

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเตรียมโคโคซาน

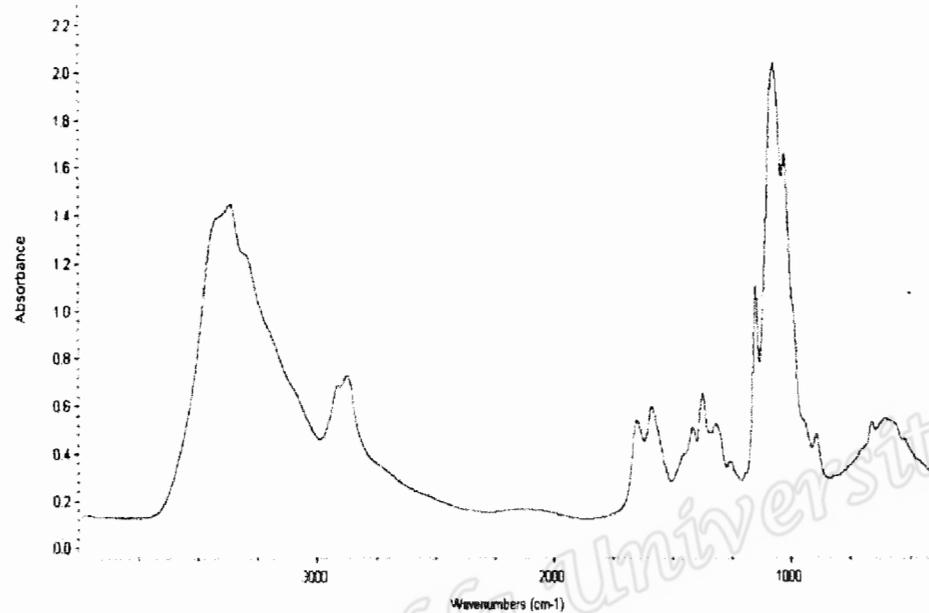
การเตรียมโคโคซานจากแกนหมึก โดยดัดแปลงจากวิธีของ Alimunair และ Zainuddin (1992) โดยตัวอย่างแกนหมึกสดนำมาจากบริษัทเทพพิทักษ์ จำกัด จังหวัดปัตตานี สามารถเตรียมโคโคซานได้ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลักษณะแกนหมึกเป็นแผ่นวงรี ยาว มีสีขาวขุ่นเนื่องจากมีไขมันและโปรตีนติดอยู่ เมื่อนำมาผ่านกระบวนการเปลี่ยนเป็น โคตินแล้วจะมีลักษณะขาว ใสขึ้นกว่าตอนที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทางเคมี และเมื่อผ่านกระบวนการเปลี่ยนโคตินเป็นโคโคซาน จะมีขนาดเล็กลง สีขาวมากขึ้น เมื่อนำไปตากแดดจะมีการหดเล็กลง ลักษณะเหนียว แข็ง มีสีขาวขุ่น (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ลักษณะของโคโคซานที่เตรียมได้จากแกนหมึก

การตรวจวัดระดับการกำจัดหมู่อะซีติล โดยวิธี IR spectrometer เป็นการตรวจดูความบริสุทธิ์ของโคโคซานที่เตรียมได้ว่ามีกำจัดหมู่อะซีติล ออกจากโคตินได้มากน้อยเท่าใด โดยนำโคโคซานที่เตรียมได้มา Insolubilized ที่ pH 0.6 และเตรียมพร้อมกับ KBr ในปริมาณโคโคซาน 40 มก. ต่อปริมาณ KBr 120 มก. วัดค่า %DD โดย Intergrated intensity ของการดูดกลืนที่ 1655 cm^{-1} และ 3450 cm^{-1} กำหนดหา % Deacetylation หาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคที่ wave number A_{1655}/A_{3450}

หลังจากนั้นหา % N-acetylation $A_{1655}/A_{3450} \times 115$ และหาค่า $\% \text{ N-deacetylation} = 100 - (A_{1655}/A_{3450} \times 115)$ จะได้อินฟราเรดสเปกตรัมของโคโตซาน (รูปที่ 3)



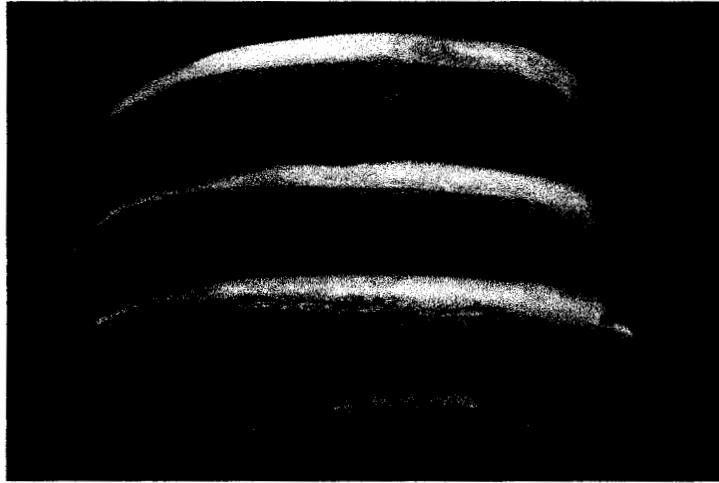
รูปที่ 3 อินฟราเรดสเปกตรัมของโคโตซาน

ที่เลขคลื่นประมาณ 1655 cm^{-1} แสดงแถบดูดกลืนจากการยืดของพันธะ C=O ในหมู่อะเซตาไมด์ และเลขคลื่นประมาณ 3450 cm^{-1} แสดงแถบดูดกลืนจากการยืดของพันธะ -NH_2 เมื่อคำนวณค่า N-deacetylation มีค่า 56%

2. ความเข้มข้นของโคโตซานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน

2.1 ผลการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน

เมื่อนำฝักกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนอายุ 7 เดือนหลังการผสมเกสร (รูปที่ 4) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95 % และเพาะเมล็ดลงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดกล้วยไม้มีการเจริญเติบโตเป็นโพโทคอร์ม มีลักษณะเป็นก้อนกลม มีสีเขียว ปลายแหลม เกิดยอดแหลมของโพโทคอร์ม ซึ่งมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot meristem) และช่อดอก (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ฝักกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน อายุ 7 เดือนหลังการผสมเกสร



รูปที่ 5 โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW วางเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

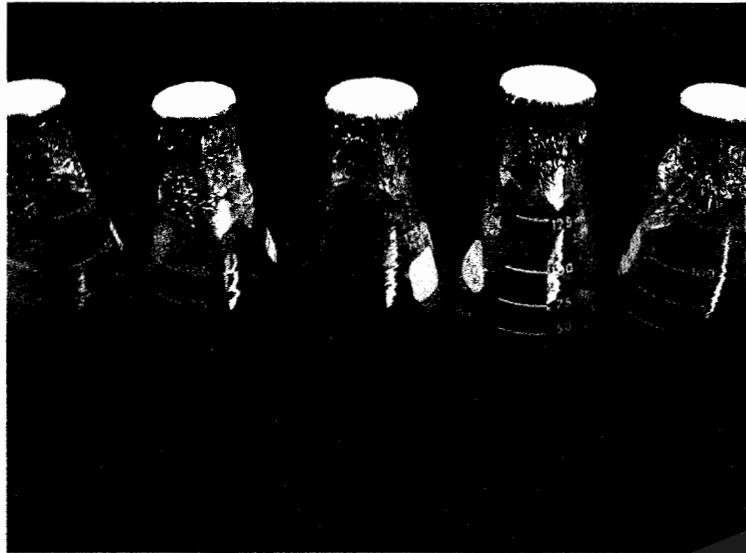
2.2 ความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน เมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว

นำโพรโทคอร์มที่เจริญเติบโตตามข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ซึ่งเติมไคโตซานที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติมไคโตซาน พบว่าไคโตซานที่เติมลงไปในการอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของโพรโทคอร์มใน

กล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน โดยทำให้โพรโทคอร์มมีการเจริญเติบโตมากขึ้น โดยมีน้ำหนักและลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปดังตารางที่ 1 พบว่าไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของโพรโทคอร์มเพิ่มขึ้นมากที่สุด ลักษณะทางกายภาพของโพรโทคอร์ม ดังรูปที่ 6 อย่างไรก็ตามเมื่อให้ความเข้มข้นของไคโตซานมากขึ้น โพรโทคอร์มจะเจริญเติบโตไม่ค่อยดี และโพรโทคอร์มจะมีสีเหลืองมากขึ้นและตายบางส่วน

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของไคโตซานต่อการเพิ่มน้ำหนักสดของ โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของไคโตซาน (มก./ล.)	น้ำหนักสด (กรัม)	ลักษณะทางกายภาพของโพรโทคอร์ม
0	0.61	-มีสีเขียว
5	0.63	-มีสีเขียว มีรูปร่างบิดเบี้ยวไปจากปกติ
10	0.65	-มีการพัฒนามากขึ้น รูปร่างบิดเบี้ยว สีเขียว
15	0.67	-มีการแบ่งเซลล์ มีลักษณะเป็นก้อนเล็ก ๆ สีเขียวเกิดขึ้นรอบ ๆ โพรโทคอร์มเดิม
20	0.65	-มีขนาดใหญ่ขึ้น สีของโพรโทคอร์มเริ่มเหลือง
25	0.65	-โพรโทคอร์มเปลี่ยนจากสีเขียวสดเป็นซีดและเหลืองมากขึ้น



รูปที่ 6 โพรโทคอร์มกล้วยไม้เขากวางอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมโคโคซานความเข้มข้นต่าง ๆ วางเลี้ยงในสภาพ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เขย่าเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
โคโคซานความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซ้ายไปขวาตามลำดับ)

2.3 การวางเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารแข็ง

เมื่อนำโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 12 สัปดาห์ มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมและไม่เติมโคโคซาน หลังการวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์พบว่าทุกความเข้มข้นของโคโคซานช่วยให้โพรโทคอร์มมีการเจริญเติบโตได้ เกิดการแตกหน่อได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับการวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่ไม่เติมโคโคซาน โดยมีการเกิด PLBs เล็ก ๆ ซึ่งต่อมาเกิดใบและรากมากขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของโคโคซาน 15 มก./ล. ให้จำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนหน่อและ น้ำหนักสดมากที่สุด (ตารางที่ 2) ซึ่งหากเติมโคโคซานความเข้มข้นสูงขึ้น แนวโน้มการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มจะลดลง ถึงแม้ว่าบางค่าจะไม่มีแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มบนอาหารสูตร VW หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ ไคโตซาน (มก./ล.)	จำนวนใบ± SD (ใบ/ต้น)	จำนวนราก± SD (ราก/ต้น)	จำนวนหน่อ± SD (หน่อ/ต้น)	น้ำหนักสด± SD (กรัม/ต้น)
0	3.33±0.87ab	2.00±0.78b	1.08±0.28b	0.10±0.05a
5	3.22±1.03b	2.33±0.90ab	1.07±0.26b	0.12±0.07a
10	3.79±1.88ab	2.31±0.97ab	1.24±0.58ab	0.14±0.15a
15	4.31±2.92a	2.54±1.21a	1.46±1.03a	0.11±0.05a
20	3.07±0.86c	2.07±0.72b	1.07±0.26b	0.10±0.08a
25	3.37±0.81ab	1.97±0.85b	1.03±0.18b	0.10±0.05a

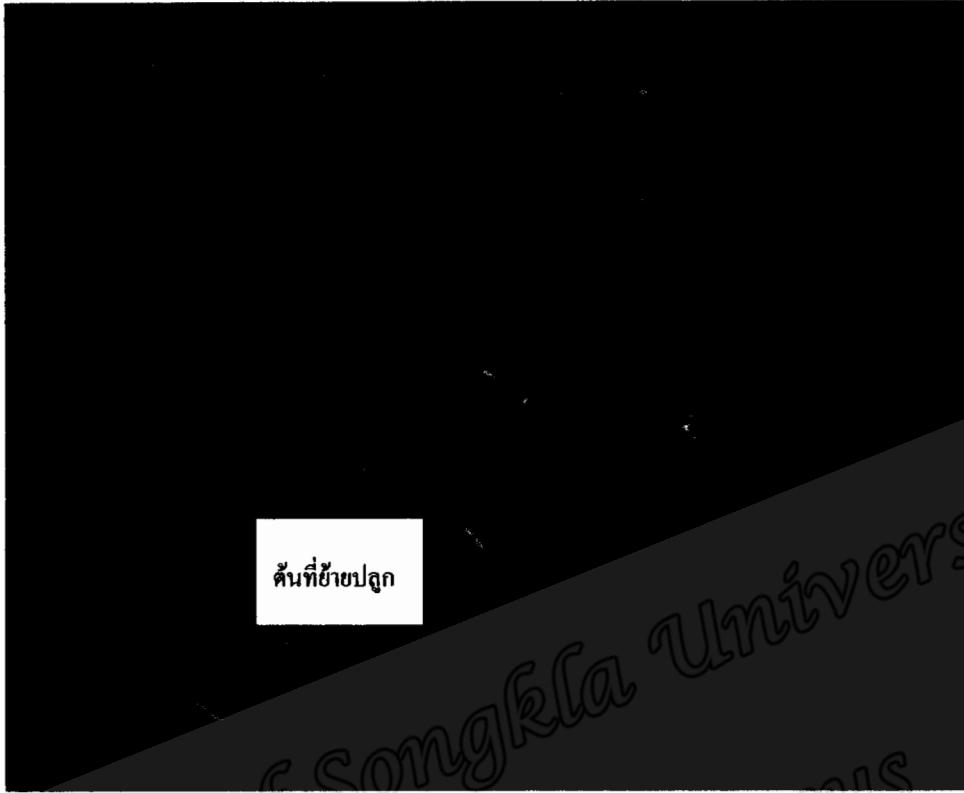
ค่าเฉลี่ยตัวเลขในสคริปต์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT ($p \leq 0.05$)

2.4 ความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อความมีชีวิตของต้นกล้ากล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนเมื่อนำออกย้ายปลูก

นำต้นกล้ากล้วยไม้เขากวางอ่อนอายุ 6 เดือน มาปรับสภาพให้เคยชินกับสภาพแวดล้อมใหม่ โดยการนำต้นที่มีรากสมบูรณ์ในสภาพปลอดเชื้อ ไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนย้ายปลูกประมาณ 1 สัปดาห์ ล้างรู้ออกจากรากให้สะอาด แช่น้ำยาเพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อรา หลังจากนั้นย้ายลงวัสดุปลูก ได้แก่ ถ่านใช้พลาสติกห่อหุ้มเพื่อรักษาความชื้นประมาณ 2 สัปดาห์ เมื่อต้นกล้วยไม้เริ่มแข็งแรงแล้วนำพลาสติกที่คลุมออก หลังจากวางเลี้ยงต้นกล้วยไม้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ากล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน มีชีวิตรอดสูงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 7) ถึงแม้ว่าผลการทดลองจะไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าเมื่อรดต้นกล้ากล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 10 มก./ล. ช่วยให้ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดีมีการรอดชีวิตสูงสุด แต่เมื่อรดด้วยไคโตซานความเข้มข้นสูงขึ้น การเจริญเติบโตจะลดลง ส่วนที่ระดับต่ำ คือ 5 มก./ล. มีการรอดชีวิตต่ำกว่าต้นที่ควบคุมที่รดน้ำปกติไม่มีไคโตซาน แต่ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 ผลของไคโตซานต่อความมีชีวิตรอดของต้นกล้ากล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของไคโตซาน (มก./ล.)	การรอดชีวิต (%)	ลักษณะของต้น
0	72.22 a	ต้นสมบูรณ์ปานกลาง ใบ รากเจริญดี
5	61.11a	ต้นไม่ค่อยสมบูรณ์ ผอม
10	77.78a	ต้นสมบูรณ์มาก ใบหนาสีเขียวเข้ม
15	70.00a	ต้นสมบูรณ์ปานกลาง ใบ รากเจริญดี
20	71.60a	ต้นสมบูรณ์ปานกลาง ใบ รากเจริญดี
25	60.00a	ต้นสมบูรณ์ปานกลาง ใบ รากเจริญดี



รูปที่ 7 ต้นกล้าที่ย้ายปลูกลงในวัสดุปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ในสภาพที่มีการให้ ไคโตซาน 10 มก./ล.