกิดขึ้นพร้อมกับการงอกของต้นกล้า (ประดิษฐ์ และคณะ, 2537; Tsukahara and Hirosawa, 1992; Rueb *et al.* (1994); Tsukahara *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Maede (1980) รายงานว่าแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะข้าวส่วนใหญ่เจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วน scutellum และ mesocotyl ของคัพภะ โดยเซลล์ของเนื้อเยื่อทั้งสองมีการขยายขนาดและแบ่งอย่างรวดเร็วจนกลายเป็นแคลลัส เนื่องมาจาก 2,4-D ที่อยู่ในสูตรอาหารยับยั้งการเกิดยอด จากการทดลองนี้แคลลัสที่ได้ พบ 2 ชนิด ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับประดิษฐ์และคณะ (2537) พรทิพย์ (2537) และ พิจิกา (2545) ได้แก่ ชนิด compact callus และ friable callus ซึ่ง friable callus เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานาน ส่วน สุรินทร์ และคณะ (2537) แบ่งลักษณะของแคลลัสออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ แคลลัสที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) แคลลัสที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆ (friable callus) และแคลลัสที่ประกอบด้วยแบบ compact callus และ friable callus

การเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 นั้น พบว่า อาหารที่ปรับ pH ทั้ง 9 ระดับ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในทุกระดับ pH และแคลลัสที่พบมีทั้งหมด 6 สี คือ ขาว เหลืองปนขาว เหลือง น้ำตาล ดำและจุดสีเขียว (ภาพที่ 4.3) ซึ่งการเกิดสีของเนื้อเยื่อแคลลัสนั้นที่หลากหลายสีขึ้นกับรงควัตถุต่างๆ ภายในเซลล์



ภาพที่ 4.3 ลักษณะสีของแคลลัสหลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน มี ทั้งหมด 6 สี คือ สีขาว (W = white) สีเหลือง (Y = yellow) สีเหลืองปนขาว (YW = yellow white) แคลลัสมีจุดสีเขียว (GS = green spot) สีน้ำตาล (B = brown) และ สีดำ (BL = black)

แคลลัสของเมล็ดข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่เกิดแคลลัสมีสีเหลืองปนขาว (44-66%) และรองลงมามีสีเหลือง (32-47%) และพบว่าทุกระดับ pH มีแคลลัสสีน้ำตาลเกิดขึ้น (2-14%) (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.1) ส่วนอาหารที่ pH 5.8 ซึ่งเป็นชุดควบคุม มีแคลลัสที่เป็นสีน้ำตาลและเป็นจุดสีเขียวมากกว่าอาหารที่ระดับ pH อื่นๆ ส่วนอาหารที่ระดับ pH 4.5 มีแคลลัสที่เป็นสีขาวเกิดขึ้น 9 % และสีดำเล็กน้อย (2%) โดยแคลลัสที่เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ แสดงว่าเนื้อเยื่อถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อและตายในที่สุด

ตารางที่ 4.1 ผลของระดับ pH ของอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสต่อการเกิดสีของแคลลัส หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ระดับ pH ของอาหาร	สีของแคลลัส (%)					
	White	Yellow white	Yellow	Brown	Black	Green spot
5.8 (control)	null	47	43	6	null	4
4.0	null	66	32	2	null	null
4.5	9	44	32	14	2	null
5.0	null	51	45	2	null	1
5.5	null	47	47	5	null	1
6.0	null	48	47	5	null	null
6.5	null	50	43	7	null	null
7.0	null	51	40	9	null	null
7.5	null	60	34	6	null	null

แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและ ชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่าง สี แตกต่างออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและอาหารที่เลี้ยง (รังสฤษดิ์, 2540) โดยแคลลัสของข้าวส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองอ่อนหรือสีเหลืองปนขาว (ประภาและพรทิพย์, 2537; สุรินทร์ และคณะ, 2537 และสุริยันต์ และคณะ, 2540) ซึ่งแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อนหรือเหลืองปนขาวและเซลล์เกาะตัวกันแน่น มีการเจริญเติบโตดีและเป็น embryogenic callus (E) สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (Siriwardana and Narbos, 1983; สุริยันตร์ และคณะ, 2540) ส่วนแคลลัสที่มีสี

เหลืองและเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ ฉ่ำน้ำ ซึ่งเป็นลักษณะของ non-embryogenic callus (NE) มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (Wang *et al.*, 1987) สอดคล้องกับงานทดลองของ สราวุธ (2546) ที่พบแคลลัสของอ้อย 2 ลักษณะ คือ แบบแรกแคลลัสมีสีขาวครีมและเซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact) และผิวแคลลัสมีลักษณะเป็นปุ่ม (nodular) ซึ่งเป็นแคลลัสชนิด embryogenic callus ส่วนแคลลัสแบบที่สองแคลลัสมีสีเหลือง มีลักษณะร่วน (friable) มีเมือก (mucilaginous) ซึ่งเป็นแคลลัสชนิด non-embryogenic callus นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงแคลลัสไปนานๆ จะทำให้แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ ฉ่ำน้ำ มีสีเหลืองอมน้ำตาลไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ (สุริยันตร์ และคณะ, 2540)

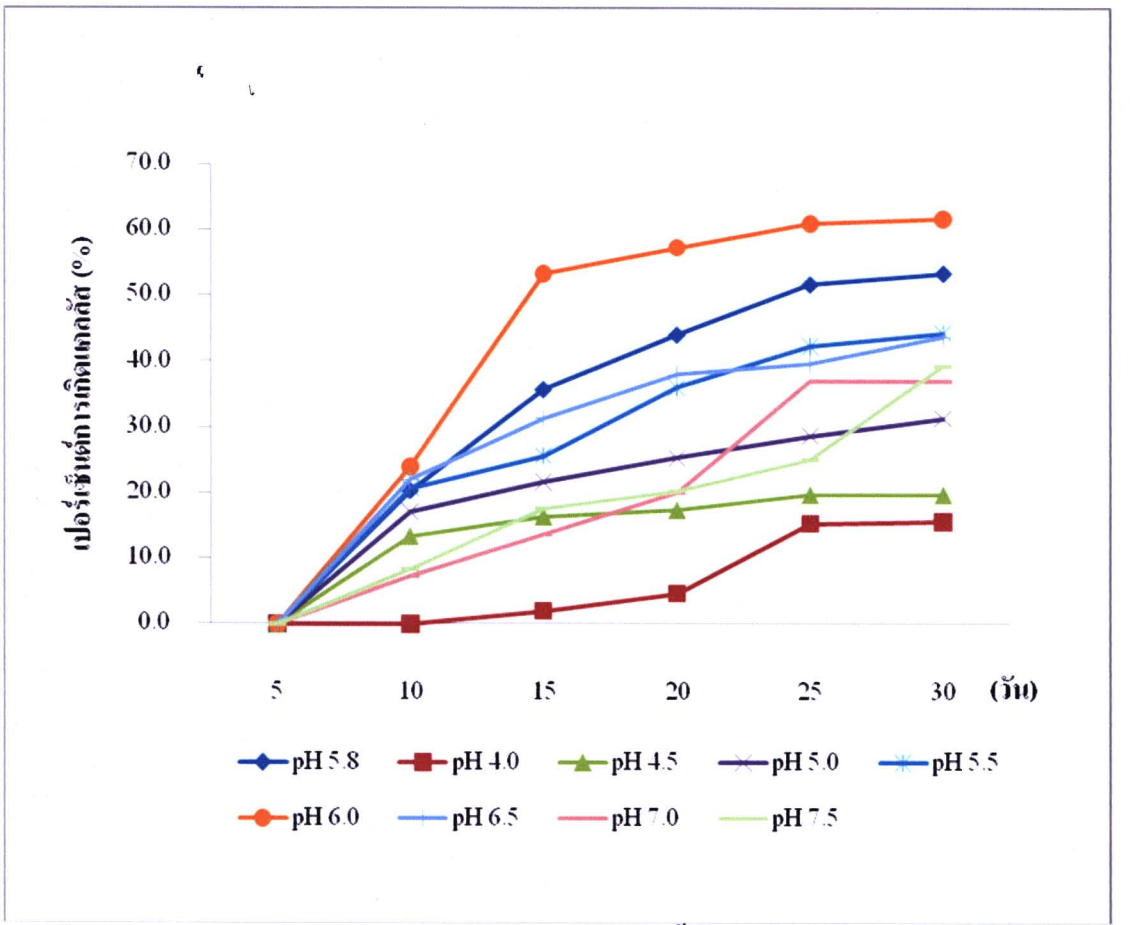
จากการทดลองแคลลัสที่เจริญมาจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าในอาหารที่มีระดับ pH 5.8 พบจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนแคลลัส ซึ่งแคลลัสลักษณะนี้สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้หากเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่พัฒนาให้เป็นต้น สอดคล้องกับ ประภาและพรทิพย์ (2537) ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสบนสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นนานประมาณ 1 สัปดาห์ พบจุดสีเขียวเกิดขึ้นที่บริเวณแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 2 จุดสีเขียวจะพัฒนาไปเป็นยอด และแคลลัสบางก้อนพัฒนาไปเป็นทั้งยอดและราก เช่นเดียวกับการทดลองของ สุรินทร์ และคณะ (2537) ที่นำแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร C2 ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร R1-R5 เพื่อชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นอ่อน พบว่า สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงแคลลัสบางอันเกิดสีเขียวขึ้นที่ผิวแคลลัส และบริเวณดังกล่าวเริ่มพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ บางแคลลัสเจริญไปเป็นรากเท่านั้น

การเกิดแคลลัสที่มีสีน้ำตาลพบได้ในอาหารทุกระดับ pH ซึ่งการที่เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ พบว่ามีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัส เนื่องจากการที่เนื้อเยื่อพืชปล่อยสารประกอบพวกฟีนอลลิกออกมา หากไม่ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่จะทำให้เนื้อเยื่อแคลลัสและอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) และแคลลัสตายในที่สุด การเปลี่ยนอาหารให้บ่อยขึ้นจะช่วยลดการเกิดการสะสมของสารประกอบฟีนอลลิกได้ (สราวุธ, 2546; ปิยชัย, 2548)

2. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีระดับ pH แตกต่างกัน หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเป็นเวลา 5 วัน พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณคัพภะของเมล็ดข้าว โดยมีการงอกเป็นต้นกล้าและหลังจากนั้นเริ่มมีการสร้างกลุ่มเซลล์ของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2 จากการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสทุก 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เริ่มมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเกิดขึ้นหลังทำการเพาะเลี้ยง 10 วัน จากนั้นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ดังภาพที่ 4.4

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี pH แตกต่างกันเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 4.2) พบว่า กรรมวิธีที่อาหารมีระดับ pH 6.0 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด 61.7% ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่อาหารมี pH 5.8 ซึ่งเป็นชุดควบคุม เมื่อเปรียบการเกิดแคลลัส พบว่า อาหารที่มีระดับ pH 6.0 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากกว่าอาหารที่มีระดับ pH 5.8 ถึง 8.4% ขณะที่สูตรอาหารที่มีระดับ pH 4.0 และ 4.5 ให้เปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัสต่ำสุด คือ 15.7 และ 19.7% ตามลำดับ



ภาพที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี pH แตกต่างกัน เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 วัน

ตารางที่ 4.2 ผลของระดับ pH ของอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ระดับ pH ของอาหาร	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (%)
5.8 (control)	53.3 b
4.0	15.7 e
4.5	19.7 e
5.0	31.3 d
5.5	44.3 c
6.0	61.7 a
6.5	43.7 c
7.0	37.0 cd
7.5	39.3 c
Mean	38.44
C.V. (%)	11.65
$LSD_{0.05}$	7.68

สูตรอาหารในการทดลองนี้เป็นสูตรที่เริ่มแรกมาจากทดลองของ Piyachai *et al.* (2007) ทำศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุกรรมไทย พบว่า อาหารสูตร LS ที่มี KNO_3 ความเข้มข้น 10 µM 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15% และผงถ่าน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุกรรมไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ (RD6, KDML 105, SPR 1 และ CNT) ซึ่งให้แคลลัสที่มีขนาด 1-2.5 เซนติเมตร

เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 กับของสุรินทร์ และคณะ (2537) ที่ชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์เดียวกันสูตรอาหารใกล้เคียงกันได้ปริมาณแคลลัสมากที่สุด 62.50% บนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้คียงกับเปอร์เซ็นการเกิดแคลลัสเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองที่พบว่าอาหารที่มีระดับ pH 6.0 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 61.7% ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นการเกิดแคลลัสมากที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอาหารที่มีระดับ pH อื่นๆ โดยสูตรที่ผู้วิจัยทำการทดลองนี้ มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงถ่าน 0.05

กรัมต่อลิตร และปรับให้อาหารมีระดับ pH 6.0 สามารถให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น 8.4% เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มีระดับ pH 5.8 ที่เป็นชุดควบคุม โดยให้ผลดีใกล้เคียงกับสูตรอาหารของ สุรินทร์ และคณะ (2537) ที่มีการใช้ฮอร์โมนหลายตัวในอาหารเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งมีราคาสูง ส่วนการศึกษาของ สุริยันตร์ และคณะ(2540) อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นเดียวกับการทดลองของผู้วิจัย พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์นางมลเอส-4 เกิดขึ้น 57%

เนื่องจากการศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของพืชยังมีการศึกษาไม่มากนักจึงไม่มีรายงานการทดลองที่สอดคล้องกับการทดลองนี้ ที่ผ่านมา Bhatia and Ashwath (2005) ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับ pH แตกต่างกัน (4.5-7.5) พบว่า ระดับ pH ของอาหารไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นการเกิดยอดของมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีแนวโน้มการเกิดยอดได้ดีในอาหารที่มี pH เป็นกรด (4.5-5.8) มีเปอร์เซ็นการเกิดยอดอยู่ในช่วง 48-56% ซึ่งมากกว่าอาหารที่มี pH เป็นด่าง (6.5-7.5) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดอยู่ในช่วง 30-40% โดยอาหารที่มีระดับ pH 5.8 (ชุดควบคุม) มีเปอร์เซ็นการเกิดแคลลัสเท่ากันกับอาหารที่มีระดับ pH 6.0 คือ 50%

3. น้ำหนักสด

เมื่อนำน้ำหนักสดของแคลลัสไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับ pH ของอาหารแตกต่างกันเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 4.3) พบว่า กรรมวิธีที่อาหารมีระดับ pH 6.0 ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส คือ 182.9 มิลลิกรัม ซึ่งมีค่ามากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากแคลลัสที่ได้จากอาหารที่มีระดับ pH 5.8 (176.9 มิลลิกรัม) แต่แตกต่างจากแคลลัสในอาหารที่มีระดับ pH 4.0-5.5 และ 6.5-7.5 ที่มีน้ำหนักสดตั้งแต่ 25.6-167.1 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4.3 ผลของระดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ระดับ pH ของอาหาร	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/แคลลัส)
5.8 (control)	176.9 ab
4.0	25.6 f
4.5	72.3 e
5.0	145.8 cd
5.5	167.1 b
6.0	182.9 a
6.5	152.5 c
7.0	138.3 d
7.5	145.6 cd
Mean	134.16
C.V. (%)	12.72
$LSD_{0.05}$	12.34

จากการทดลองน้ำหนักสดของแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังทำการเพาะเลี้ยง 30 วัน พบว่าน้ำหนักสดของแคลลัสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในสภาพเป็นกรดที่มีระดับ pH 4.0-6.0 แต่อาหารที่มีสภาพเป็นด่างที่มีระดับ pH 6.5-7.5 นำหนักสดของแคลลัสมีแนวโน้มลดลง โดยที่อาหารที่มีระดับ pH 5.8 และ6.0 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด คือ 176.9 และ182.9 มิลลิกรัม ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ สุริยันตร์ และคณะ(2540) พบว่า หลังทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์นางมลเอส-4 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสของข้าวมีน้ำหนักสด 133 มิลลิกรัม ซึ่งอาหารที่มีระดับ pH 5.8 และ6.0 ของผู้วิจัยทำการทดลองให้น้ำหนักสดของแคลลัสได้มากกว่า แต่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Pasqua *et al.* (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยง thin cell layer ของยาสูบในอาหารที่มีระดับ pH แตกต่างกันตั้งแต่ 3.0-7.0 หลังทำการเพาะเลี้ยง 25 วัน พบว่าน้ำหนักสดของชิ้นส่วนยาสูบที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับ pH 7.0 มีน้ำหนักสดมากที่สุด (663±12.78 มิลลิกรัม) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่มีระดับ pH อื่นๆ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4. เส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส

หลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ยังไม่พบการเกิดของแคลลัส แต่เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 10 วัน เริ่มมีการเกิดของแคลลัส ซึ่งในระยะนี้จะพบตุ่มแคลลัสขนาดเล็กประมาณ 1 มิลลิเมตร มีสีเหลืองเกิดขึ้น หลังจากนั้นขนาดของแคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 25 ส่วนในวันที่ 30 นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงเฉพาะในกรรมวิธีที่อาหารมีระดับ pH 5.5 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 3.65 มิลลิเมตร เป็น 4.52 มิลลิเมตร

จากตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส หลังการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับ pH ของอาหารแตกต่างกันเป็นเวลา 30 วัน พบว่า กรรมวิธีที่อาหารมีระดับ pH 6.0 มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ย 6.58 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่ามากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสที่ได้จากกรรมวิธีที่อาหารมีระดับ pH 5.8 (5.63 มิลลิเมตร) แต่แตกต่างจากเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสในอาหารที่มี pH 4.0-5.5 และ 6.5-7.5 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ยตั้งแต่ 2.65-4.52 และ 4.61-4.89 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.4 ผลของระดับ pH ของอาหารต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

ระดับ pH ของอาหาร	เส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส (มิลลิเมตร)					
	ระยะเวลา (วัน)					
	5	10	15	20	25	30
5.8	0	1.25	2.52 abc	3.45 abc	5.63 ab	5.63 ab
4.0	0	0.63	1.28 d	1.58 d	2.65 d	2.65 d
4.5	0	1.18	2.37 bc	2.93 bc	4.03 c	4.03 c
5.0	0	1.12	1.87 cd	2.43 cd	3.90 cd	3.90 cd
5.5	0	1.30	2.4 bc	3.05 bc	3.65 bcd	4.52 bc
6.0	0	1.17	3.00 ab	4.22 a	6.58 a	6.58 a
6.5	0	1.23	2.22 bc	3.10 bc	4.61 bc	4.61 bc
7.0	0	1.05	2.58 abc	3.55 ab	4.92 bc	4.92 bc
7.5	0	1.17	3.23 a	3.97 ab	4.89 bc	4.89 bc
Mean	-	1.12	2.39	3.14	3.82	4.64
C.V. (%)	-	15.23	26.57	15.38	17.82	16.53
$LSD_{0.05}$	-	-	0.81	1.04	1.33	1.33

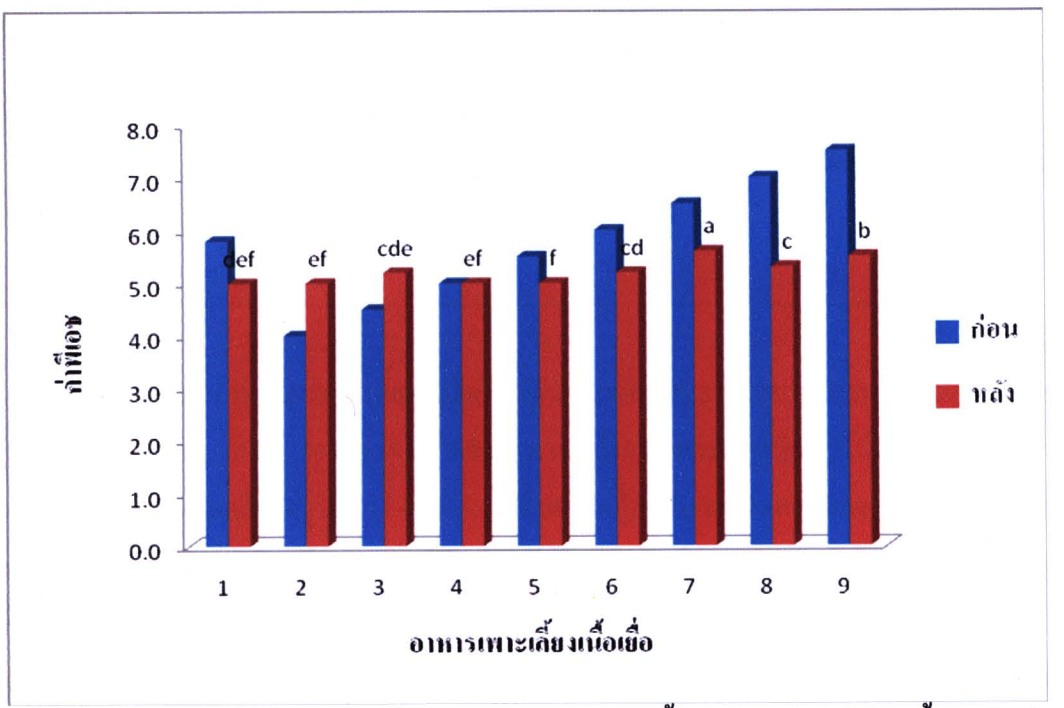
การทดลองนี้ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากการวัดขนาดแทนการชั่งน้ำหนัก เช่นเดียวกับการศึกษาของ พิจิกา (2545) เพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อโรคต่อก้อนแคลลัส เนื่องจากการวัดน้ำหนักนั้นอุปกรณ์ทุกชิ้นต้องควบคุมในห้องปลอดเชื้อทั้งหมด และขณะโยกย้ายแคลลัสมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อโรคได้สูง ถึงแม้ว่าการวัดการเจริญเติบโตสามารถทำ ได้ทั้งการวัดขนาดและน้ำหนักก็ตาม แต่การวัดขนาดนั้นมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อโรคน้อยกว่าเพราะไม่ต้องโยกย้ายแคลลัส

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร LS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีระดับ pH ของอาหารแตกต่างกัน 9 ระดับ เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน เริ่มมีการสร้างแคลลัสสีเหลืองขนาดเล็กปรากฏขึ้นบริเวณโคนต้นกล้า หลังจากนั้นแคลลัสมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นผลมาจากอิทธิพลของ 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ชักนำให้มีการเพิ่มปริมาณเซลล์กลายเป็นกลุ่มแคลลัสนั้น Evan *et al.* (1981) อธิบายว่า 2,4-D ไปมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DNA และ RNA นอกจากนั้นยังกระตุ้นการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ในระยะ G_1 ซึ่งในการทดลองขนาดของแคลลัสเริ่มคงที่หลังเพาะเลี้ยง 30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ประภาและพรทิพย์ (2537) พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดค่อนข้างคงที่ โดยแคลลัสที่ได้จากอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาด 6.9 มิลลิเมตร โดยมีขนาดใกล้เคียงกับแคลลัสที่ได้จากอาหารที่มีระดับ pH 5.8 และ 6.0 มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.63 และ6.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเส้นผ่าศูนย์กลางดังกล่าวมีค่ามากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น เช่นเดียวกับการทดลองของ Pasqua *et al.* (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยง thin cell layer ของยาสูบในอาหารที่มีระดับ pH แตกต่างกันตั้งแต่ 3.0-7.0 พบว่า อาหารที่มีระดับ pH 6.0 การก่อตัวของตาพืชได้ต่ำแต่มีการสร้างแคลลัสจำนวนมากซึ่งเป็นผลมากจากหลังการเพาะเลี้ยง thin cell layer ของยาสูบเป็นเวลา 11 วัน เนื้อเยื่อของยาสูบที่อยู่ในอาหารที่มี pH 6.0 มีการดูดซึมฟอสเฟตได้มากว่าอาหารที่ระดับ pH อื่นๆ ส่วน Bhatia and Ashwath (2005) ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับ pH แตกต่างกัน (4.5-7.5) พบว่า ระดับ pH ของอาหารไม่มีผลต่อขนาดของแคลลัสมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแคลลัสของมะเขือเทศที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 2.1-5.0 มิลลิเมตร

5. ค่า pH ของอาหารก่อนและหลังเพาะเลี้ยง

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร LS ที่มีการปรับให้มี pH เริ่มต้นแตกต่างกัน 9 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่า หลังทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเป็นเวลา 30 วัน pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งมีแนวโน้มไปในที่ทางกรด

เมื่อนำค่า pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารที่มี pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกันเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 4.5) พบว่า กรรมวิธีที่มี pH ของอาหารเริ่มต้น 6.5 หลังการเพาะเลี้ยงอาหารมีค่า pH เฉลี่ย 5.64 ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอาหารที่มีค่า pH เฉลี่ยหลังการเพาะเลี้ยงรองลงมา คือ pH 7.0 เป็น 5.27 ส่วนอาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.5 พบว่า ค่า pH เฉลี่ยของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงต่ำสุด คือ 4.91 ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงก่อนและหลังเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเป็นเวลา 30 วัน

1 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.8 2 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 4.0

3 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 4.5 4 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.0

5 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.5 6 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 6.0

7 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 6.5 8 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 7.0

9 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 7.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงก่อนและหลังเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว

ระดับ pH ของอาหาร	
ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง
5.8 (control)	5.03 def
4.0	4.97 ef
4.5	5.14 cde
5.0	4.97 ef
5.5	4.91 f
6.0	5.21 cd
6.5	5.64 a
7.0	5.27 c
7.5	5.46 b
Mean	5.18
C.V. (%)	4.7
$LSD_{0.05}$	0.18

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารที่มี pH เริ่มต้นแตกต่างกัน 9 ระดับ (4.0-7.5) พบว่า pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงมีแนวโน้มไปทางที่เป็นกรด โดย pH หลังการเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 4.91-5.64 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shibli *et al.* (1999) ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงพืช 3 ชนิด ได้แก่ สาลี่ มันฝรั่งพันธุ์ spunta และอัลมอนด์ขม บนอาหารเพิ่มจำนวนและอาหารที่ชักนำให้เกิดราก โดยศึกษาการเจริญเติบโตจากตัวแปรที่ใช้วัดได้แก่ pH ของอาหาร ออสโมลาริตี และค่าการนำไฟฟ้า พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงสาลี่ มันฝรั่งพันธุ์ spunta และอัลมอนด์ขม บนอาหารทั้ง 2 ชนิดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ค่า pH ของอาหารลดลงโดยมีแนวโน้มไปทางเป็นกรดมากขึ้น โดยอาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.8 หลังการเพาะเลี้ยงตาของสาลี่บนอาหารเพิ่มจำนวนและอาหารชักนำให้เกิดราก pH หลังการเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็น 5.45 และ 5.48 ตามลำดับ ส่วนตาของอัลมอนด์ขม pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็น 5.51 และ 5.54 ตามลำดับ และตาของมันฝรั่งพันธุ์ spunta หลังการเพาะเลี้ยง pH ของอาหารเปลี่ยนเป็น 5.51 และ 5.41 ตามลำดับ เช่น เดียวกับการศึกษาของ Skirvin *et al.* (1986) พบว่า ค่า pH ที่ปรับก่อนและหลังการนึ่งความดันมีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีค่า pH อยู่

ในช่วง 5.7-8.5 โดย pH หลังการนึ่งฆ่าเชื้อมีแนวโน้มไปทางที่เป็นกรดมากขึ้น ส่วนการทดลองการเพาะเลี้ยงแคลลัสของพืชตระกูลแตงบนอาหารที่มี pH ก่อนการเพาะเลี้ยง 5.11 พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ค่า pH ของอาหารเปลี่ยนเป็น 4.55 เช่นเดียวกันกับอาหารที่มี pH 6.63 เปลี่ยนเป็น pH 4.58

การต้านทานการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เป็นกรด George (1993) ได้อธิบายว่าเซลล์พืชจะปลดปล่อยโปรตอน (H^+) ออกมาจากไซโทพลาสซึมไปสู่ภายนอกเซลล์เพื่อแลกเปลี่ยนกับ anion หรือที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดจะลดกรดอินทรีย์ในไซโทพลาสมิกเพื่อเพิ่ม pH ส่วนการต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH ที่เป็นด่างเซลล์พืชต้านทานโดยสังเคราะห์กรดอินทรีย์ เช่น malate จาก neutral precursor (Findenegg *et al.*, 1986) ส่วน Skivin *et al.* (1986) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่เพาะเลี้ยง *Cucumis melo* มีแนวโน้มเป็นกรดเพิ่มขึ้นพร้อมกับเวลาและพบว่า pH ของอาหารจะสเถียรได้ด้วยตนเองภายใน pH อยู่ในช่วง 4.6-4.9 ไม่ว่า pH เริ่มต้นจะมีค่าเท่าไหร่ก็ตาม (3.3-8.0) ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงสามารถอธิบายโดยการดูดซึมแหล่งของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยการดูดซึม NO_3^- ทำให้ pH เป็นด่าง ในขณะที่การดูดซึม NH_4^+ ไปใช้ มีผลให้ pH ของอาหารเปลี่ยนไปทางเป็นกรด (George, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับ Thorpe *et al.* (2008) พบว่า โดยทั่วไปการดูดซึมไอออนประจุลบ (anion) เกิดได้ดีในอาหารที่ pH เป็นกรด ขณะที่ไอออนประจุบวก (cation) เกิดได้ดีในอาหารที่มี pH เพิ่มขึ้น ความสัมพันธ์ของการดูดซึมไอออนประจุบวกและประจุลบของธาตุอาหารมีผลทำให้ pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงโดยพืชจะปลดปล่อยไอออน OH^- (hydroxyl) ออกมาเพื่อแลกเปลี่ยนไอออน NO_3^- ซึ่งมีผลทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีความเป็นด่างมากขึ้น ส่วน NH_4^+ (ammonium) ใช้สำหรับแลกเปลี่ยน proton (H^+) ทำให้อาหารเป็นกรดมากขึ้น

การทดลองที่ 1.2 ทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารและค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เมื่อนำค่าความแข็งของอาหารไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีระดับ pH ของอาหารแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.6) พบว่า กรรมวิธีที่อาหารมี pH 6.5 มีค่าความแข็งของอาหารโดยใช้แรงกดเฉลี่ย 14.540 นิวตัน ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากอาหารที่มี pH 7.0 (13.710 นิวตัน) โดยอาหารที่มี pH 4.0 และ 4.5 พบว่าอาหารมีลักษณะเหลวและมีความแข็งของอาหารโดยใช้แรงกดเฉลี่ยเพียง 0.088 และ 0.359 นิวตัน ตามลำดับ และอาหารที่มีระดับ pH 5.0 อาหารมีลักษณะ

กึ่งแข็งกึ่งเหลวและมีแรงกดเฉลี่ย 4.095 นิวตัน ส่วนอาหารที่มีระดับ pH ตั้งแต่ 5.5-6.0 และ 7.5 อาหารมีลักษณะเป็นของแข็ง มีค่าความแข็งของอาหารโดยใช้แรงกดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 11.183-12.469 นิวตัน

2. ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอาหารที่มี pH ของอาหารแตกต่างกัน พบว่า กรรมวิธีที่อาหารมี pH 4.0 มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ย 13.109 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกรรมวิธีที่อาหารมี pH 4.5 (13.023 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร) แต่แตกต่างจากกรรมวิธีที่มี pH 5.0-7.5 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 12.898-12.955 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร

ตารางที่ 4.6 ผลของระดับ pH ที่มีผลต่อความแข็งและค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระดับ pH ของอาหาร	ความแข็งของอาหาร (นิวตัน)	ค่าการนำไฟฟ้า (มิลลิซีเมนต์/เซนติเมตร)
5.8 (control)	12.469 bc	12.954 bc
4.0	0.088 e	13.109 a
4.5	0.359 e	13.023 ab
5.0	4.095 d	12.955 bc
5.5	11.455 c	12.950 bc
6.0	11.183 c	12.944 bc
6.5	14.540 a	12.910 bc
7.0	13.710 ab	12.898 c
7.5	11.884 c	12.911 bc
Mean	8.86	12.96
C.V. (%)	18.17	0.89
$LSD_{0.05}$	1.61	0.11

จากการทดลองที่ศึกษาระดับ pH ของอาหารที่มีผลต่อความแข็งและค่าการนำไฟฟ้าของอาหาร พบว่า ระดับ pH ของอาหารมีผลต่อค่าความแข็งของอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเห็นผลได้อย่างชัดเจนในอาหารที่มีระดับ pH ต่ำ (4.0-4.5) อาหารจะมีลักษณะเป็นของเหลว ส่วนอาหารที่ pH 5.0 อาหารเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะอ่อนนุ่ม ซึ่งเป็นผลมาจากสารประกอบอินทรีย์บางตัวของ

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกย่อยสลายโดยการนึ่งความดันของอาหารที่เป็นกรด โดยระดับการย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิดของวุ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Huang *et al.* (1995) ทำการศึกษาผลของส่วนประกอบพื้นฐานต่อความแข็งของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมโดย gelrite พบว่าความแข็งของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับระดับการรวมกันของธาตุอาหารหลักของอาหารสูตร MS ความเข้มข้นของน้ำตาล ระดับ pH ของอาหาร และความเข้มข้น gelrite โดยธาตุอาหารหลักของสูตรอาหาร MS เพิ่มความแข็งแรงของเจล gelrite ส่วน NH_4NO_3 มีผลทำให้ความแข็งแรงของเจลลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมโดยใช้ gelrite หรือวุ้น (agar) มีลักษณะอ่อนนุ่ม เมื่อมี pH ต่ำ และค่อนข้างแข็งเมื่อ pH สูง ส่วนผงถ่านและน้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol) ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลมากขึ้น ส่วนการศึกษาของ Cameron (2001) ได้ศึกษาการติดตั้งและการทำงานของเครื่องต้นแบบทดสอบความแข็งของเจล โดยทดสอบความแข็งของอาหาร 3 สูตร (half-strength Litvay, DCR, and Murashige and Skoog) ซึ่งเปรียบเทียบสารก่อให้เกิดเจล 2 ชนิด คือ agar และ gelrite ที่มีความเข้มข้นของ Ca ในระดับที่แตกต่างกัน โดยประเมินจากแรงกดสูงสุดเพื่อวัดค่าความแข็งของอาหาร พบว่า ความแข็งของอาหารทั้ง 3 สูตรมีลำดับดังนี้ DCR > ½ LM > MS โดยความเข้มข้นของ Ca มีผลต่อความแข็งแรงของ agar เล็กน้อย ส่วนอาหารที่ใช้ gelrite พบว่า อาหารที่มีความเข้มข้นของ Ca เพิ่มขึ้น แต่ความแข็งของหารกลับมีค่าลดลงซึ่งเป็นผลมาจากระดับความข้นของ Ca สูงจะส่งผลยับยั้งการเกิด gel hydration (Anonymous, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการทำให้เกิดเจลและความแข็งของอาหาร โดยอาหารที่ใช้ agar จะมีความแข็งลดลงในอาหารที่มี nitrate (Wetzstein *et al.*, 1994) และความแข็งแกร่งของอาหาร DCR, ½ LM และ MS จะแปรผกผันกับไอออนของ NO_3 ที่มีอยู่ในอาหาร และพบว่าอาหารที่ใช้ agar ความเข้มข้น 0.3 หรือ 0.5% จะไม่ก่อให้เกิดเจล ส่วนอาหารที่ใช้ gelrite เพื่อก่อให้เกิดเจลในอาหารจะไม่ได้รับผลกระทบจาก NO_3 แต่ได้รับผลกระทบโดยเฉพาะอย่างยิ่ง NH_4 ซึ่งมีผลทำให้ความแข็งของเจลลดลง (Huang *et al.*, 1995)

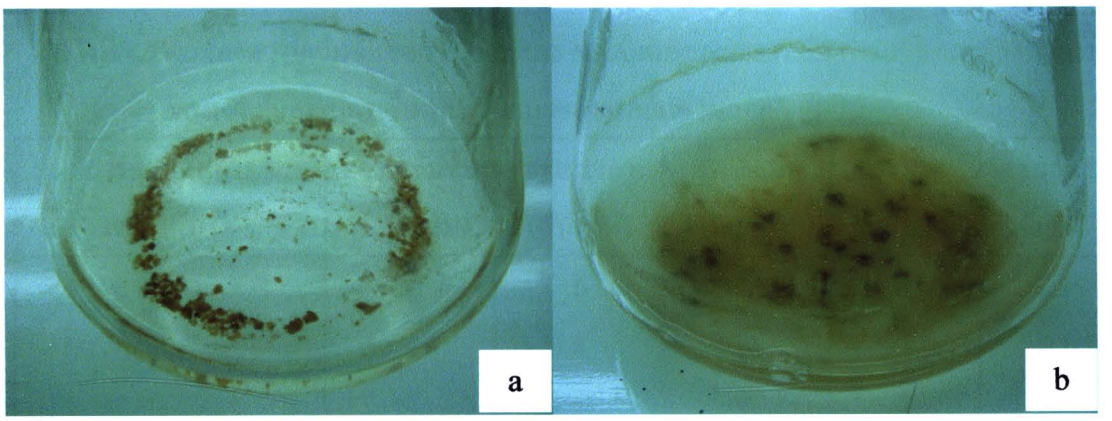
จากการทดลองค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการละลายของธาตุอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อแสดงถึงความเข้มข้นของเกลือทั้งหมดที่ละลายอยู่ในอาหาร ซึ่งเป็นค่าวัดโดยรวมไม่สามารถแยกบอกความเข้มข้นของเกลือแต่ละตัวได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่า อาหารที่มีระดับ pH ต่ำ (4.0-4.5) มีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่าจะดับ pH อื่นๆ ซึ่งการวัดค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขณะเริ่มต้นเพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ ที่ผ่านมา Shibli *et al.* (1999) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตจากตัวแปรที่ใช้วัดได้แก่ pHของอาหาร ออสโมลาริตี และค่าการนำไฟฟ้า ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นอาหารขยายเพิ่มจำนวนและอาหารที่ชักนำให้เกิดราก ในพืช 3 ชนิด คือ สาลี่

มันฝรั่งพันธุ์ spunta และอัลมอนด์ขม พบว่า หลังทำการเพาะเลี้ยงสาลี่ มันฝรั่งพันธุ์ spunta และอัลมอนด์ขม อาหารเพิ่มจำนวนและอาหารที่ชักนำให้เกิดราก ที่มี pH ของอาหารก่อนการเพาะเลี้ยง 5.8 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ ระดับ pH ของอาหารทั้ง 2 ชนิด(อาหารเพิ่มจำนวนและอาหารที่ชักนำให้เกิดราก) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับออสโมลาริตี ของอาหารทั้ง 2 ชนิดจะมีค่าลดลงเมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระยะเวลาในการเจริญเติบโต โดยการเพิ่มขึ้นของค่าการนำไฟฟ้ามีลักษณะเป็นกราฟชันและสูงขึ้นเมื่ออัลมอนด์ขมเจริญเติบโต เมื่อเปรียบกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมันฝรั่งพันธุ์ spunta และสาลี่ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าสูงกว่าการนำไฟฟ้าของอาหารเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นผลมาจากการสูญเสียน้ำและการสะสมของเกลือเพิ่มมากขึ้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของเกลือที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Pierik, 1987; Shibli *et al.*, 1992)

การทดลองที่ 2 การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็น somatic embryo โดยวิธีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุด จากอาหารเพาะเลี้ยงที่มี pH 6.0 ซึ่งปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนิยมใช้เซลล์ที่ได้จากแคลลัส เพราะเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย โดยนำแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ดัดแปลง ร่วมกับฮอร์โมนในกลุ่มของออกซินที่ใช้ คือ 2,4-D และ NAA ที่มีความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอต่อไป นำเซลล์แขวนลอยดังกล่าวเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ในสภาพมีแสง16 ชั่วโมง อุณหภูมิ ± 25 องศาเซลเซียส

การพัฒนาของ embryogenic callus ในอาหารเหลว ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงจะเป็นการปรับตัวของเนื้อเยื่อแคลลัส หลังจากนั้นมีการแยกตัวของกลุ่มเซลล์และเซลล์เดี่ยวๆ ออกมาสู่อาหารเหลวในระยะนี้มีทั้งเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ และก้อนแคลลัส โดยกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งสังเกตได้จากสีของอาหารเหลวมีลักษณะสีขุ่นขึ้น (ภาพที่ 4.6) ดังนั้นในช่วง 1 เดือนแรกจึงควรมีการเปลี่ยนอาหารทุกสัปดาห์



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสขณะเพาะเลี้ยงและหลังการเพาะเลี้ยง

a = ขณะเริ่มเพาะเลี้ยงในช่วงแรก

b = หลังการเพาะเลี้ยงอาหารเริ่มมีสีขุ่นขึ้น

หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA แตกต่างกัน พบว่า สูตรอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่น้อยที่สุดในการพัฒนาจาก embryogenic callus ไปเป็น embryo ระยะ globular รองลงมา คือ อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้นข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาในการพัฒนาเป็น embryo ในระยะ globular มากที่สุด 15 สัปดาห์ ส่วนเปอร์เซ็นการเกิดเอมบริโอระยะ globular พบว่า อาหารที่มี 2,4-D ความเข้นข้น 2 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดระยะ globular มากที่สุด คือ 49% รองลงมา คือ 2,4-D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเกิดราก พบว่า อาหารเหลวที่มี NAA ความเข้มทุกระดับๆ สามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยมีเปอร์เซ็นการเกิดราก 5-6% ส่วนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2-6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นการเกิดราก 1% ส่วนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่พบการเกิดราก นอกจากนี้ระหว่างการเพาะเลี้ยงยังพบว่าเซลล์ที่มีสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ 2,4-D และNAA ซึ่งอาหารเหลวที่มี 2,4-D และNAA ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายมากที่สุด 42% และ 37% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของ 2, 4-D และ NAA ต่อระยะเวลาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเซลล์แขวนลอย[1/]

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม)	ระยะเวลา (สัปดาห์)	Globular (%)	ราก (%)	เซลล์ตาย (%)
2,4-D	2	6	49	1	23
	4	8	46	1	23
	6	10	47	1	40
	8	15	49	0	42
NAA	2	10	47	6	10
	4	10	23	5	13
	6	10	34	5	24
	8	12	36	6	37

1/ ตัวเลขที่มิได้นำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างความแปรปรวนทางสถิติ

จากการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง embryogenic callus เพื่อพัฒนาไปเป็นเอมบริโอที่อยู่ในระยะ globular คือ อาหารสูตร LS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอที่อยู่ในระยะ globular มากที่สุด 49% และใช้เวลาในการพัฒนาน้อยที่สุด คือ 6 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kermanee (2004) ทำการศึกษากรเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในอาหาร 8 สูตร พบว่า ข้าวทั้ง 2 พันธุ์ประสบความสำเร็จในอาหาร N6 ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 หรือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยอาหารสูตรอื่นๆ พบว่าล้มเหลวในการทดลองโดยพบว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร NP1 NP3 หรือ MSP1 สามารถเกิดเซลล์เดี่ยวแต่ในเวลาต่อมาไม่พบการแบ่งเซลล์หรือการพัฒนาของเซลล์ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดลองของผู้วิจัยที่พบว่า อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มสูง 6-8 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 4-8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสเกิดเซลล์เดี่ยวแต่ในเวลาต่อมาไม่พบการแบ่งเซลล์หรือการพัฒนาของเซลล์ และกลายเป็นสีน้ำตาลภายในไม่กี่วัน ส่วนการทดลองของ Mariani *et al.* (1998) ศึกษาการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Nipponbare บนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายไปสู่อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายไปสู่อาหารที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่า ระยะการพัฒนาของ somatic embryo แบ่งเป็นระยะ

proembryo globular scutellar และ coleotilar ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการทดลองของผู้วิจัยที่พบว่า embryogenic callus จะมีการแบ่งเซลล์และก่อรูปร่างที่มีลักษณะกลม(ระยะ globular) ผิวเรียบเท่านั้น และบางส่วนมีการพัฒนาไปเป็นรากแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มของออกซินที่มีความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชสร้างรากได้ (สุริยันตร์ และคณะ, 2540)