

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการนำ **protocorm-like bodies** ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 6 เดือน นำมาทำการทดลองเพิ่มปริมาณ **Plbs** ของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

ผลการเพิ่มปริมาณ **protocorm-like bodies (plbs)** ของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง โดยวิธีการผ่าแบ่งเป็น ผ่าครึ่งตามขวาง และการผ่าครึ่งตามยาว

1. อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม

เมื่อนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงอายุ 6 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ผ่าตามแนวขวางและแนวยาว และเลี้ยงบนอาหารแข็งทั้ง 3 สูตร (VW , MS และ จิตราพรรณ) ผลปรากฏว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน บริเวณผิวหน้าของรอยแผลที่ถูกตัดของชิ้นส่วนโปรโตคอร์มเริ่มเกิดมีเซลล์เจริญขึ้นมาเป็นสีขาว และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อมานาน 15 วัน ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มบางชิ้นเริ่มสร้างโปรโตคอร์มใหม่เกิดขึ้น และมีบางชิ้นเริ่มมีสีน้ำตาลที่บริเวณรอยตัด

จากการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ทำให้โปรโตคอร์ม มีการเจริญเติบโตที่บริเวณรอยตัดทั้งแนวขวางและแนวยาว พบว่าโปรโตคอร์มและมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ สูตรอาหาร VW รองลงมาคือ MS และจิตราพรรณ ตามลำดับ (ดังตารางที่ 1)

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโปรโตคอร์มที่ผ่านการผ่าแบ่งนาน 6 สัปดาห์ ในด้านอัตราการรอดของโปรโตคอร์ม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อโปรโตคอร์มหลังจากผ่านกระบวนการแบ่งผ่าโปรโตคอร์ม และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆด้วย DMRT (Duncan's multiple range test) พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

จากการผ่าโปรโตคอร์มพบว่า การเกิดโปรโตคอร์มตามแนวขวาง (ส่วนด้านบนบนอาหารสูตร VW มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด ร้อยละ 65.71 (ภาพ 3A, 3B) รองลงมาเป็น การรอดชีวิตจากการผ่าตามแนวยาวคิดเป็นร้อยละ 56 (ภาพ 4C,4D) ส่วนชิ้นส่วนโปรโตคอร์มที่ตัดตามแนวขวางชิ้นส่วนด้านล่างมีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 48.57 (ภาพ 5E,5F) และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มใหม่ คือสูตร VW MS และจิตราพรรณ ตามลำดับ(ดังตารางที่1)

ตารางที่ 1

ค่าเฉลี่ยร้อยละของอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่ได้รับการผ่าตาม
แนวขวางและแนวยาวและเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์
แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

การทดลอง	สูตรอาหาร		
การผ่าโปรโตคอร์ม	VW	MS	จิตราพรรณ
การผ่าโปรโตคอร์มแนวขวาง			
(ส่วนด้านบน)	65.71 $\pm$ 0.384a	5.71 $\pm$ 0.384b	8.57 $\pm$ 0.384b
(ส่วนด้านล่าง)	48.57 $\pm$ 0.384b	2.86 $\pm$ 0.384b	5.71 $\pm$ 0.384b
การผ่าโปรโตคอร์มแนวยาว	56 $\pm$ 0.384ab	16 $\pm$ 0.384a	2 $\pm$ 0.384b
นัยสำคัญทางสถิติ	*	*	ns

ตัวเลขที่ตามด้วย a,b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

Duncan's multiple range test ที่ 0.05

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$

2. อัตราการเกิดโปรโตคอร์มใหม่

หลังจากนำเนื้อเยื่อโปรโตคอร์มที่ผ่าในแนวต่างๆ ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร คือ สูตร VW, MS และ จิตราพรรณ เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์มใหม่ จากการให้คะแนนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นใหม่ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดโปรโตคอร์มใหม่ให้เป็นคะแนน พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT (Duncan's multiple range test) พบว่าโปรโตคอร์มที่ถูกผ่าตามแนวขวางและแนวยาว และเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการใช้เทคนิคการผ่าโปรโตคอร์มตามแนวยาว ให้ค่าเฉลี่ยขนาดของโปรโตคอร์มใหม่เกิดขึ้นสูงที่สุดคือ 1.17 (ตารางที่ 2) รองลงมาคือ โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ใช้เทคนิคการผ่าโปรโตคอร์มตามแนวขวาง (ส่วนด้านบน) คือ 0.91 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2

แสดงคะแนนของโปรโตคอร์ที่ใหม่ในสูตรอาหารต่างๆ

หลังจากเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

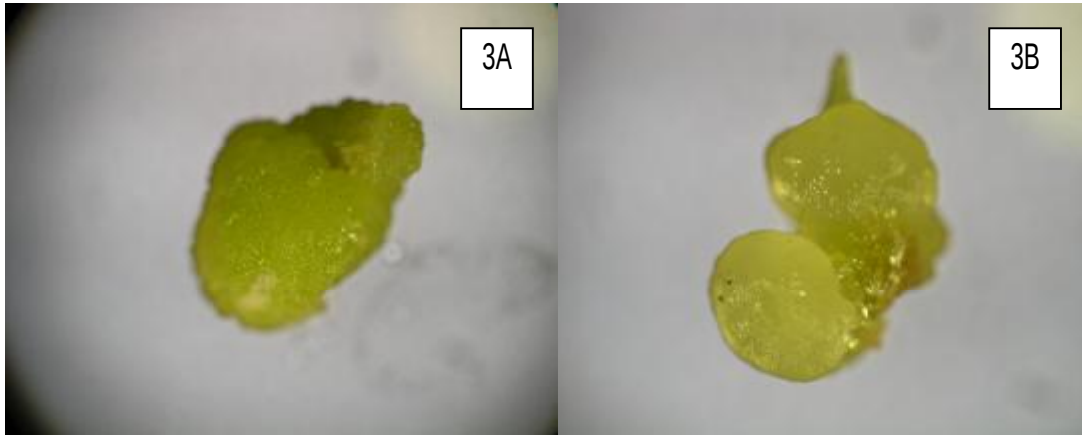
การทดลอง	สูตรอาหาร		
การผ่าโปรโตคอร์ม	VW ^{1/}	MS ^{1/}	จิตราพรรณ ^{1/}
การผ่าโปรโตคอร์มแนวขวาง			
(ส่วนด้านบน)	0.91 $\pm$ 0.64ab	0.057 $\pm$ 0.64b	0.086 $\pm$ 0.64a
(ส่วนด้านล่าง))	0.69 $\pm$ 0.64 ab	0.028 $\pm$ 0.64b	0.058 $\pm$ 0.64a
ผ่าตามยาว	1.17 $\pm$ 0.64ab	0.2 $\pm$ 0.64b	0.029 $\pm$ 0.64a
ชนิดของการผ่า	ns	ns	ns
ชนิดของอาหาร ^{1/}	*	*	*

ตัวเลขที่ตามด้วย a,b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

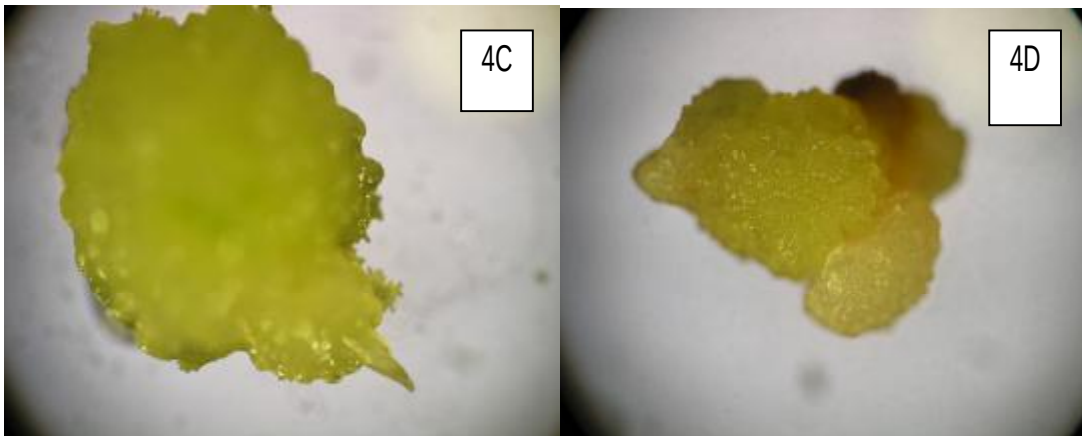
Duncan's multiple range test ที่ 0.05

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$

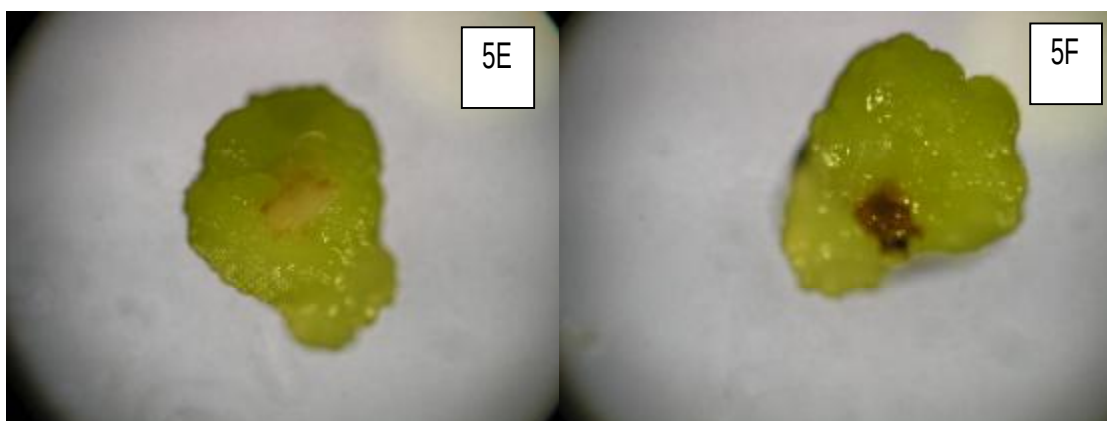
^{1/} เปรียบเทียบอัตราการเกิดโปรโตคอร์มในแต่ละชนิดอาหาร



ภาพที่ 3A,3B โปรโตคอร์รัมใหม่ที่เกิดจากการผ่าตามแนวขวาง(ส่วนบน) ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW



ภาพที่ 4C,4D โปรโตคอร์รัมใหม่ที่เกิดจากการผ่าตามแนวยาว ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW



ภาพที่ 5E,5F โปรโตคอร์รัมใหม่ที่เกิดจากการผ่าตามขวาง(ส่วนล่าง) ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบสารในกลุ่ม cytokinin 2 ชนิด คือ BA และ Kinetin

เมื่อนำโปรโตคอร์มที่ผ่าแบ่งตามยาวจากอาหารสูตร VW และเปรียบเทียบกับสารในกลุ่ม cytokinin 2 ชนิด คือ BA และ Kinetin ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและชักนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ให้เกิดเป็นต้นโดยนำโปรโตคอร์ม ที่ทำการผ่าตามยาว เพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มให้มากขึ้น โดยเติม BA หรือไคเนติน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มที่มีการพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนกล้วยไม้ เมื่อเปรียบระดับความเข้มข้นของ BA และไคเนตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า BA ให้ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตดีกว่าไคเนติน และ BA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด โปรโตคอร์มที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้วยไม้ได้สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไคเนตินก็ผลทำให้โปรโตคอร์มสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นและมีชีวิตรอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันที่ไคเนตินเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) และเมื่อย้ายโปรโตคอร์มทุก 4 สัปดาห์ ลงบนอาหารสูตรเดิม พบว่าหลังจากย้ายโปรโตคอร์มได้ 8 สัปดาห์ โปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโต งอกส่วนของยอดมีราก และใบเกิดขึ้น และหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนราก และใบที่งอกออกมา วัดขนาดความยาวของราก และใบได้ผลดังตารางที่ 4 จากตาราง เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนใบ และจำนวนรากที่เกิดขึ้นในแต่ละความเข้มข้น (0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลปรากฏว่าสารในกลุ่ม ไซโตไคนิน (BA และไคเนติน) ให้ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อวัดความยาวรากและความยาวใบ พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความยาวใบและความยาวรากด้วย DMRT ผลปรากฏว่า BA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากสูงที่สุด (7.2 และ 6.91 มิลลิเมตรตามลำดับ) ส่วนความยาวใบพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยความยาวใบสูงสุด (4.03 มิลลิเมตร) สูงกว่าสารละลาย BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 3

ค่าเฉลี่ยร้อยละของอัตราการรอดของโปรโตคอร์มที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต
แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

อัตราการรอดชีวิต (%)					
สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	0	0.5	1	1.5	2
BA	60±1.00b	90±1.00a	80±0.67b	75±0.58b	100±0.33a
Kinetin		60±0.58b	66.67±1.00b	100±1.15a	75±0.58b
นัยสำคัญทางสถิติ		*	ns	*	*

ตัวเลขที่ตามด้วย a,b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

Duncan's multiple range test ที่ 0.05

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4

ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต
ในอาหารสูตร VW แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

สารควบคุมการ เจริญเติบโต	จำนวนใบ (ใบ)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (mm)	ความยาวใบ (mm)
Control มก./ล	1.2 $\pm$ 0.58a	0.8 $\pm$ 0.20a	2.4 $\pm$ 0.81 c	2.6 $\pm$ 0.69 b
BA 0.5 มก./ล	2 $\pm$ 0.95a	1 $\pm$ 1.00a	7.2 $\pm$ 2.01 a	3 $\pm$ 0.7 b
BA 1 มก./ล	0.64 $\pm$ 0.60a	0.36 $\pm$ 0.00a	1.92 $\pm$ 0.00 c	1.12 $\pm$ 0.5 1 c
BA 1.5 มก./ล	0.77 $\pm$ 0.92a	0.43 $\pm$ 1.00a	2.30 $\pm$ 0.71 c	1.3 $\pm$ 0.42 c
BA 2 มก./ล	2.30 $\pm$ 0.25a	1.3 $\pm$ 0.80a	6.91 $\pm$ 1.39 a	4.03 $\pm$ 0.80 a
ไคเนติน 0.5 มก./ล	1.38 $\pm$ 1.03a	0.78 $\pm$ 0.40a	4.14 $\pm$ 0.87 b	2.42 $\pm$ 0.51 b
ไคเนติน 1 มก./ล	1.42 $\pm$ 0.80a	0.78 $\pm$ 0.60a	4.50 $\pm$ 0.60 b	2.38 $\pm$ 0.54 b
ไคเนติน 1.5 มก./ล	1.30 $\pm$ 1.17a	0.73 $\pm$ 0.40a	3.96 $\pm$ 0.58 b	2.256 $\pm$ 0.40 b
ไคเนติน 2 มก./ล	1.44 $\pm$ 0.60a	0.80 $\pm$ 0.40a	4.36 $\pm$ 0.63 b	2.49 $\pm$ 0.6 b
นัยสำคัญทางสถิติ	ns	ns	*	*

ตัวเลขที่ตามด้วย a,b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

Duncan's multiple range test ที่ 0.05

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ศึกษาความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สาร โคลชิซีน(colchicine) กับ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

1. อัตราการรอด

นำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง อายุ 6 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร และโปรโตคอร์มที่ได้ทำการผ่าตามขวางมาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับสารโคลชิซีน ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่โปรโตคอร์มเป็นระยะเวลาต่างกันคือ 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน จากนั้นย้ายลงไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง โดยเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลานาน 30 วัน ปรากฏว่าหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์ม นาน 2 สัปดาห์ โปรโตคอร์มที่ได้ทำการผ่าตามแนวยาวพบว่าบริเวณรอยแผลเซลล์เกิดการเปลี่ยนเป็นสีขาวและเมื่อทำการย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับกล้วยบด 100 กรัม น้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัม และถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัม นาน 1 สัปดาห์ ปรากฏว่าบริเวณแผลของโปรโตคอร์มที่ได้ทำการผ่าตามแนวยาวเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลขึ้นและขึ้นโปรโตคอร์มเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้นทุกทรีทเมนต์ เมื่อเลี้ยงต่อไปอีกจนครบ 4 สัปดาห์ โปรโตคอร์มเกิดเป็นสีน้ำตาลตลอดทั้งชิ้น และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น

โปรโตคอร์มปกติที่ไม่ได้ทำการผ่าเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับกล้วยบด 100 กรัม น้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัม และถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาที่ทำการแช่โปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร VW ร่วมกับโคลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเวลาที่แช่ต่างกัน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยได้ด้วย DMRT พบว่า ที่ความเข้มข้น 2% แช่เป็นเวลานาน 1 วัน มีอัตราการรอดมากที่สุดเป็นร้อยละ 96 แต่เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโคลชิซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ และแช่โปรโตคอร์มเป็นเวลา 1 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อทำการแช่นานวัน จะทำให้โปรโตคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตต่ำลงโดยเฉพาะโปรโตคอร์มที่แช่โคลชิซีนเข้มข้น 2 % นาน 9 วัน จะมีอัตราการรอดต่ำสุด (คิดเป็นร้อยละ 60)

ตารางที่ 5

ค่าเฉลี่ยร้อยละของอัตราการรอดของโปรโตคอร์มที่ได้รับสารโคลชิซิน เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน
บนอาหารสูตร VW แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

โคลชิซิน ความเข้มข้น (%)	ระยะเวลาการแช่ในสารละลายโคลชิซิน(วัน)				
	1	3	5	7	9
0.1	94 $\pm$ 0.16a	92 $\pm$ 0.16a	94 $\pm$ 0.16a	92 $\pm$ 0.16a	80 $\pm$ 0.16b
0.5	94 $\pm$ 0.16a	78 $\pm$ 0.16b	86 $\pm$ 0.16a	90 $\pm$ 0.16a	86 $\pm$ 0.16a
1	84 $\pm$ 0.16a	86 $\pm$ 0.16a	76 $\pm$ 0.16b	82 $\pm$ 0.16b	72 $\pm$ 0.16b
2	96 $\pm$ 0.16a	74 $\pm$ 0.16b	64 $\pm$ 0.16b	70 $\pm$ 0.16b	60 $\pm$ 0.16b
นัยสำคัญทางสถิติ	ns	*	*	*	*

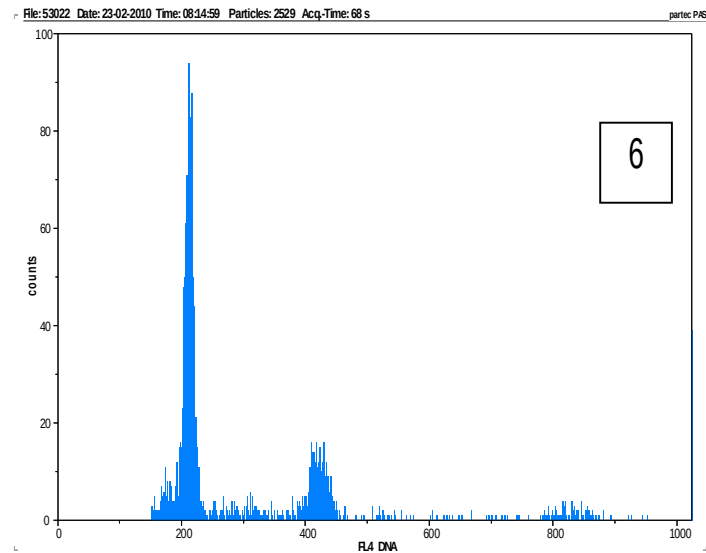
ตัวเลขที่ตามด้วย a,b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

Duncan's multiple range test ที่ 0.05

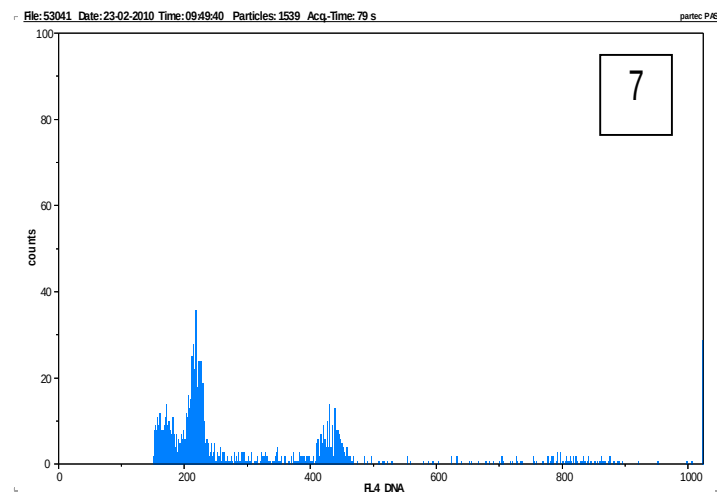
* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่เจริญมาจากโปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างกัน โดยวัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง **flow cytometer** ดังแสดงในภาพที่ 6 แสดงถึง ต้นกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่มีจำนวนโครโมโซม $2n$ และ ปริมาณดีเอ็นเอของต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์มี **peak** สูงสุดที่ตำแหน่ง 200 และ ภาพที่ 7 แสดงปริมาณ ดีเอ็นเอ ของต้นที่มีจำนวนโครโมโซมยังคงเป็น $2n$ ซึ่งมี **peak** สูงสุดที่ตำแหน่ง 400 สูงขึ้นบ้าง(แต่น้อยกว่าตำแหน่ง 200) และเป็นต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 2 % เป็นเวลานาน 9 วัน



ภาพที่ 6 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่พลอยได้จากต้นควบคุมที่ได้จากการใช้เครื่อง flow cytometer



ภาพ 7 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่พลอยได้จากต้นอ่อนที่ได้รับโคลชิซินที่ความเข้มข้น 2% แช่นาน 9 วัน ที่ได้จากการใช้เครื่อง flow cytometer

6. สันฐานวิทยา ของใบต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

จากการศึกษาถึงจำนวนของเซลล์คุม(guard cell) บนท้องใบ (lower epidermis) ของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ที่ได้รับสาร โคเลซิทิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลปรากฏว่า ในต้นที่ไม่ได้รับสารโคเลซิทิน (control) เมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์คุม มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5 ± 0.16 เซลล์ ส่วนที่ได้รับโคเลซิทินที่ความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาในการแช่โปรโตคอร์มมีผลทำให้จำนวนเซลล์คุมเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วย DMRT พบว่า โปรโตคอร์มที่แช่ในโคเลซิทินความเข้มข้น 0.5% นาน 1 วันมีจำนวนเซลล์คุมเฉลี่ยมากที่สุดคือ 23.67 เซลล์ (ตารางที่ 5) ขนาดของ เซลล์คุม (guard cell) บนท้องใบของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง (lower epidermis) ที่ได้รับโคเลซิทิน เข้มข้น 1% นาน 5 วัน จะมีความยาวเฉลี่ย $40.49 \mu\text{m}$ และ ความกว้างเฉลี่ย $43.96 \mu\text{m}$ นอกจากนี้ลักษณะของเซลล์คุมจากใบของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงจากโปรโตคอร์มที่ได้รับสารโคเลซิทิน มีความแตกต่างจากต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ที่ไม่ได้รับสารโคเลซิทิน คือ ลักษณะ เซลล์คุม ทั้งสองข้างไม่สมมาตรกัน ลักษณะของเซลล์รอบๆบริเวณเซลล์คุม(subsidiary cell)มีลักษณะและจำนวนแตกต่างกันออกไป(ภาพที่ 12-18)

ตารางที่ 6

แสดงจำนวนค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คุมด้านท้องใบของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่เจริญมาจาก
โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินระดับเข้มข้นต่างๆและแช่ในเวลาต่างกันต่อพื้นที่ $380\mu\text{m}^2$
แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

โคลชิซิน ความ เข้มข้น (%)	ระยะเวลา(วัน)					
	0	1	3	5	7	9
0.1	5 $\pm$ 0.16a	13.25 $\pm$ 0.16b	15.25 $\pm$ 0.16b	22 $\pm$ 0.16a	13.25 $\pm$ 0.16b	16.25 $\pm$ 0.16a
0.5	5 $\pm$ 0.16a	23.67 $\pm$ 0.16a	18.2 $\pm$ 0.16ab	13.67 $\pm$ 0.16b	10.75 $\pm$ 0.16b	16.67 $\pm$ 0.16a
1	5 $\pm$ 0.16a	8.8 $\pm$ 0.16c	20.4 $\pm$ 0.16a	19.4 $\pm$ 0.16b	21 $\pm$ 0.16a	15.67 $\pm$ 0.16a
2	5 $\pm$ 0.16a	4.5 $\pm$ 0.16c	5.7 $\pm$ 0.16c	6 $\pm$ 0.16c	13.6 $\pm$ 0.16b	14 $\pm$ 0.16a
นัยสำคัญทางสถิติ	ns	*	*	*	*	ns

ตัวเลขที่ตามด้วย a,b,c ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

Duncan's multiple range test ที่ 0.05

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$

ในขณะที่เดียวกันใบอ่อนจากต้นกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ที่ได้รับสารโคลชิซิน และแช่ในเวลา ที่แตกต่างกันผลปรากฏว่ามีลักษณะที่แตกต่างกัน ในด้านความยาว ความกว้างของเซลล์คุม ซึ่ง โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 1% นาน 5 วัน มีขนาดความยาวของเซลล์คุม มากที่สุด คือ 40.49 ± 0.64550 รองลงมาคือ โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 1% นาน 7 วัน 36.63 ± 0.28868 และที่โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 1% นาน 7 วัน มีขนาดความกว้างของ เซลล์คุมมากที่สุด คือ 45.25 ± 0.28868 รองลงมาคือ โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 1% นาน 1 วัน 43.96 ± 0.47871 และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ยังพบว่า มีกลุ่มของผลึกรูปเข็ม ซึ่ง โปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 1% นาน 9 วัน และ ซึ่งโปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 2% นาน 3 วัน มีจำนวนผลึกมากที่สุด 5.66 ชิ้น (ภาพที่ 19) เกิดขึ้นบนด้านท้องใบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบเซลล์ยืด ยาวออกมาคล้ายกับขนสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งโปรโตคอร์มที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 0.5% นาน 7 วัน มี จำนวนขนมากที่สุด คือ 4 เส้น ต่อพื้นที่ $380 \mu\text{m}^2$ (ภาพที่ 20) จำนวนเส้นขนแตกต่างกันตาม ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน และระยะเวลาในการแช่อีกด้วย (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7

ค่าเฉลี่ยความยาวและความกว้างของเซลล์คุม รวมทั้งค่าเฉลี่ยของกลุ่มผลึกและจำนวนเส้นขนที่ปรากฏบนท้องใบของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่เจริญบนอาหารสูตร VW และได้รับสารโคลชิซิน แสดงค่าเฉลี่ยโดย $\pm$ SD.

ทริตเมนต์	ความยาว(μ m)	ความกว้าง(μ m)	ผลึก	จำนวนขน
Control	30.16 $\pm$ 1.10868bcde	38.46 $\pm$.70711cdefg	-	-
0.1% 1 วัน	32.05 $\pm$ 0.40825bcde	34.97 $\pm$.40825bcde	3	-
0.1% 3 วัน	28.49 $\pm$ 1.19024bc	34.4 $\pm$.81650bcde	2	-
0.1% 5 วัน	28.49 $\pm$ 0.64550bc	33.44 $\pm$.28868bc	2.33	-
0.1% 7 วัน	28.49 $\pm$ 0.64550bc	34.97 $\pm$.70711bcde	2.66	-
0.1% 9 วัน	28.49 $\pm$ 0.64550bc	34.19 $\pm$.47871bcd	3	-
0.5% 1 วัน	35.78 $\pm$ 0.47871def	37.52 $\pm$.25000bcdef	3.33	-
0.5% 3 วัน	32.05 $\pm$ 0.70711bcde	35.79 $\pm$.25000bcde	5.33	2.33
0.5% 5 วัน	27.97 $\pm$ 0.47871bc	34.19 $\pm$.47871bcd	2.66	-
0.5% 7 วัน	33.44 $\pm$ 0.95743cdef	40.49 $\pm$.28868efg	-	4
0.5% 9 วัน	31.4 $\pm$ 1.03078bcde	32.73 $\pm$.85391b	2.66	1.66
1% 1 วัน	22.62 $\pm$ 1.08012a	43.96 $\pm$.47871fg	-	-
1% 3 วัน	29.59 $\pm$ 0.57735bcd	27.47 $\pm$.91287a	3.33	3
1% 5 วัน	40.49 $\pm$ 0.64550e	35.78 $\pm$.47871bcde	-	-
1% 7 วัน	36.63 $\pm$ 0.28868ef	45.25 $\pm$.28868g	3	2.66
1% 9 วัน	32.73 $\pm$ 0.25000bcdef	39.45 $\pm$.25000defg	5.66	2.33
2% 1 วัน	32.73 $\pm$ 0.75000bcdef	34.19 $\pm$.25000bcd	4.66	1.66
2% 3 วัน	35.79 $\pm$ 0.47871def	40.48 $\pm$.28868efg	5.66	2
2% 5 วัน	29.59 $\pm$ 0.40825bcd	33.45 $\pm$.28868bc	4.66	2.5
2% 7 วัน	27.47 $\pm$ 0.70711b	34.19 $\pm$.62915bcd	5	1
2% 9 วัน	27.47 $\pm$ 0.70711b	33.45 $\pm$.28868bc	3	-

นัยสำคัญทางสถิติ

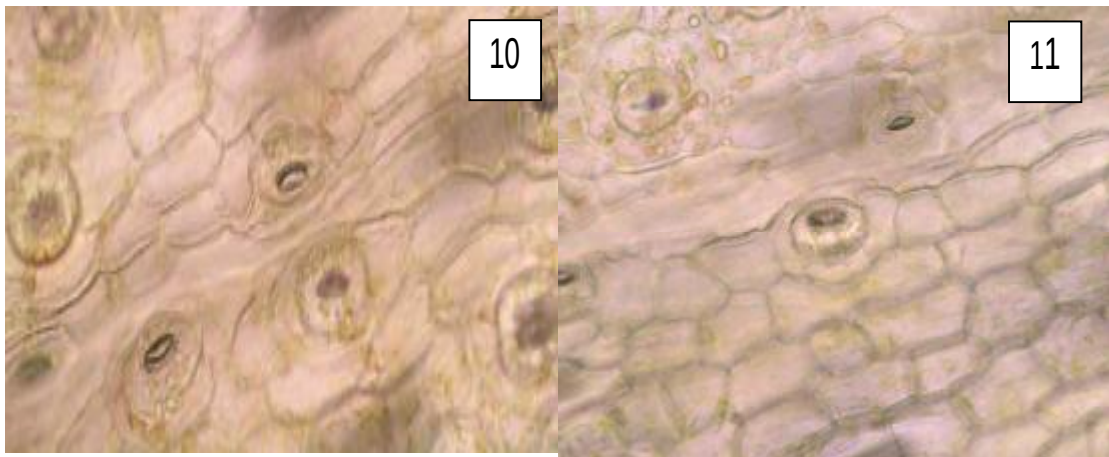
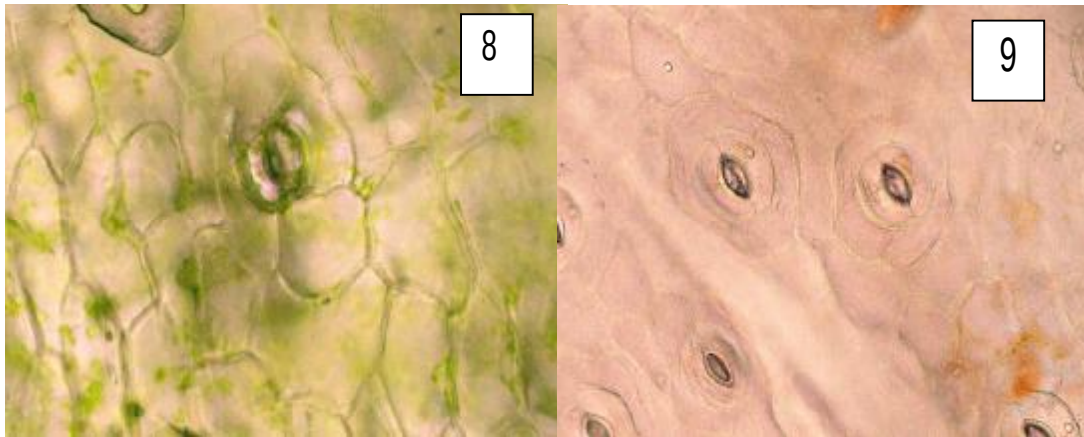
*

*

ตัวเลขที่ตามด้วย a,b,c,d,e,f,g ที่แตกต่างกันในคอลัมน์มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี

Duncan's multiple range test ที่ 0.05

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$

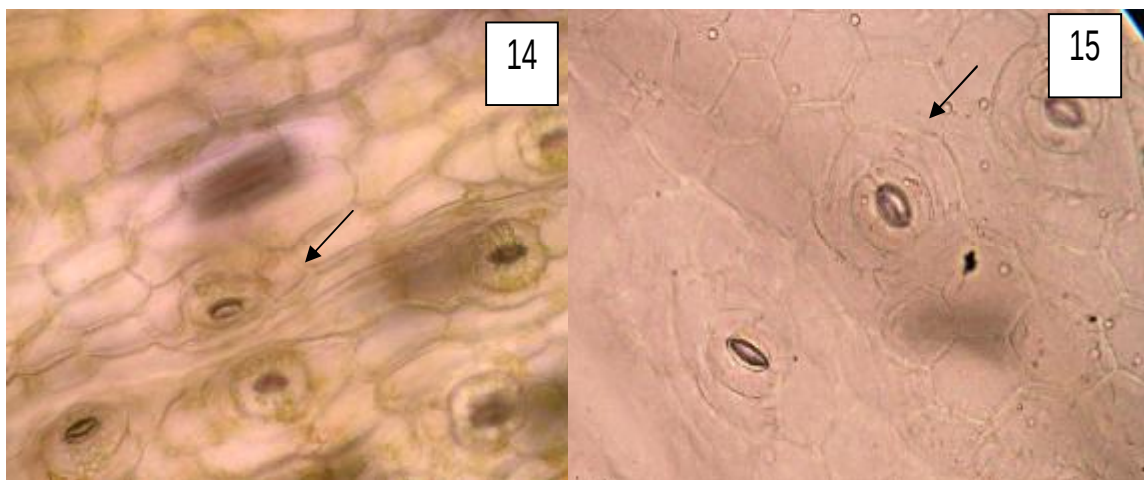
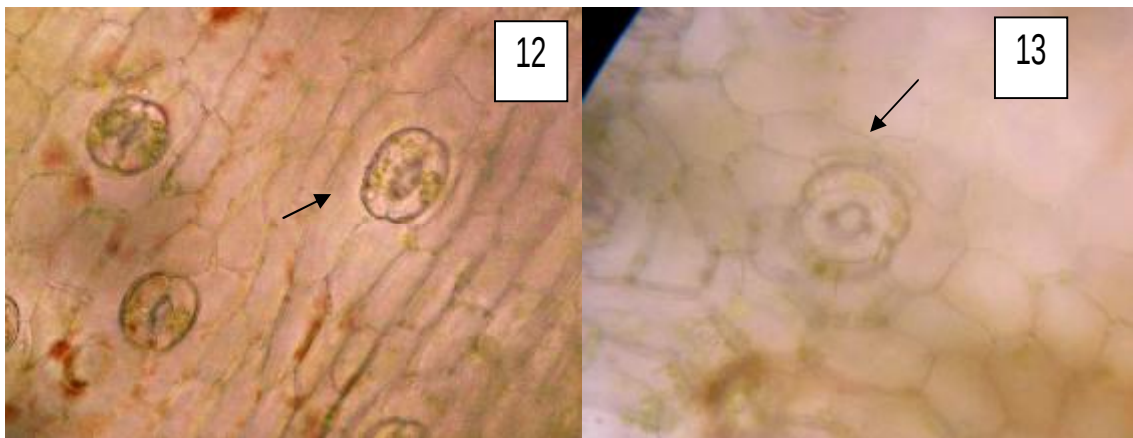


ภาพ 8 แสดงปากใบของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน(ตัวควบคุม)
ที่กำลังขยาย 40X

ภาพ 9 ปากใบของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น0.1%นาน 3 วัน

ภาพ10 ปากใบของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น0.1%นาน 7 วัน

ภาพ11 ปากใบของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น1% นาน 1 วัน

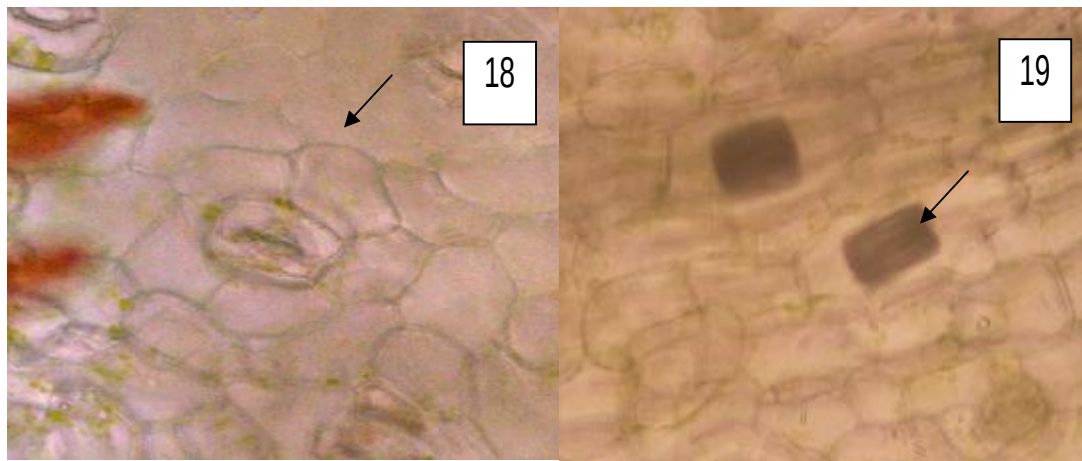
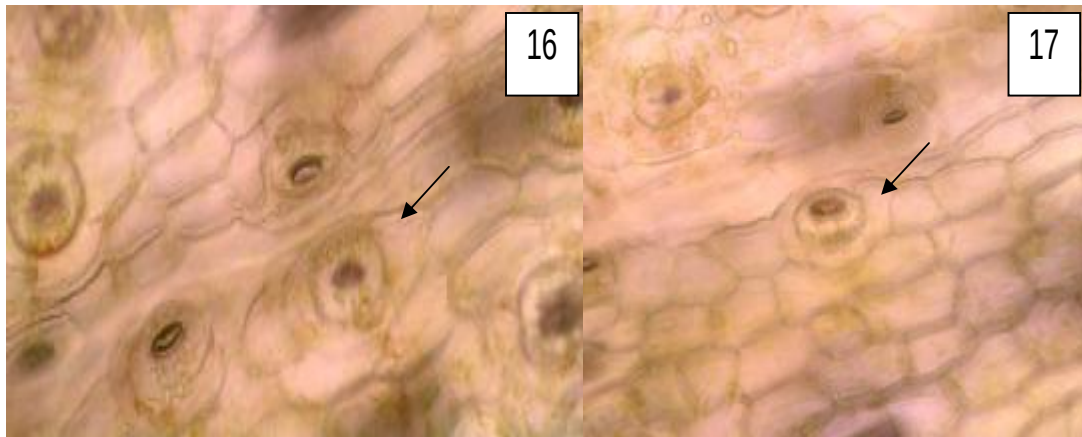


ภาพที่ 12 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยหลายเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาว

ภาพที่ 13 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยหลายเซลล์มีรูปร่างคล้ายกลีบดอกไม้

ภาพที่ 14 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยหลายเซลล์ และลักษณะของเซลล์คุมที่ไม่สมมาตร

ภาพที่ 15 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยหลายเซลล์ที่มีลักษณะปลายเซลล์คล้ายจั่วสามเหลี่ยม

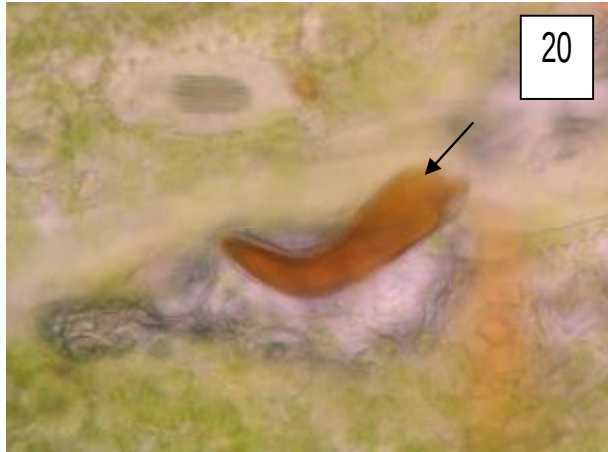


ภาพที่ 16 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยหลายเซลล์ที่มีลักษณะแตกต่างกันที่
อยู่บนบริเวณใกล้เคียงกัน และลักษณะเซลล์คุมที่ไม่สมมาตร

ภาพที่ 17 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยเซลล์ที่รวมตัวเป็นเซลล์เดี่ยว และ
ลักษณะเซลล์คุมที่ไม่สมมาตร

ภาพที่ 18 แสดงถึงเซลล์บริเวณรอบๆ เซลล์คุมประกอบด้วยหลายเซลล์ลักษณะคล้ายกลีบดอกไม้

ภาพที่ 19 แสดงถึงลักษณะของผลึกที่พบภายในเซลล์



ภาพที่ 20 แสดงถึงลักษณะของเส้นขนที่พบภายในเซลล์

7. กายวิภาควิทยาของรากต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

จากการทำการตัดตามขวาง (free hand x-section) รากของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินและไม่ได้รับ ผลปรากฏว่า โคลชิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาในการแช่โปรโตคอรึมมีผลทำให้ ลักษณะทางสรีรวิทยาของรากกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงมีความแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 8) คือ จำนวนของชั้นของ velamen ลักษณะของ Exodermis U-thickened จำนวนชั้น cortex ลักษณะของท่อลำเลียงน้ำและอาหาร(vascular cylinder) และ ลักษณะของ Endodermis O-thickened มีความแตกต่างกัน(ภาพที่ 21-24)

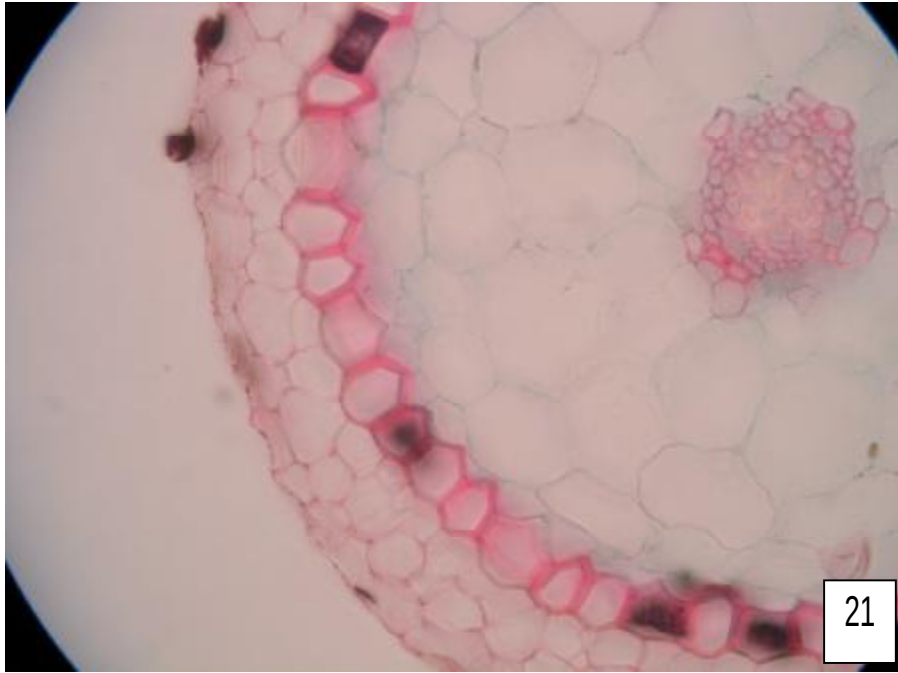
ตารางที่ 8

แสดงลักษณะทางกายวิภาคของรากกล้วยไม้เลี้ยงในหลอดน้ำที่มีความแตกต่างกันออกไป

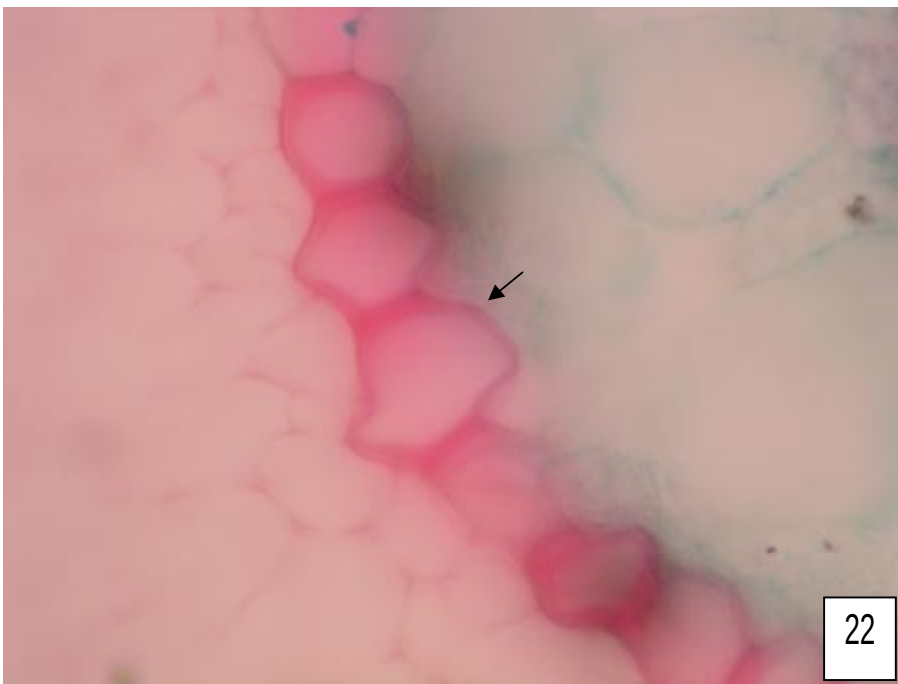
ทริตเมนต์	จำนวนของ ชั้น velamen	ลักษณะของ Exodermis U-thicknend	จำนวน ชั้น cortex	ลักษณะของ Endodermis O-thicknend	Vascular cylinder
Control	3	+	4	+	4
0.1%1 วัน	3	+	3	+	4
0.1%3 วัน	4	+	4	+	2
0.1%5 วัน	2	+	4	+	4
0.1%7 วัน	4	+	3	+	4
0.1%9 วัน	2	+	3	+	4
0.5%1 วัน	2	+	3	+	3
0.5%3 วัน	3	+	3	+	1
0.5%5 วัน	3	+	3	+	5
0.5%7 วัน	3	+	3	+	4
0.5%9 วัน	2	+	3	+	2
1% 1 วัน	3	+	3	+	4
1% 3 วัน	3	+	3	+	5
1% 5 วัน	3	+	3	+	5
1% 7 วัน	3	-	3	-	4
1% 9 วัน	3	-	2	+	4
2% 1 วัน	2	+	3	-	5
2% 3 วัน	3	-	3	+	4
2% 5 วัน	2	+	2	-	-
2% 7 วัน	5	-	3	+	4
2% 9 วัน	2	-	3	+	4

* - = Exodermis ไม่เป็นU-thicknend, Endodermis, ไม่เป็นO-thicknend, Vascular cylinder ไม่มีแตก

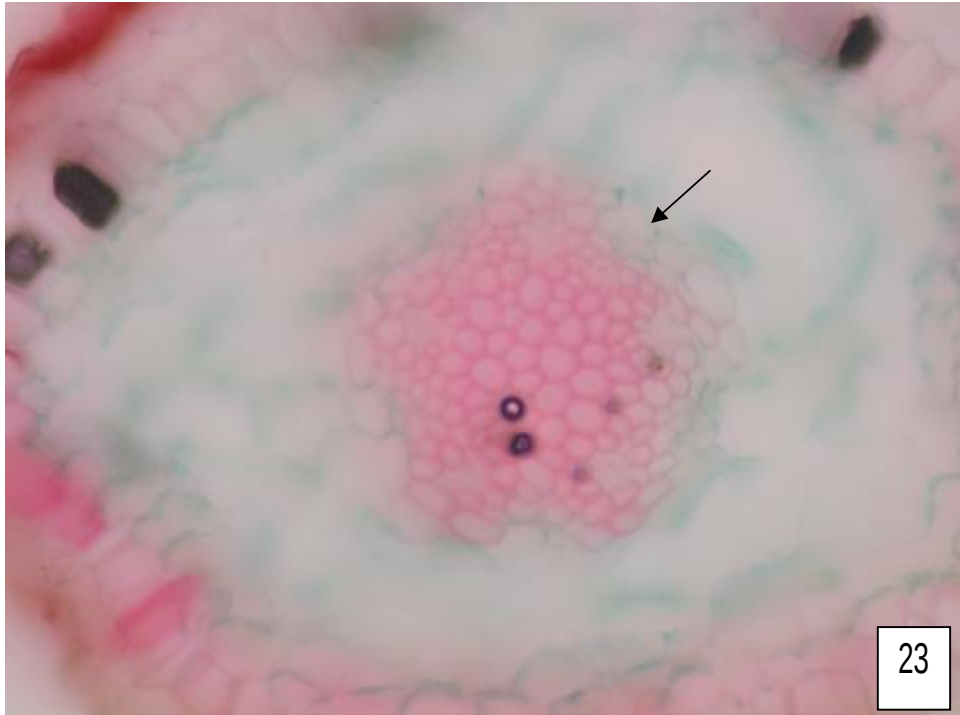
* + = เป็นExodermis U-thicknend, Endodermis, เป็นO-thicknend, Vascular cylinder มีแตก(จำนวนแตก)



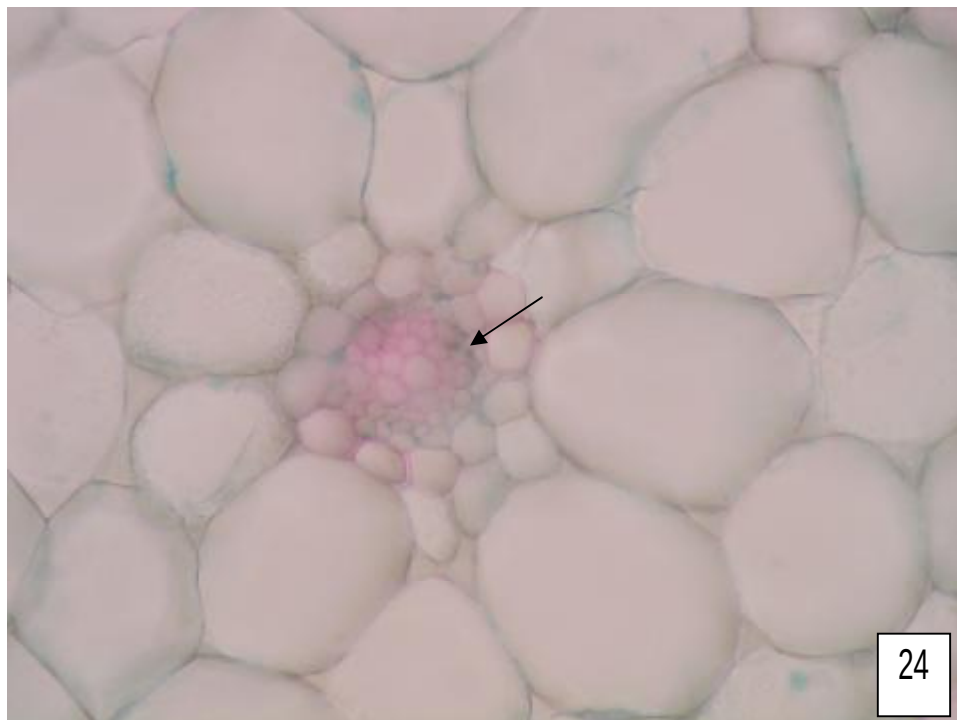
ภาพที่ 21 ลักษณะของvelamen layer, exodermis U-thickened, endodermis O-thickened และ vascular cylinder รากกล้วยไม้เชื้อเงินหลวง(control)



ภาพที่ 22 ลักษณะของ exodermis ที่ไม่เป็น U-thickened ของรากกล้วยไม้เชื้อเงินหลวงที่ได้รับ โคลชิซินเข้มข้น 1% นาน 9 วัน



ภาพที่ 23 ลักษณะของ endodermis ที่ไม่เป็น O-thickend ของรากกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับโคลชิซินเข้มข้น 2% นาน 1 วัน



ภาพที่ 24 ลักษณะของ vascular cylinder ที่ไม่เป็นแหก และ endodermis O-thickend ของรากกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับ โคลชิซินเข้มข้น 2% นาน 5 วัน