



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

ปริญญา

พฤกษศาสตร์

พฤกษศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดเลือกแคลลัสหญ้ารูซี่ *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard) Morrone & Zuloaga ทนแล้งโดยใช้สาร polyethylene glycol 6000

Selection for Drought Tolerant Callus of Ruzi Grass *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard) Morrone & Zuloaga using Polyethylene Glycol 6000

นามผู้วิจัย นางสาวกรวรรณ ทรงความดี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รongศาสตราจารย์มาลี ณ นคร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รongศาสตราจารย์ลิลลี่ กาวิตะ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รongศาสตราจารย์สรัญญา วัชรโรทัย, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รongศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกแคลลัสหญาฐูรชู่ *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard) Morrone & Zuloaga
ทนแล้งโดยใช้สาร polyethylene glycol 6000

Selection for Drought Tolerant Callus of Ruzi Grass *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard)
Morrone & Zuloaga using Polyethylene Glycol 6000

โดย

นางสาวกรวรรณ ทรงความดี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤษศาสตร์)

พ.ศ. 2555

สิงสถิตี๋ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรวรรณ ทรงความดี 2555: การคัดเลือกแคลลัสหญาฐี *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard) Morrone & Zuloaga ทนแล้งโดยใช้สาร polyethylene glycol 6000 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มาลี ณ นคร, Ph.D. 85 หน้า

หญาฐีเป็นหญาอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงแต่ไม่สามารถปรับตัวให้เจริญเติบโตในช่วงแล้งที่ยาวนานได้ ดังนั้นจึงชักนำแคลลัสหญาฐีในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่มี 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0-15.8 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มปริมาณด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0-9.0 ไมโครโมลาร์ นาน 28 วัน พบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณแคลลัสคือ 13.5 และ 9 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อให้แคลลัสได้รับ PEG 0- 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 42 วัน เพื่อหาความเข้มข้นของ PEG สำหรับคัดเลือกแคลลัสที่ทนแล้ง พบว่า เมื่อ PEG ความเข้มข้นสูงถึง 15-20 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสไม่สามารถเติบโตได้ และ PEG 12 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการตายแคลลัสเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม จึงคัดเลือกแคลลัสทนแล้งจากแคลลัสที่ได้จาก 220 เมล็ด ด้วย PEG 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่า โคลน 1-101 และ 2-100 มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งสูงสุด (128.34 และ 103.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) หรือทนแล้งมากที่สุด โคลน 1-095 และ 2-096 มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งต่ำสุด (78.85 และ 77.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) หรือทนแล้งน้อยที่สุด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการที่เกี่ยวข้องกับการปรับค่า osmotic potential ของแคลลัสหญาฐีที่คัดเลือกไว้ทั้ง 4 โคลน เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วัน ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณน้ำในเซลล์ ปริมาณอออน และปริมาณโปรตีน พบว่า ลักษณะที่สัมพันธ์กับระดับการทนแล้งสูงสุดของแคลลัสโคลน 1-101 คือ การสะสม K^+ เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้น ขณะที่ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงมากเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้นสูง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่แคลลัสยังคงมีการเติบโต ทำให้น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งแสดงถึงกลไกการทนทานต่อสภาพขาดน้ำ (drought tolerance) ซึ่งจะสามารถใช้ในการคัดเลือกแคลลัสหญาฐีที่ทนแล้งได้ ส่วนลักษณะที่สัมพันธ์กับระดับการทนแล้งได้ต่ำของแคลลัสโคลน 1-095 คือ การสะสมโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้น เช่นเดียวกับค่าออสโมแลลลิตีที่เพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง แต่การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งต่ำกว่าชุดควบคุมมาก

Korawan Songkwamdee 2012: Selection for Drought Tolerant Callus of Ruzi Grass *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard) Morrone & Zuloaga using Polyethylene Glycol 6000
Master of Science (Botany), Major Field: Botany, Department of Botany. Thesis Advisor:
Associate Professor Malee Nanakorn, Ph.D. 85 pages.

Ruzi grass is a pasture grass which possesses high nutrition, however, it is unable to adapt to grow in a long duration of drought. Therefore, calli of ruzi grass were induced on MS medium supplemented with 0-15.8 μM and proliferated by 0-9 μM 2, 4-D for 28 days. The optimum concentrations for callus induction and proliferation were 13.5 and 9 μM 2, 4-D, respectively. The calli were exposed to 0-20% polyethylene glycol 6000 for 42 days to find the PEG concentration for selection drought tolerant calli. The results indicated that the calli were unable to grow when increasing PEG concentration to 15-20 % and the 50% lethal dose (LD_{50}) of PEG was 12%. This PEG concentration was used for selection of drought tolerant calli from 220 seeds. It was found that the most two tolerant calli; clone number 1-101 and 2-100, had highest increasing dry weight (128.34 and 103.69 %control, respectively) and the less two tolerant calli, clones number 1-095 and 2-096, had lowest increasing dry weight (78.85 and 77.41 %control, respectively).

Some physiological changes concerning on osmotic adjustment; changing of fresh and dry weight, osmolality, water content, ion and proline content in calli of 4 selected clones when exposed to PEG 0, 5, 10, 15 and 20% for 30 days were study. The characteristics which related to the highest drought tolerance of clone 1-101 were the accumulation of K^+ when PEG concentration increased whereas water content decreased. However, the calli were still grown resulted in increasing of dry weight higher than control. These changes indicated the mechanism of drought tolerance and will be able to use for selection drought tolerant calli. The characteristics which related to the lowest drought tolerance of clone 1-095 were the increasing of proline accumulation as same as the increasing of osmolality whereas the water content was decreased. However, the increasing of dry weight was much lower than the control.

Student's signatureThesis

Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มาลี ณ นคร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ลิลลี่ กาวิตุ้ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา แนะนำช่วยเหลือในด้านต่างๆสำหรับการทดลอง และสละเวลาแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความสนใจ และชี้แนะจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ดังดี

ขอขอบพระคุณนางวลัยกานต์ เจียมเจนนัฏฐ ที่ให้คำปรึกษาช่วยชี้แนะรายละเอียดและช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ในการทดลองครั้งนี้ ขอบขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอบคุณ มัทนภรณ์ ไหมคำมิต และ ฤทัยชนก กฤติวิโรดม ที่ให้คำปรึกษาช่วยชี้แนะรายละเอียดและช่วยเหลือในด้านการทดลอง และ การเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนเมล็ดพันธุ์เห็ดราเชื้อตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาและทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน และส่งเสริมด้านการศึกษาดำเนินมา

กรวรรณ ทรงความดี

มกราคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	22
ผล	22
วิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	51
ภาคผนวก	60
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของ 2, 4- D ต่อการชักนำเมล็ดเหี่ยวร้างให้เกิดแคลลัส	23
2	ผลของ 2, 4- D ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส	25
ตารางผนวกที่		
1	องค์ประกอบอาหารสังเคราะห์สูตร MS	6
2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อน้ำหนักสดของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	3
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อน้ำหนักแห้งของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	65
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณน้ำในเซลล์ของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	67
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อค่าออกซิโมแลลิตีของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	69
6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณโปรตีนของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	71
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณโพแทสเซียมไอออนของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	73
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณแมกนีเซียมไอออนของแคลลัสเหี่ยวร้างเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณแคลเซียมออกไซด์ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	77
10	ผลของ PEG ต่อน้ำหนักสด (กรัม) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	79
11	ผลของ PEG ต่อน้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	79
12	ผลของ PEG ต่อน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	80
13	ผลของ PEG ต่อน้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	80
14	ผลของ PEG ต่อปริมาณน้ำในเซลล์ (กรัม) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	81
15	ผลของ PEG ต่อค่าออสโมแลลิตี (มิลลิโมลต่อกิโลกรัม) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	81
16	ผลของ PEG ต่อปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	82
17	ผลของ PEG ต่อปริมาณโพแทสเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	82
18	ผลของ PEG ต่อปริมาณแมกนีเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	83
19	ผลของ PEG ต่อปริมาณแคลเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	83
20	ผลของ PEG ต่อปริมาณออกไซด์รวม (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน	84

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แคลลัสจากเมล็ดหนักรูซี่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรMSที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 28 วัน	24
2	ขนาดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 28 วัน	26
3	ผลของ PEG ต่อน้ำหนักสดของแคลลัสหนักรูซี่เมื่อได้รับ PEG นาน 42 วัน	27
4	ผลของ PEG ความเข้มข้นต่างๆต่ออัตราการตายของแคลลัสหนักรูซี่เมื่อได้รับ PEG นาน 42 วัน	28
5	ผลของ PEG ต่อน้ำหนักสดของแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	31
6	ผลของ PEG ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	32
7	ผลของ PEG ต่อค่าออกซิโมแลลลิตีของสารละลายในแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	34
8	ผลของ PEG ต่อปริมาณน้ำในเซลล์ของแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	34
9	ผลของ PEG ต่อปริมาณอออนของแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	37
10	ผลของ PEG ต่อปริมาณอออนรวมของแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	38
11	ผลของ PEG ต่อปริมาณโปรตีนของแคลลัสหนักรูซี่โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

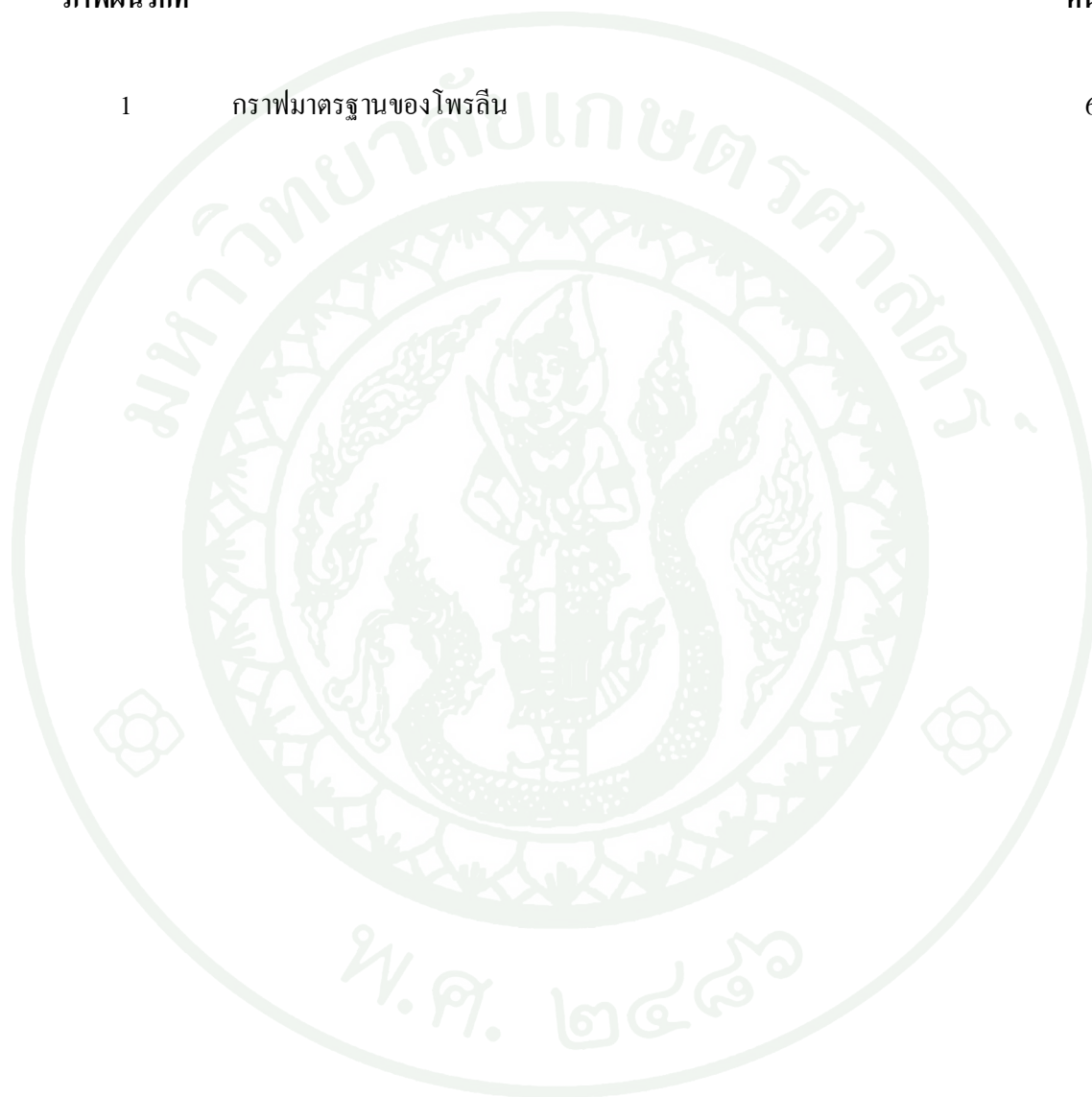
ภาพผนวกที่

หน้า

1

กราฟมาตรฐานของโพรีลิน

62



การคัดเลือกแคลลัสหญ้ารูจี *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard)

Morrone & Zuloaga ทนแล้งโดยใช้สาร polyethylene glycol 6000

Selection for Drought Tolerant Callus of Ruzi Grass *Urochloa ruziziensis*

(R.Germ. & C.M.Evrard) Morrone & Zuloaga using Polyethylene Glycol 6000

คำนำ

ในปัจจุบันรัฐบาลมีนโยบายสนับสนุนให้เกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือใช้พื้นที่ให้เกิดประโยชน์ และได้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูง ด้วยการส่งเสริมให้การเลี้ยงโคนม โคเนื้อและกระบือ แต่การเลี้ยงประสบปัญหาขาดแคลนอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพดีในช่วงฤดูแล้งซึ่งยาวนานถึง 6 เดือน เพื่อเป็นการแก้ปัญหา กรมปศุสัตว์จึงนำพันธุ์พืชอาหารสัตว์จากต่างประเทศเข้ามาทดลองปลูก ได้แก่ หญ้ารูจี ซึ่งเกษตรกรนิยมปลูก เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูง เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ โดยเฉพาะดินร่วนปนทราย ทนแล้งได้ดี ทนต่อการเหยียบย่ำของสัตว์ ทำให้มีการใช้หญ้ารูจีอย่างแพร่หลายในเกษตรกรผู้เลี้ยงโค กระบือ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าหญ้ารูจีจะทนแล้งได้ดี แต่ก็ไม่สามารถปรับตัวให้เจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีช่วงแล้งยาวนาน (กรมปศุสัตว์, 2545) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์หญ้ารูจีให้ทนสภาพแห้งแล้งมากขึ้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนแล้งในสภาพหลอดทดลองสามารถทำได้โดยใช้กลุ่มเซลล์หรือพืชทั้งต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสาร osmoticum เช่น polyethylene glycol ที่ทำหน้าที่ลด osmotic potential ของสารละลายอาหารที่อยู่ล้อมรอบกลุ่มเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (drought stress) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการจากกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) ที่เรียกว่า แคลลัส (callus) เนื่องจากมีเซลล์เป็นจำนวนมากที่จะนำมาคัดเลือก และมีโอกาสเกิด somaclonal variation สูง ซึ่งจะช่วยในการคัดเลือกประสบความสำเร็จได้มากขึ้น และแคลลัสนั้นสามารถแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางสรีรวิทยาในระดับเซลล์ และทำให้การทนแล้งของพืชแต่ละพันธุ์นั้นชัดเจนมากขึ้น (Aazami *et al.*, 2010) เช่นในการคัดเลือกเซลล์ข้าวฟ่างทนแล้งโดยใช้ PEG ชักนำให้เกิดสภาพแล้ง พบว่าเมื่อ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้นข้าวฟ่างพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งมีการสะสมโปรตีนสูงกว่าข้าวฟ่างพันธุ์ที่ทนแล้งมาก (Bhaskaran *et al.*, 1985) และในการคัดเลือกเซลล์ข้าวฟ่างทนแล้งของ Newton *et al.* (1986)

พบว่าเมื่อ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้น ข้าวฟ่างพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งมีการสะสมตัวถูกละลายอินทรีย์ภายในเซลล์ เช่น ซูโครส กลูโคส และฟรุคโทส สูงกว่าข้าวฟ่างพันธุ์ที่ทนแล้ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงตัวถูกละลายอินทรีย์เหล่านี้จะสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดระดับการทนแล้ง ดังนั้น การทดลองครั้งนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการ เช่น ตัวถูกละลายอินทรีย์ และอนินทรีย์ ค่าความเข้มข้นสารละลายภายในเซลล์ และปริมาณน้ำในเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกเซลล์พันธุ์ที่ทนแล้ง และเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ที่ทนแล้งต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เมล็ดหนัญชี่สร้างแคลลัสและเพิ่มปริมาณแคลลัส
2. เพื่อคัดเลือกแคลลัสของหนัญชี่ที่ทนแล้งโดยใช้สารpolyethylene glycol 6000 ชักนำให้เกิดสภาพเครียดของน้ำ
3. เพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการปรับค่าosmotic potential ของแคลลัสหนัญชี่ที่มีระดับการทนแล้งแตกต่างกันในสภาพที่ขาดน้ำที่ชักนำด้วยpolyethylene glycol 6000

การตรวจเอกสาร

การเลี้ยงโคเนื้อหรือโคนมเพื่อเป็นอาชีพหลักหรือเชิงพาณิชย์ ต้องอาศัยพืชอาหารสัตว์ที่ได้รับการปรับปรุงให้มีทั้งปริมาณ และคุณภาพพอเพียงสำหรับการเจริญเติบโตของสัตว์ สำหรับประเทศไทยมีการใช้หญ้าทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและปลูกขึ้นเพื่อการเลี้ยงสัตว์ (สายัณห์, 2540) พันธุ์หญ้าที่เกษตรกรนิยมปลูกคือ หญ้ารูซี่ ซึ่งเป็นพันธุ์พืชอาหารสัตว์จากต่างประเทศ ที่กองอาหารสัตว์ได้นำเข้ามาทดลองปลูก จนทำให้มีการปลูกหญ้ารูซี่อย่างแพร่หลาย (กรมปศุสัตว์, 2545)

หญ้ารูซี่ (ruzi grass) เป็นพืชวงศ์หญ้า (Poaceae) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evard) Morrone & Zuloaga ชื่อสามัญคือ Ruzi, Kenedy ruzi, Congo signal, Prostrate signal (Skerman and Riveros, 1990; Norsaengsri, 2006) หญ้ารูซี่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้นที่มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 1000 มิลลิเมตรขึ้นไป ชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีการระบายน้ำดี ไม่ทนต่อสภาพน้ำขังเป็นระยะเวลายาวนาน สามารถอยู่รอดได้ในช่วงฤดูแล้งแต่ไม่ให้ผลผลิต (สายัณห์, 2540) ทนทานต่อการแทะเล็มของสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2545) อุณหภูมิ (กลางวัน/กลางคืน) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 30/28 องศาเซลเซียส (Dienum and Dirven, 1972) หญ้ารูซี่มีความน่ากินสูง เนื่องจากใบมีสีเขียวและ อ่อนนุ่ม มีคุณค่าทางอาหาร โดยเฉพาะโปรตีนอยู่ในเกณฑ์สูง คือมีปริมาณโปรตีน 10.83 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อไข 23.13 เปอร์เซ็นต์ (ฉายแสง, 2534)

หญ้ารูซี่เป็นพืชอาหารสัตว์พื้นเมืองที่สำคัญของประเทศคองโก (Congo) และประเทศเคนยา (Kenya) นำเข้าประเทศไทยครั้งแรกจากประเทศออสเตรเลียเมื่อปี พ.ศ. 2511 โดยทดลองปลูกที่ฟาร์มโคนมไทยเดนมาร์ก อำเภอมวกเหล็ก และศูนย์วิจัยอาหารสัตว์ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (สายัณห์, 2540)

ลักษณะทั่วไป

หญ้ารูซี่เป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี ออกดอกในสภาพวันสั้น ในประเทศไทยเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือนกันยายน เหมาะสำหรับการใช้ปลูกในเขตร้อนซึ่งมีฝนตกอย่างน้อย 1,000 มิลลิเมตรต่อปี ชอบอากาศร้อนชื้น สามารถขึ้นได้ดีในเขตกึ่งร้อน และในดินทุกชนิดที่มีการระบายน้ำดี นอกจากนี้หญ้ารูซี่ยังให้ผลผลิตสูง ทนต่อการเหยียบย่ำของสัตว์ได้ดี (กรมปศุสัตว์, 2545)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หญ้ารูซี่ ลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบกึ่งเลื้อยกึ่งตั้ง สูงประมาณ 60-100 เซนติเมตร ลำต้นกลม แข็งเรียวยาว มีขนปกคลุม มีรากแตกแขนงบริเวณโคนต้น ใบสีเขียวอ่อนมีลักษณะคล้ายหอก อ่อนนุ่ม มีขนละเอียดปกคลุมทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง ใบยาว 13-15 เซนติเมตร กว้าง 0.8-2.5 เซนติเมตร เส้นใบมีขนปกคลุม มีช่อดอกแบบ raceme ยาว 30-40 เซนติเมตร ดอกย่อยเรียงเป็นสองแถวแบบสลับ (ciliate) กลุ่มดอกมีขนปกคลุม ดอกล่างเป็นดอกตัวผู้ เลมมา ล่างยาว 5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ช่วงปลายบนมีขน พาลี ยาว 4.5-5 มิลลิเมตร อับเรณู (anther) สีเหลืองอ่อน กลีบเกล็ด (lodicule) ยาว 0.2 มิลลิเมตร เลมมา บนยาว 4.5 มิลลิเมตร ปลายแหลมแข็ง ผิวขรุขระ พาลีบนยาว 4 มิลลิเมตร ก้านเกสรยาว 1 มิลลิเมตร สีเหลืองอ่อน รังไข่ยาว 0.5-1 มิลลิเมตร ผลเดี่ยว รูปร่างขอบขนาน หรือรูปรี แบนเล็กน้อย อยู่ภายในเปลือก (pericarp) ที่บาง ภายในมี 1 เมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด (testa) เชื่อมติดแน่นกับเปลือกผล (Norsaengsri, 2006; Davison, 1966; Skerman and Riveros, 1990)

ประโยชน์ของพืชอาหารสัตว์

นอกจากจะมีประโยชน์เป็นอาหารสัตว์แล้วยังมีบทบาทในด้านต่างๆ ดังนี้ (สาขันธ์, 2540)

1. ปรับปรุงคุณสมบัติของดินได้ทุกชนิด และยังช่วยในการแยกสลายพวก basic parent material ให้กลายเป็นดิน การซอนไชของรากซึ่งมีจำนวนมากตามรอยแยกเล็กกระหว่างเม็ดดิน เมื่อรากขยายตัวใหญ่ขึ้นจะทำให้สามารถแยกอนุภาคของดินออกให้ละเอียดยิ่งขึ้น
2. ใช้พื้นที่ที่มีอยู่ให้เกิดผลประโยชน์ และได้หญ้าอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพดีเพิ่มมากขึ้นอย่างเพียงพอ ซึ่งเป็นการแก้ไขปัญหาคาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้ง

3. เพิ่มรายได้โดยตรง และรายได้เสริม โดยเกษตรกรในหลายท้องถิ่นได้หันมาผลิตอาหารปลูกหญ้าเช่น ขายเป็นหญ้าสด ผลิตหญ้าแห้งขาย

Polyethylene glycol 6000 (PEG)

Polyethylene glycol (PEG) คือสารประกอบ polyether ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา มีชื่อทางการค้าว่า Carbowax โดยนิยมเรียกว่า polyethylene oxide (PEO) หรือ polyoxyethylene (POE) ในปัจจุบันพบว่า PEG มีหลายขนาดตามน้ำหนักโมเลกุล เช่น polyethylene glycol 4000, 6000 และ 8000 เป็นต้น PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ สามารถใช้ในการจำลองสภาพแล้ง เพื่อคัดเลือกพืชที่ทนแล้งได้ เนื่องจาก PEG เป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อพืช ไม่แตกตัว (nonionic) ไม่แทรกซึมเข้าไปในเซลล์ (nonpenetrate) และมีค่า water potential ต่ำ ซึ่งทำให้มีสภาพคล้ายกับดินที่แห้ง นอกจากนี้ยังมีสาร osmoticum ชนิดอื่นที่สามารถชักนำให้เกิดสภาพเครียดของน้ำได้เช่น mannitol และ NaCl แต่สารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถซึมผ่านเมมเบรนเข้าไปในส่วนที่เป็น symplast ได้ (Larther *et al.*, 1993)

สภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ

สภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ (water stress) หมายถึง สภาพที่ทำให้พืชมีพลังงานศักย์ของน้ำ (water potential) และความเต่งของเซลล์ (turgor) ลดลง หรือพืชอยู่ในสภาวะที่ไม่สามารถดูดน้ำได้ทันกับการคายน้ำ และเมื่อความชื้นในดินลดลง การเคลื่อนที่ของน้ำจากดินสู่รากเริ่มมีอัตราที่ช้ากว่าการสูญเสียของพืช ทำให้พืชแสดงออกถึงลักษณะการขาดน้ำ (Kramer, 1983) เช่น

1. พื้นที่ใบลดลงเนื่องจากการขยายตัวของเซลล์หยุดชะงัก ซึ่งเกิดจาก turgor pressure ที่ลดลง
2. ปากใบของพืชปิด ทำให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผ่านเข้ามาในต้นพืชนั้นถูกจำกัด จึงทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงตามไปด้วย (Hopkins, 1999) นอกจากนี้ยังทำให้การคายน้ำของพืชลดลง อุณหภูมิใบสูงขึ้น การทำงานของคลอโรพลาสต์ถูกจำกัด (Valladares and Pearcy, 1997)

3. เซลล์หดตัว เนื่องจากปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงและ turgor pressure ที่ต่ำกว่าแรงต้านของผนังเซลล์ (Taiz, 2006)

4. ปริมาณ abscisic acid (ABA) เพิ่มขึ้นเมื่อพืชขาดน้ำ หลังจากนั้นใบจะเริ่มเหี่ยว (Hopkins, 1999) นอกจากนี้พบว่า ABA ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลต่อการสังเคราะห์ RNA ที่ลดลงด้วย (Sussex *et al.*, 1978)

กลไกด้านการขาดน้ำของพืช

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำทั้งในระยะเวลาสั้นๆ หรือยาวนาน พืชจะมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอด หรือทนต่อสภาวะนั้นได้ด้วยกลไกต่อไปนี้ (Turner *et al.*, 1981)

1. การหลีกเลี่ยงภัยแล้ง (drought escape) หมายถึงความสามารถของพืชที่จะมีวงจรชีวิตให้สมบูรณ์ก่อนที่จะเผชิญหน้ากับสภาพที่แห้งแล้ง ซึ่งจะต้องมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว หรือ มีวงจรชีวิตที่สั้น เช่น พืชล้มลุกบางชนิดสามารถออกดอกและติดผลอย่างรวดเร็วเพื่อปรับตัวหลีกเลี่ยงจากช่วงที่แล้ง (Jones *et al.*, 1981)

2. การเลี่ยงการขาดน้ำ (drought avoidance) หมายถึง ความสามารถของพืชในการป้องกันหรือลดการสูญเสียน้ำภายในพืช โดยมีกลไก dehydration postponement ดังนี้

2.1 ความสามารถในการดูดซึมน้ำอย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเพิ่มอัตราส่วนของรากต่อลำต้น หรือ ความยาวของราก พืชที่ปลูกในดินที่แห้งแล้งจะมีระบบรากที่ลึกและยาวกว่าพืชที่ปลูกในดินที่ชื้น เช่น ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ซึ่งอัตราที่เพิ่มขึ้นนี้ได้จากการเพิ่มความยาวและน้ำหนักของราก ส่วนความยาวของลำต้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Malik *et al.*, 1979)

2.2 สามารถป้องกันการสูญเสียน้ำไม่ให้เกิดขึ้นมากเกินไป โดยการรักษาปริมาณน้ำในดินให้ยังคงสูง อาจเกิดร่วมกับลักษณะอื่นภายในพืช เช่น การปิดปากใบ การม้วนใบ และ นอกจากนี้ยังมีการสะสมไขไว้ที่ผิวใบเพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยในการสะท้อนแสง Richards *et al.* (1986) รายงานว่าข้าวสาลีที่มีไขเคลือบผิวใบมาก จะสะท้อนแสงและลดอุณหภูมิได้ดี นอกจากนี้ยังทำให้ใบร่วงช้าด้วย

3. การทนทานต่อการขาดน้ำ (drought tolerance) หมายถึง ความสามารถของพืชที่ทนต่อการลดลงของน้ำ โดยการรักษาค่า turgor pressure และ water potential ที่ลดลงให้คงที่ ซึ่งควบคุมได้โดย 2 กลไกดังนี้

3.1 การปรับค่า osmotic potential ซึ่งเกิดจากการสะสมตัวถูกละลายเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ ผลที่ได้จากการปรับค่า osmotic potential คือ อัตราการไหลของน้ำเข้าไปในเซลล์นั้นเพิ่มมากขึ้น ช่วยให้เซลล์พืชที่เหี่ยวกลับมา มีสภาพเต่งเหมือนเดิม โดยตัวถูกละลายที่มีส่วนร่วมในการปรับค่า osmotic potential ประกอบด้วย อีออน, น้ำตาล กรดอะมิโน เป็นต้น (Hopkins 1999; Serraj and Sinclair 2002) Clifford *et al.* (1998) เรียกการปรับค่า osmotic potential ที่เกิดจากการสะสมตัวถูกละลายนี้ว่า active accumulation โคนสออดคล้องกับ Knapp (1984) พบว่า หญ้า switchgrass (*Panicum virgatum*) เป็นหญ้าในกลุ่ม mesic sites นั้นไม่สามารถลดค่า Ψ^0 (water potential at zero turgor) แต่หญ้า switch grass มีความสามารถในการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายได้ โดยมีผลทำให้ค่า water potential ภายในเซลล์ลดต่ำกว่าภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถดูดซึมน้ำได้

อีออนที่เกี่ยวข้องในการปรับค่า osmotic potential ในพืชในสภาวะเครียดของน้ำ คือ K^+ , Ca^{2+} และ Mg^{2+} เป็นต้น (Errabli *et al.*, 2006) บทบาทของอีออนเหล่านี้ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการทำงานภายในต้นพืช มีดังนี้

โพแทสเซียม (K^+) ควบคุมการเปิดปิดของปากใบ และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแป้ง น้ำตาล และ โปรตีน นอกจากนี้โพแทสเซียมยังมีบทบาทในการควบคุมค่าออสโมแลลลิตีระหว่างแวคิวโอล และไซโทพลาสซึมให้สมดุลกัน และทำหน้าที่ควบคุมสมดุลระหว่างประจุบวก และประจุลบ (Hopkins, 1999)

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น RNA polymerases, ATPases, protein kinases, phosphatases, glutathione synthase and carboxylases เป็นต้น (Shaul, 2002) นอกจากนี้ แมกนีเซียมที่เป็นอีออนอิสระ (free Mg^{2+}) ส่วนใหญ่อยู่ในแวคิวโอลนั้นเกี่ยวข้องกับการขนส่งอาหารเข้าสู่โฟลเอ็มที่แหล่งอาหาร (phloem loading) และทำหน้าที่ควบคุมสมดุลระหว่างประจุบวก ประจุลบ ควบคุมความเต่งของเซลล์อีกด้วย (Marschner, 1995)

(phloem loading) และทำหน้าที่ควบคุมสมดุลระหว่างประจุบวก ประจุลบ ควบคุมความต่งของเซลล์อีกด้วย (Marschner, 1995)

แคลเซียม (Ca^{2+}) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จำเป็นสำหรับกระบวนการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ (Hopkins, 1999)

ตัวอย่างการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอออนเมื่อได้รับสภาพเครียดจากน้ำเช่น

Handa *et al.* (1983) เพาะเลี้ยงเซลล์มะเขือเทศในสภาพที่ขาดน้ำซึ่งถูกชักนำโดย PEG พบว่า ที่ค่า water potential -50 bars และแคลลัสมีการสะสม K^+ (40-200 mM) สูงมากกว่าชุดควบคุม ทำให้เซลล์สามารถปรับตัวอยู่ในสภาพที่ขาดน้ำได้

Javed (2002) เพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวสาลีสองพันธุ์ (LU-26s และ Potohar) ในสภาวะที่มีเกลือ (NaCl) พบว่าแคลลัสของข้าวสาลีทั้งสองพันธุ์มีการสะสม Na^+ และ Cl^- เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น โดยพันธุ์ LU-26s นั้นสะสม Na^+ และ Cl^- มากกว่าพันธุ์ Potohar ส่วนการสะสม K^+ ของแคลลัสข้าวสาลีทั้งสองพันธุ์นั้นลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น โดยพันธุ์ Potohar นั้นมีการสะสม K^+ น้อยกว่าพันธุ์ LU-26s

Errabii *et al.* (2006) เพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยสองพันธุ์ ในสภาวะที่ขาดน้ำที่ถูกชักนำโดย mannitol พบว่า แคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์ (R570 และ CP59-73) มีการสะสม K^+ (31, 48% control) และ Ca^{2+} (32, 50% control) ลดลง แต่ไม่มีผลต่อการสะสม Na^+ และ Mg^{2+} เมื่อสภาวะเครียดของน้ำเพิ่มขึ้น

การสะสมตัวถูกละลายเป็นการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมแทบอลิซึมอย่างหนึ่งที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของน้ำ ซึ่งทำให้พืชรักษาความต่งและการเจริญเติบโตไว้ได้ (Boyer 1983; Morgan, 1984) :ซึ่ง Newton *et al.* (1986) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแคลลัสข้าวฟ่าง เมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำที่ถูกชักนำโดย PEG พบว่า แคลลัสที่ไม่ทนแล้งจะมีการสะสมตัวถูกละลาย เช่น sucrose, fructose, glucose และ malate ภายในเซลล์ (17.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง) สูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้กรดอะมิโนหลายชนิดยังมีบทบาทในการปรับค่า osmotic potential ของพืช เช่น โพรลีน ไกลซีน อะลานีน เป็นต้น (Hore *et al.*, 1998) เช่นใน

การศึกษาของ Al-Khayri and Al-Bahrany (2004) ที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ date plum ในสภาพที่ขาดน้ำที่ถูกชักนำโดย PEG พบว่า แคลลัสของพันธุ์ที่ทนแล้งนั้นสะสมโพรลีนสูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง

กระบวนการสร้างโพรลีน เริ่มต้นจากสาร glutamate โดยมีเอนไซม์ γ -glutamyl kinase และ γ -glutamyl semialdehyde dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์คู่แรกของกระบวนการจากปฏิกิริยาในช่วงนี้จะได้สาร glutamyl- γ -semialdehyde ต่อจากนั้นจะเกิดกระบวนการ dehydration โดยไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง ผลของปฏิกิริยาจะได้ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate จากนั้นก็เกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยใช้เอนไซม์ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase จากปฏิกิริยานี้จะได้สารโพรลีน แล้วโพรลีนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสร้างโพรลีน โพรลีนบางส่วนเคลื่อนย้ายเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหาร (Boggess *et al.*, 1976)

การสลายตัวของโพรลีนเกิดจากกระบวนการ proline oxidation ของเอนไซม์ proline oxidase ผลจากปฏิกิริยานี้จะได้ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate และจาก Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate จะเกิดปฏิกิริยาอีกขั้นตอนหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase ได้ glutamate (Boggess *et al.*, 1976) กระบวนการสลายตัวของโพรลีนจะเกิดขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาพปกติ แต่ถ้าขาดน้ำกระบวนการ proline oxidation จะถูกยับยั้ง (Jones and Rawson, 1979)

สาเหตุของการสะสมโพรลีนเมื่อพืชอยู่ในสภาพขาดน้ำมี 3 ประการ ดังนี้

- 1) เมื่อพืชขาดน้ำ ทำให้กระบวนการสร้าง glutamyl- γ -semialdehyde เกิดขึ้นได้ดี แต่ยับยั้งกระบวนการที่เปลี่ยน glutamate ไปเป็น 2-oxyglutamate จึงเป็นการส่งเสริมกระบวนการสร้าง Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) เพิ่มขึ้น (Boggess *et al.*, 1976) เมื่อพืชมีปริมาณ P5C สูง จึงทำให้พืชสร้างโพรลีนเพิ่มขึ้น
- 2) เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ กระบวนการ proline oxidation ถูกยับยั้ง โพรลีนถูกเปลี่ยนไปเป็น glutamate ซ้ำลง (Boggess *et al.*, 1976)
- 3) สภาพขาดน้ำทำให้กระบวนการสร้างโพรลีนช้าลง จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น การสะสมโพรลีนจะเกิดขึ้นก่อนที่พืชจะชงการเจริญเติบโต (Stewart, 1972)

Javed and Ikram (2008) รายงานว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ข้าวสาลีในสภาวะเครียดของน้ำที่มากขึ้น พบว่า แคลลัสมีน้ำหนักลดลง ขณะที่น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น เนื่องจากการสะสมโปรตีนและ total soluble carbohydrates เพิ่มขึ้น ซึ่งการสะสมตัวถูกละลายเหล่านี้ภายในเซลล์ จะทำให้เซลล์สามารถดูดน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นพืชจึงรักษาการเจริญเติบโตไว้ได้

Bhaskaran *et al.* (1985) เพาะเลี้ยงเซลล์ของข้าวฟ่างในสภาพที่ขาดน้ำที่มีค่า water potential ต่ำสุด (-16 บาร์) พบว่าแคลลัสสะสมโปรตีน (มากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักสด) มากกว่าแคลลัสที่ไม่อยู่ในสภาพขาดน้ำ (0.1-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักสด) Blum and Ebercon (1976) รายงานว่า การสะสมโปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการฟื้นจากการเหี่ยวของข้าวฟ่างเมื่อได้รับน้ำ (recovery) ด้วย โดยโปรตีนมีบทบาทเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการหายใจซึ่งใช้ในการ recovery ของพืช

3.2 การปรับปริมาตรเซลล์ (passive solute accumulation) เกิดขึ้นได้เนื่องจากผนังเซลล์มีความยืดหยุ่น (cell wall elasticity) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการรักษาความเต่งของเซลล์ Noy-Meir and Ginzburg (1969) รายงานว่า เมื่อปริมาณน้ำและค่า water potential ในเนื้อเยื่อลดลง เนื้อเยื่อที่มีค่า elasticity สูงขึ้น จะรักษา turgor pressure ได้ดีกว่าเนื้อเยื่อที่มีค่า elasticity ต่ำ และจากการศึกษาของ Knapp (1984) พบว่า หญ้า little bluestem (*Andropogon scoparius*) เป็นหญ้าที่ทนแล้งได้ดีที่สุด มีการปรับค่า osmotic potential โดยการปรับปริมาตรเซลล์ เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่มี elasticity สูง และมีการสะสมตัวถูกละลายร่วมด้วย จึงทำให้ปรับตัวอยู่ในสภาพที่ขาดน้ำได้ดีกว่าหญ้า big bluestem (*Andropogon gerardii*) ซึ่งมีการปรับค่า osmotic potential โดยการปรับปริมาตรเซลล์เพียงอย่างเดียว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้า

การชักนำชิ้นส่วนของพืชวงศ์หญ้าให้เกิดแคลลัสนั้นสามารถชักนำได้จากทุกส่วน แต่ส่วนที่เกิดได้ดีคือ ปลายยอด ปลายราก ใบอ่อน ช่อดอกอ่อน และเมล็ด โดยนำชิ้นส่วนเหล่านี้เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้า เช่น

ธนภักย์ (2545) เพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้า *Paspalum atratum* พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสคือ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-dichlorophenoxy acetic

acid (2, 4-D) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์

Chen *et al.* (2001) เพาะเลี้ยงเมล็ดหญ้าแพงโกล่า (*Digitaria decumbens*) (cv. A254) บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ naphthalene acetic acid (NAA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus)

Wang *et al.* (2002) เปรียบเทียบชนิดของออกซินในการชักนำเมล็ดหญ้าให้เกิดแคลลัสพบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้เมล็ดหญ้า Russian wildrye (*Psathyrostachys junceus* (Fisch.) Nevski) เกิดแคลลัส คือ อาหารสูตร MS ที่มี 2, 4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเกิดแคลลัส ภายใน 6-8 สัปดาห์ ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้คือ อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Osuna and Barrow (2004) ศึกษาชนิดของออกซินที่มีผลต่อการเกิด somatic embryogenesis และการเกิดต้นใหม่จากของแคลลัสที่ชักนำจาก apical meristem จากต้นอ่อนของ *Bouteloua eriopoda* พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 3, 6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) ที่มีความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo และชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงสุดเช่นกัน

Salehi and Khosh-Khui (2005) เปรียบเทียบการชักนำแคลลัส และการพัฒนาไปเป็นต้นของหญ้าสนาม (turf grass) 4 สกุล พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสคือ อาหาร MS ที่มี 2, 4-D 60 ไมโครโมลาร์ โดยหญ้าสกุล *Poa* สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้คือ อาหารสูตร MS ที่มี 6-benzylaminopurine (BA) 7 ไมโครโมลาร์ โดยหญ้าสกุล *Cynodon* สามารถผลิตยอดต่อจำนวนแคลลัสได้สูงสุด

การคัดเลือกพืชหญ้าทนแล้งด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทในการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ หรือเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารทำให้เกิดสภาพเครียด ซึ่งตัวอย่าง

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนแล้ง โดยการคัดเลือกจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอย เช่น

ประภา (2538) คัดเลือกพันธุ์ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ทนแล้ง โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพที่ขาดน้ำซึ่งชักนำโดย PEG (polyethylene glycol 6000) 5 ระดับ 0, 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แคลลัสสามารถทน PEG ได้สูงสุดไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารที่เติม PEG 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

Smith *et al.* (1985) คัดเลือกพันธุ์ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) ทนแล้งโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพที่ขาดน้ำซึ่งชักนำโดย PEG (molecular weight 8000) 6 ระดับคือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าแคลลัสของข้าวฟ่างพันธุ์ RT×7000, RT×7078 และ RT×430 สามารถทน PEG ได้สูงสุดไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์

Biswas *et al.* (2002) คัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa*) ทนแล้งโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพที่ขาดน้ำซึ่งชักนำโดย PEG 4 ระดับ 0, 5, 10, 15 และ 15 กรัมต่อลิตร พบว่าข้าวพันธุ์ SR26-B และ C14-8 สามารถทน PEG ได้สูงสุดไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดหญ้ารูซี่ (*Urochloa ruziziensis*) จากแปลงปลูกโดยการผสมเปิดที่เก็บรวบรวมจากกรมปศุสัตว์
2. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น เครื่องชั่งไฟฟ้าที่อ่านค่าได้ถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytic balance) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ เครื่องแก้วชนิดต่างๆ บีกเกอร์ และปิเปต กระจกตวง จานแก้ว ขวดแก้ว ขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาปิด เป็นต้น
3. สารเคมี
 - 3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร
 - สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตรสังเคราะห์ Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962)
 - สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
 - 3.2 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
 - 3.3 สารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดชิ้นส่วนพืชทดลองและ การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สารละลายคลอโรกซ์ (Clorox®) (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) สารลดแรงตึงผิว (tween-20)

3.4 สารเคมีที่ใช้ทำลายการพักตัวของเมล็ดหญ้า ได้แก่ สารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการชักนำให้พืชอยู่ในสภาพขาดน้ำ ได้แก่ polyethylene glycol 6000

3.6 สารเคมีสำหรับย้อมสีเซลล์เพื่อตรวจสอบความมีชีวิต ได้แก่ fluorescein diacetate (FDA)

4. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ มีฟัดด์เบอร์ 10 ปากคืบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และจานแก้ว

5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางที่มีหลอดไฟเรืองแสงสีขาว ความเข้มของแสงประมาณ 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

6. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ และกล้องสเตอริโอ (stereo microscope)

7. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีของ Bates (1973)

8. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์แร่ธาตุองค์ประกอบใบพืช ได้แก่ เครื่อง atomic absorption and flame emission spectrophotometer (รุ่น AAnalyst 100)

9. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลาย เช่น หลอดนิตยา ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสและ vapor pressure osmometer (รุ่น Wescor 5500C)

10. เครื่องมือสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร (spectrophotometer)

วิธีการ

การเตรียมเมล็ดหญ้ารูซี่

นำเมล็ดมาทำการพักตัว โดยแช่ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (concentrate H_2SO_4) นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนาน 3-5 นาที แล้วแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมสารลดแรงตึงผิว 2 หยดต่อสารละลาย 150 มิลลิลิตร นาน 15 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมสารลดแรงตึงผิว 2 หยดต่อสารละลาย 150 มิลลิลิตร นาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

การทดลองที่ 1 การชักนำเมล็ดหญ้ารูซี่ให้เกิดแคลลัส และการเพิ่มปริมาณแคลลัส

1.1 ผลของ 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดหญ้ารูซี่ให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดหญ้ารูซี่ที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 9, 11.3, 13.5 ไมโครโมลาร์ นาน 28 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (complete randomize design CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ค่าสังเกต บันทึกขนาดของแคลลัสโดยการกำหนดเป็นคะแนน

1.2 ผลของ 2, 4-D ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสของเมล็ดหญ้ารูซี่ที่เพาะเลี้ยงได้จากการทดลองที่ 1.1 มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 2.2, 4.5, 6.8 และ 9 ไมโครโมลาร์ นาน 28 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ค่าสังเกต บันทึกขนาดของแคลลัสโดยการกำหนดเป็นคะแนน

กำหนดค่าการให้คะแนนแคลลัสดังนี้

0 = ไม่เกิดแคลลัส

1 = แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.01-0.15 เซนติเมตร

2 = แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.16-0.25 เซนติเมตร

3 = แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.26-0.35 เซนติเมตร

4 = แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36-0.45 เซนติเมตร

5 = แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.46 เซนติเมตร ขึ้นไป

การทดลองที่ 2 ระดับการทนแล้งของแคลลัสและการคัดเลือกแคลลัสทนแล้งด้วย polyethylene glycol 6000

นำแคลลัสจากเมล็ดหนัญรุซึ่งที่เพาะเลี้ยงได้จากการทดลองที่ 1.2 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แคลลัสจาก 1 เมล็ดคือ 1 โคลน ชั่งน้ำหนักของแคลลัสเริ่มต้น นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี 2, 4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ โดยนำแคลลัสวางบนผ้าก๊อช แล้วเททับด้วยสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 5, 10, 15, 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (โดยมีค่า osmotic potential เท่ากับ 0, -0.05, -0.15, -0.30 และ -0.49 MPa ตามลำดับ) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงนาน 42 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ค่า สังเกต บันทึกผลโดยการชั่งน้ำหนักสดของแคลลัส

ศึกษาหาความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้อัตราการรอดตายร้อยละ 50 (LD_{50}) โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ PEG (แกน X) และการตายของแคลลัส (แกน Y) เพื่อนำไปกำหนดความเข้มข้นของ PEG ที่จะใช้คัดเลือกชุดควบคุม (LD_{50})

นำแคลลัสจำนวน 113 โคลน มาคัดเลือกด้วย PEG ที่ความเข้มข้นของ PEG ที่ระดับ (LD_{50}) ที่ทำให้อัตราการตายของแคลลัสเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน แล้วนำแคลลัสไปเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยคัดเลือกจากแคลลัสจากแคลลัสที่รอดชีวิต และสามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งจะได้แคลลัสจำนวน 22 โคลน จากนั้นคัดเลือกแคลลัสที่ทนแล้งได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสูงสุดจำนวน 2 โคลน และแคลลัสที่ทนแล้งได้ต่ำสุด มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดต่ำที่สุดจำนวน 2 โคลน ไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่อไป

ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมสีด้วย fluorescein diacetate (FDA) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์(w/v) ใน acetone

การทดลองที่ 3 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการของเซลล์หอยน้ำจืด

นำเซลล์ที่ได้จากการทดลองที่ 2 จำนวน 4 โคลน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 9 ไมโครโมลาร์ และ PEG 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยให้ PEG ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD สุ่มตัวอย่างละ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ชัน บันทึกผล น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง วิเคราะห์ปริมาณออสโมได้แก่ โปแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดค่าออสโมเตลลิตี

ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของเซลล์

สุ่มเซลล์จำนวน 5 ชัน หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณออสโม

3.2 ปริมาณโปแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมออสโม

ชั่งเซลล์ที่อบแห้งแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่จำนวน 3 ขวด และนำไปย่อยด้วยการเติมสารละลายกรดผสมระหว่างกรดไนตริกเข้มข้น (nitric acid) และกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (perchloric acid) อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 5 มิลลิเมตร อุ่นให้มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ปรับอุณหภูมิให้เป็น 150 องศาเซลเซียส ย่อยต่อไปประมาณ 1-2 ชั่วโมง ปรับอุณหภูมิให้เป็น 200 องศาเซลเซียส ย่อยต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายใส วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน เติมน้ำกลั่นลงในหลอดอย่างช้าๆ เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายลงในขวดเชิงปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เก็บสารละลายไว้ในขวด หาปริมาณออสโมจากสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกัน โดยวัดปริมาณโปแทสเซียมด้วยเครื่อง flame emission spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร ส่วนปริมาณแคลเซียม

แมกนีเซียม วัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 422.7 นาโนเมตร และความยาวคลื่น 285.2 นาโนเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณไอออน ในตัวอย่าง (ศรีสม, 2544)

$$\text{ปริมาณไอออนในตัวอย่างพีช (\% น้ำหนักสด)} = \frac{C_a \times V_d \times 10^{-4}}{W}$$

C_a = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในสารละลายที่วัดจากตัวอย่าง
 V_d = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพีชที่ได้จากการย่อยสลาย (100 มิลลิลิตร)
 W = น้ำหนักสดตัวอย่างพีช (กรัม)

3.3 ค่าออสโมแลลลิตีของสารละลายในเซลล์ของแคลลัส

สุ่มแคลลัส 5 ชิ้น ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตก ใส่ลงในหลอดฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร กดให้สารละลายในเซลล์ออกมา (Marcum and Murdoch, 1992) นำสารละลายดังกล่าวมาวัดค่าออสโมแลลลิตีด้วยเครื่อง Vapor Pressure Osmometer

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน

วิเคราะห์ปริมาณโพรลีนตามวิธีของ Bate (1973) ดังนี้

สุ่มแคลลัสจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น ชั่งแคลลัสสด 0.5 กรัม ใส่ในโกร่งแล้วเติมสารละลาย sulfosalicylic acid ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยากับ acid ninhydrin 2 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง จากนั้นอุ่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็ง สกัดสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับ toluene 4 มิลลิลิตร เขย่าจนเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้โดยชั้นของ toluene ที่มีสีจะแยกจากชั้นของน้ำ นำสารละลายในชั้นของ toluene ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง

spectrophotometer หาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณโพรีลินเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด จากสมการ

$$\text{ปริมาณโพรีลิน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)} = \frac{(C \times V_t \times V_s \times 100)}{(1000 \times W_t \times V_a \times 1000)}$$

C = ความเข้มข้นของโพรีลินจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

V_t = ปริมาตรของ toluene (มิลลิลิตร)

V_s = ปริมาตรของ sulfosalicylic 3% (มิลลิลิตร)

W_t = น้ำหนักสดของตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์ (กรัม)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ระยะเวลาการวิจัย

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2552 และสิ้นสุดการทดลองเดือน ธันวาคม
พ.ศ. 2553

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 การชักนำเมล็ดเหี่ยวราฐให้เกิดแคลลัส และการเพิ่มปริมาณแคลลัส

1.1 ผลของ 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดเหี่ยวราฐให้เกิดแคลลัส

ในการชักนำแคลลัสจากเมล็ดเหี่ยวราฐขึ้นอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ 0, 9.0, 11.3, 13.5 และ 15.8 ไมโครโมลาร์ พบว่า 2, 4-D เข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นการชักนำแคลลัสจากเมล็ดได้สูงสุด โดยคะแนนการเกิดแคลลัสเท่ากับ 2 แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable) (ภาพที่ 1) และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 85 (ตารางที่ 1)

1.2 ผลของ 2, 4-D ต่อการเพิ่มขนาดแคลลัส

ในการเพิ่มขนาดแคลลัสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ที่ลดความเข้มข้นลงเป็น 0, 2.2, 4.5, 6.8 และ 9.0 ไมโครโมลาร์ พบว่า 2, 4-D เข้มข้น 9.0 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นการเพิ่มขนาดแคลลัสได้สูงสุดโดยคะแนนของขนาดแคลลัสเท่ากับ 5 แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองเกาะกันแน่น (compact) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของ 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดเหี่ยวราซึ่งให้เกิดแคลลัส

ความเข้มข้น 2,4-D (ไมโครโมลาร์ต่อลิตร)	คะแนน ขนาดแคลลัส ^{1/}	% การเกิด แคลลัส	ลักษณะแคลลัส
0	0	0.0	-
9	1.0	82.5	สีขาวขุ่นปนเหลือง เกะก้นแน่น
11.3	1.0	85.0	สีขาวขุ่นปนเหลือง เกะก้นแน่น
13.5	2.0	85.0	สีเหลืองมีอากาศร่วนๆ เกาะกันอย่างหลวมๆ
15.8	1.5	82.5	สีเหลืองมีอากาศร่วนๆ เกาะกันอย่างหลวมๆ

^{1/} = การให้คะแนนขนาดแคลลัส

0 หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส

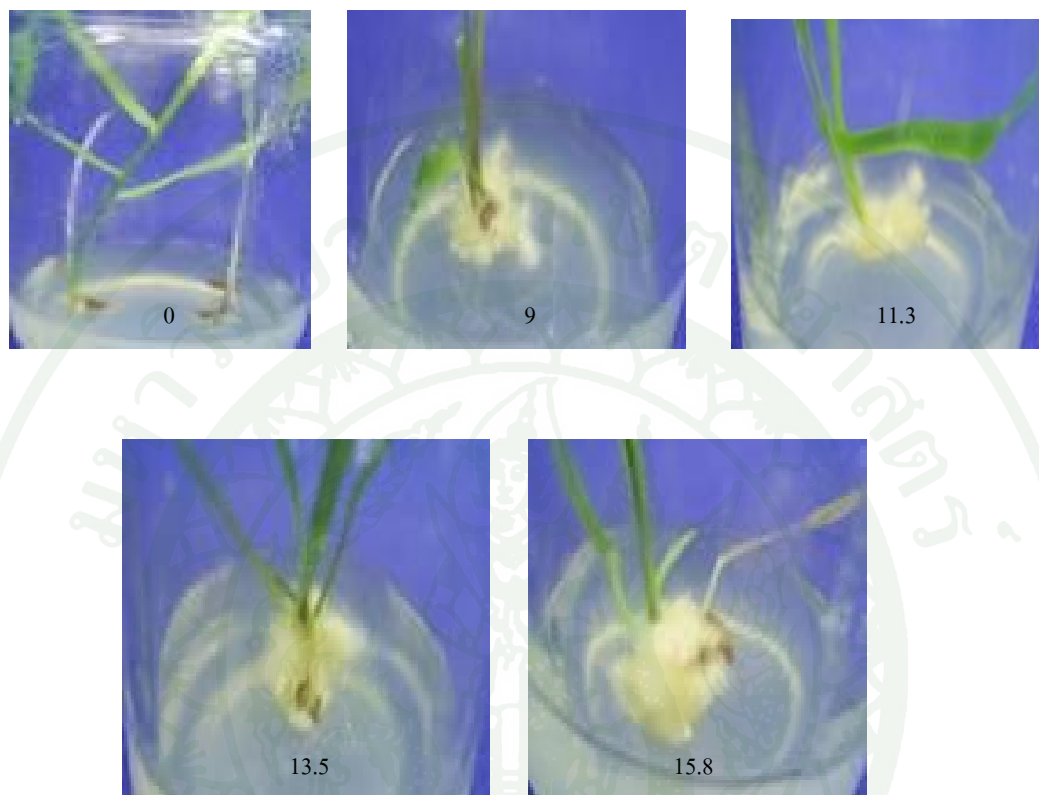
1 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.01-0.15 เซนติเมตร

2 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.16-0.25 เซนติเมตร

3 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.26-0.35 เซนติเมตร

4 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36-0.45 เซนติเมตร

5 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.46 เซนติเมตร ขึ้นไป



ภาพที่ 1 แคลลัสจากเมล็ดหน่อข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 9.0, 11.3, 13.5 และ 15.8 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 28 วัน

ตารางที่ 2 ผลของ 2, 4-D ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของหน่อรูชี

ความเข้มข้น 2,4-D (ไมโครโมลาร์ต่อลิตร)	คะแนน ขนาดแคลลัส ^{1/}	ลักษณะแคลลัส
0	1.0	ขาวนูนปนเหลือง เกะก้นแน่น
2.2	1.0	ขาวนูนปนเหลือง เกะก้นแน่น
4.5	1.0	ขาวนูนปนเหลือง เกะก้นแน่น
6.8	4.3	สีเหลืองมีอาการน้ำ เกาะกันอย่างหลวมๆ
9	5.0	สีเหลืองมีอาการน้ำ เกาะกันอย่างหลวมๆ

^{1/} = การให้คะแนนขนาดแคลลัส

0 หมายถึง ไม่เกิดแคลลัส

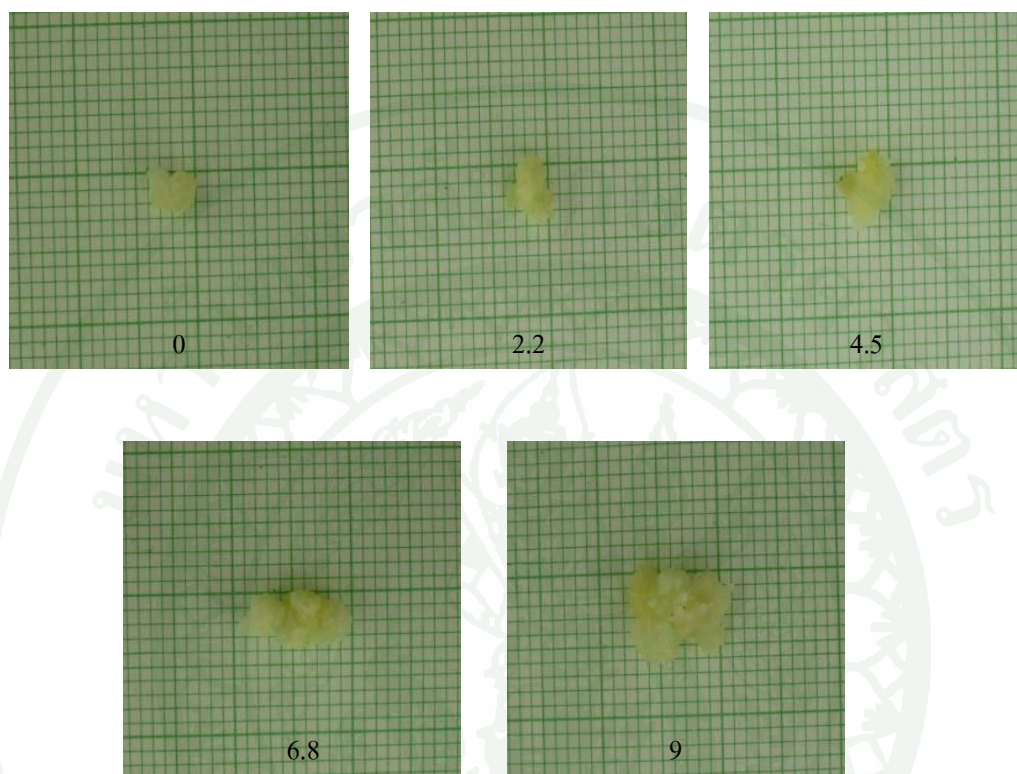
1 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.01-0.15 เซนติเมตร

2 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.16-0.25 เซนติเมตร

3 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.26-0.35 เซนติเมตร

4 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36-0.45 เซนติเมตร

5 หมายถึง แคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.46 เซนติเมตร ขึ้นไป

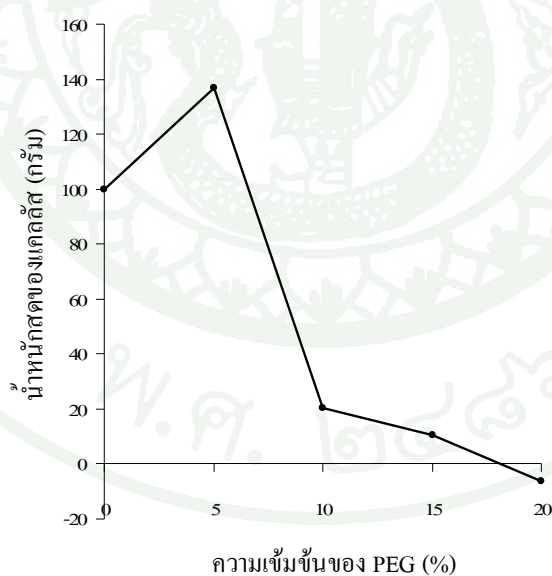


ภาพที่ 2 ขนาดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 2.2, 4.5, 6.8 และ 9.0 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 28 วัน

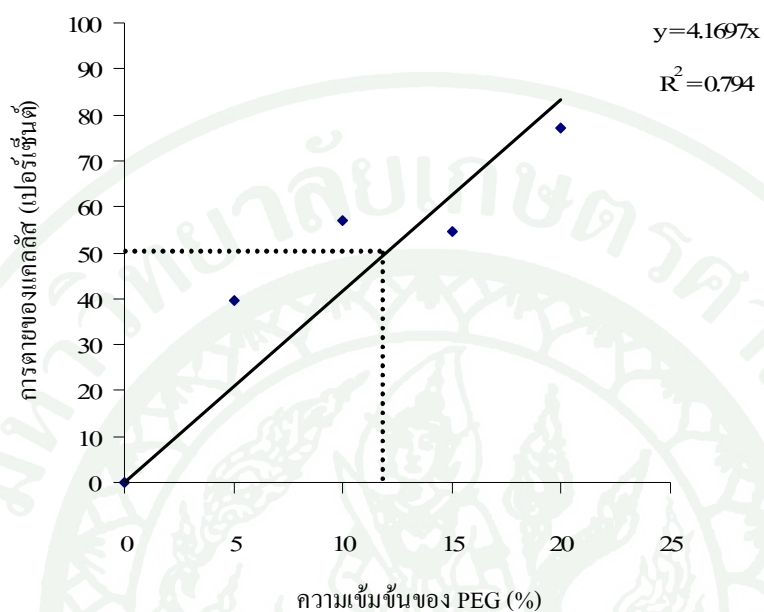
การทดลองที่ 2 ระดับการทนแล้งของแคลลัสและการคัดเลือกแคลลัสทนแล้งด้วย polyethylene glycol 6000

ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4-D เข้มข้น 9.0 ไมโครโมลาร์ ที่เททับด้วยสารละลาย polyethylene glycol (PEG) เข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 42 วัน พบว่าน้ำหนักสดของแคลลัสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น แต่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 5% มีน้ำหนักมากกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร ไม่เติม PEG (ภาพที่ 3)

การตายของแคลลัสจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ ที่ PEG ความเข้มข้น 20% และพบว่า PEG ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์นั้นทำให้อัตราการตายของแคลลัสเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม (ภาพที่ 4) จากนั้นนำความเข้มข้นของ PEG ที่ได้ไปคัดเลือกแคลลัสที่ทนแล้ง โดยคัดเลือกจากแคลลัสจำนวน 113 โคลน ซึ่งจะได้แคลลัสที่ทนแล้งจำนวน 22 โคลน ที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้



ภาพที่ 3 ผลของ PEG ต่อน้ำหนักสดของแคลลัสหูกูรูซี่ เมื่อได้รับ PEG นาน 42 วัน



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้น PEG และอัตราการตายของเซลล์สหรูชี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี 2, 4-D เข้มข้น 9.0 ไมโครโมลาร์ ที่เททับด้วยสารละลาย polyethylene glycol (PEG) ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 42 วัน

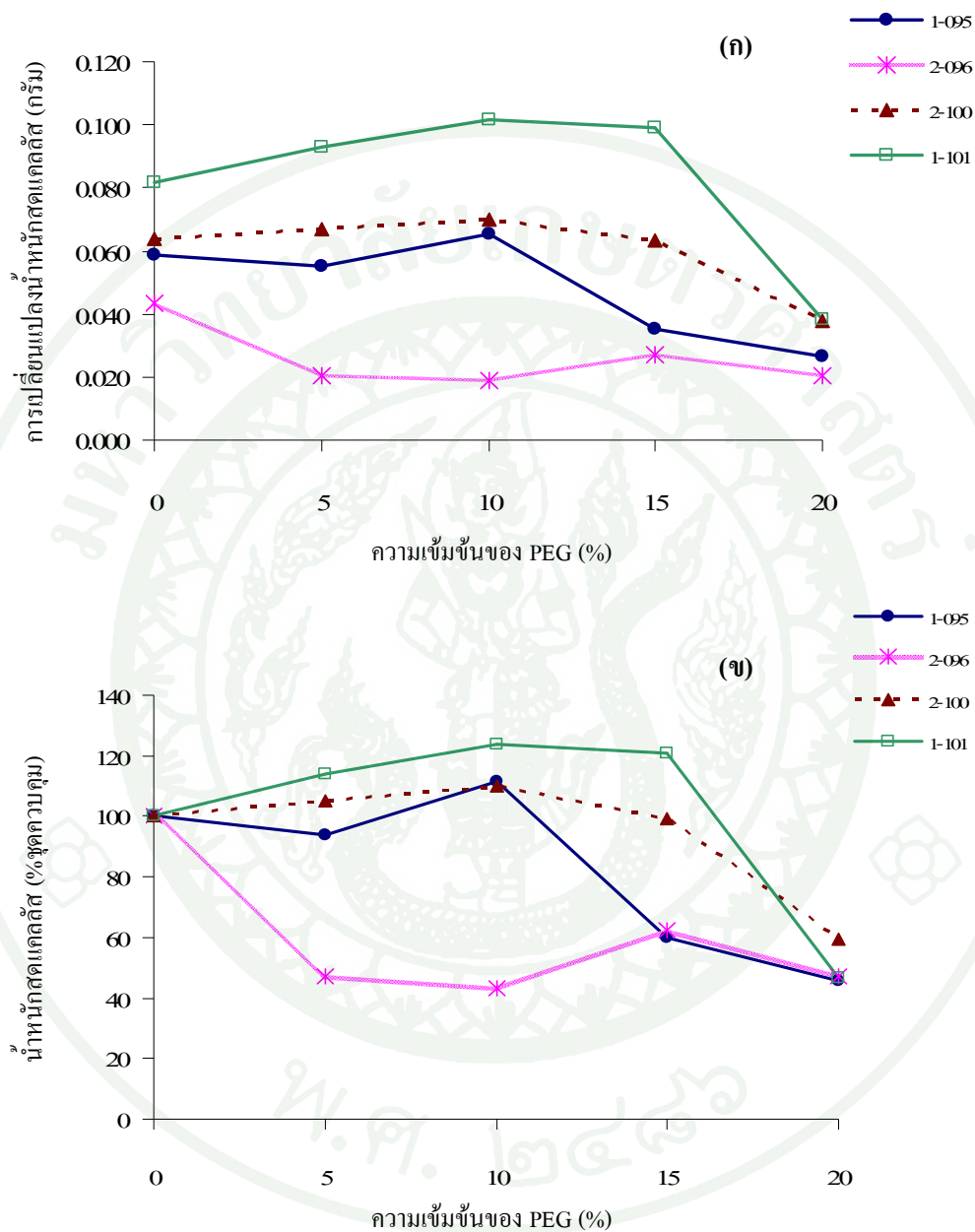
การทดลองที่ 3 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการของแคลลัสหญาฐิ

นำแคลลัสโคลนที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกด้วย PEG ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี 2, 4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ พบว่าโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสูงสุด หรือทนแล้งมากที่สุด คือ 1-101 และ 2-100 โคลนที่มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดต่ำสุด หรือทนแล้งน้อยที่สุด คือ 1-095 และ 2-096 แล้วจากนั้นนำไปศึกษาการเติบโต ปริมาณออออน ค่าออสโมแลลลิตีของ สารละลายในเซลล์ ปริมาณน้ำในเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณโพรตีน เพื่อศึกษาการตอบสนองที่ แตกต่างกันของแคลลัส 2 กลุ่ม โดยให้แคลลัสได้รับ PEG ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ซึ่งได้ผลดังนี้

3.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของแคลลัส

แคลลัสของหญาฐิที่ทนแล้งได้แตกต่างกัน เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า แคลลัสโคลน 1- 101 ที่ทนแล้งได้สูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์ชดควบคุม) สูงกว่าชดควบคุม (113, 124 และ 120 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-15 เปอร์เซ็นต์ และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดลดลง ที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (46 เปอร์เซ็นต์) ส่วน โคลน 2-100 ซึ่งเป็น โคลนที่ทนแล้งได้ดี เช่นกันมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดสูงกว่าชดควบคุมเล็กน้อยที่ PEG ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ (104 และ 109 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และลดลงต่ำกว่าชดควบคุมที่ PEG ความเข้มข้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ (99 และ 59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ส่วน โคลน 1-095 ซึ่งเป็น โคลนที่ทนแล้งได้น้อยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดที่ลดต่ำกว่าชดควบคุมมากที่ PEG ความเข้มข้น 5, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (93, 60, 45 เปอร์เซ็นต์) และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (111 เปอร์เซ็นต์) ส่วน โคลน 2-096 ซึ่งทนแล้งน้อยเช่นกันพบว่ามี น้ำหนักสดที่ลดลงต่ำกว่าชดควบคุมมาก ที่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5-6) สำหรับ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งแคลลัสของโคลน 1-101 และ 2-100 ซึ่งเป็น โคลนที่ทนแล้ง พบว่ามีการตอบสนองเหมือนกับเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ ยกเว้นที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์นั้นพบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งลดลงเล็กน้อย (110 และ 97 เปอร์เซ็นต์) ส่วน โคลน 1-095 และ 2-096 ซึ่งเป็น โคลนที่ทนแล้งได้น้อยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดเช่นกัน (ภาพ ที่ 7-8)

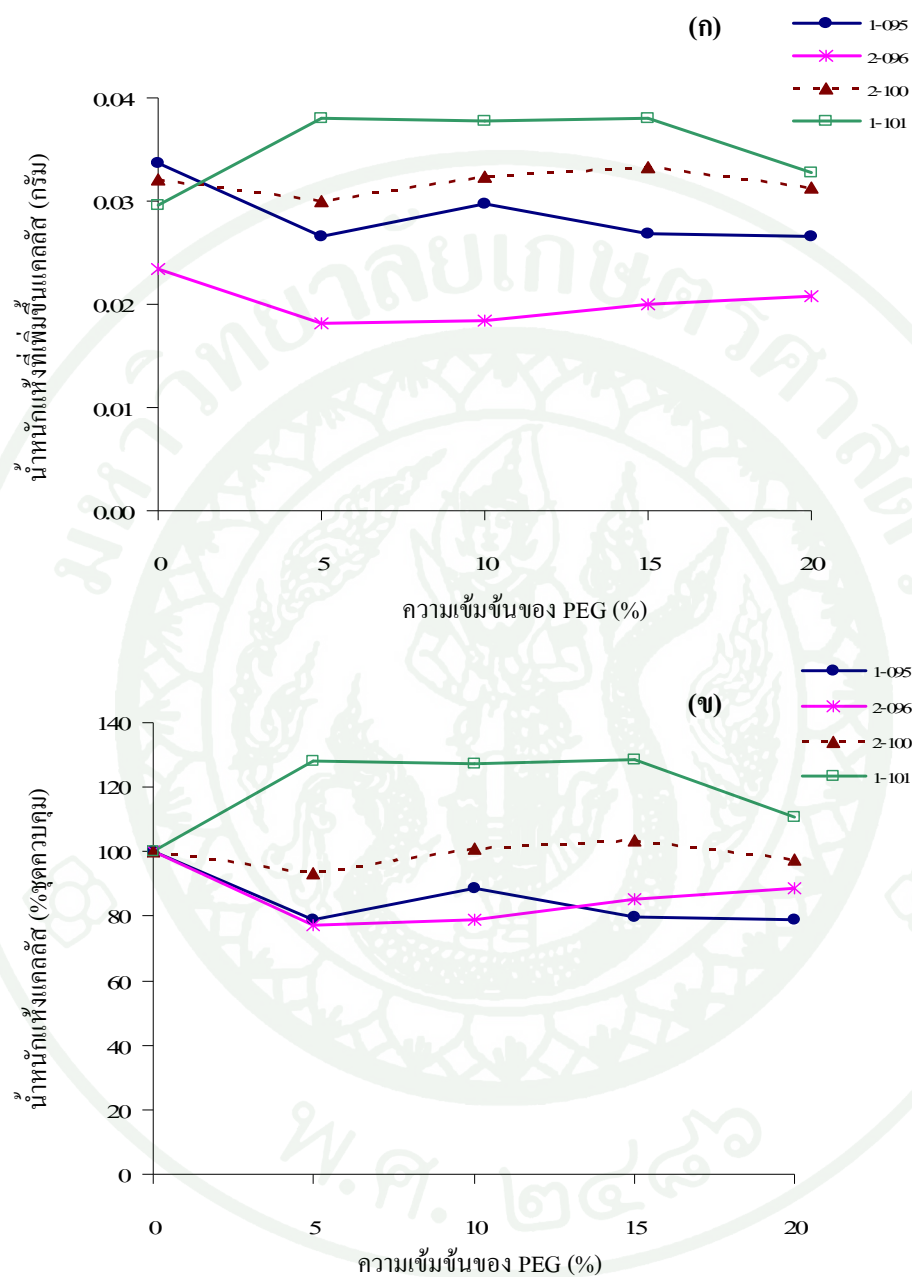
จากการศึกษาการเติบโตของแคลสสผู้สูงอายุที่ได้รับ PEG ที่ได้รับ PEG เป็นเวลา 30 วัน พบว่า แคลสสโคลน 1-101 มีน้ำหนักแห้งของแคลสสเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพที่มีความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 5-15 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักแห้งทำชุดควบคุม เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 2-100 มีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม เมื่ออยู่ในสภาพที่มี PEG 5-20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โคลน 1-095 และ 2-096 น้ำหนักแห้งของแคลสสจะลดลงเมื่อเติบโตอยู่ในอาหารที่มี PEG 5-20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7-8)



ภาพที่ 5 ผลของ PEG ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแคลลัสหูกุ้งเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

(ก) น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม)

(ข) น้ำหนักสดของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์ของความเดิม)



ภาพที่ 6 ผลของ PEG ต่อน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นแคลลัสหญาฐี (กรัม) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

(ก) น้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นของแคลลัส (กรัม)

(ข) น้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์ชุดควบคุม)

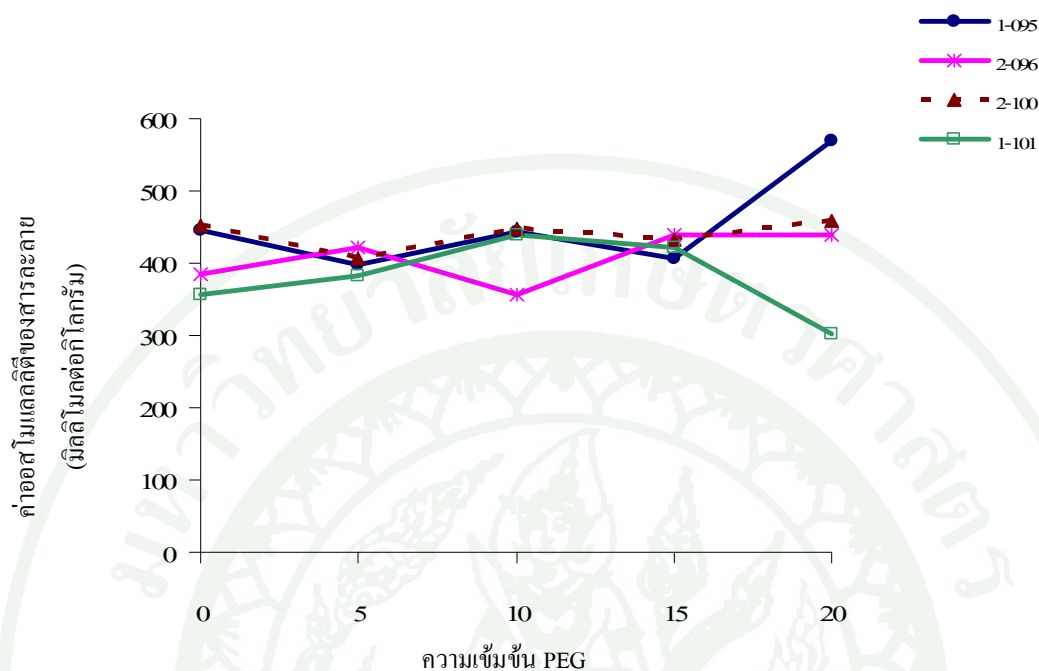
3.2 ค่าออสโมแลลลิตีของสารละลายในเซลล์ และปริมาณน้ำในเซลล์ของแคลลัส

ค่าออสโมแลลลิตีของสารละลายในเซลล์

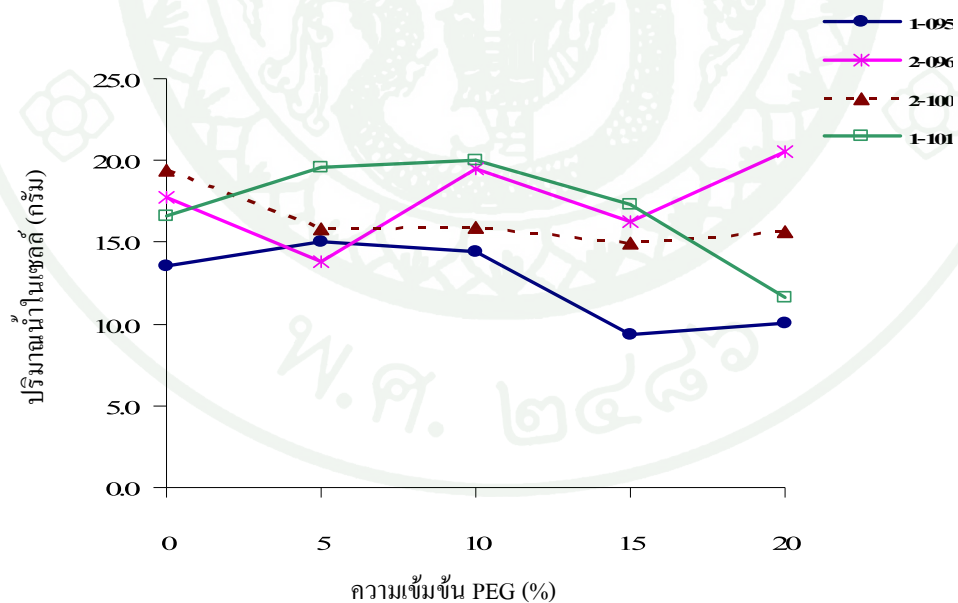
สำหรับค่าออสโมแลลลิตี (osmolality) หรือความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ของโคลนที่ทนแล้งได้ดีคือโคลน 1-101 พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อแคลลัสได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์และลดลงที่ PEG ความเข้มข้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 2-100 และ 1-095 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี และทนแล้งได้น้อยนั้นมีแนวโน้มที่คล้ายกันคือที่ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าออสโมแลลลิตีลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมและเพิ่มขึ้นที่ PEG 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนออสโมแลลลิตีของโคลน 2-100 คงที่ ที่ PEG ความเข้มข้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์นั้น แต่แคลลัสโคลน 1-095 มีค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้นที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 2-096 นั้นมีค่าออสโมแลลลิตีที่ตรงข้ามกับโคลน 2-100 กล่าวคือ ค่าออสโมแลลลิตีลดลง และเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าออสโมแลลลิตีที่คงที่เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11)

ปริมาณน้ำในเซลล์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำในเซลล์ของโคลน 1-101 และ -095 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้มากที่สุด และทนแล้งได้น้อยที่สุดตามลำดับนั้นคล้ายกันคือ เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 0-10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำในเซลล์จะคงที่ และลดลงที่ PEG ความเข้มข้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 2-100 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดีเช่นกัน มีปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงที่ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมื่อ PEG ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (10-20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำในเซลล์ค่อนข้างคงที่ ส่วนโคลน 2-096 มีปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงที่ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเพิ่มขึ้นที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อ PEG ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำในเซลล์จะคงที่ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 7 ผลของ PEG ต่อค่าออกซิเจนแลติติงของสารละลายของแคลลัสหูกุ้ง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 8 ผลของ PEG ต่อปริมาณน้ำในเซลล์ของแคลลัสหูกุ้ง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

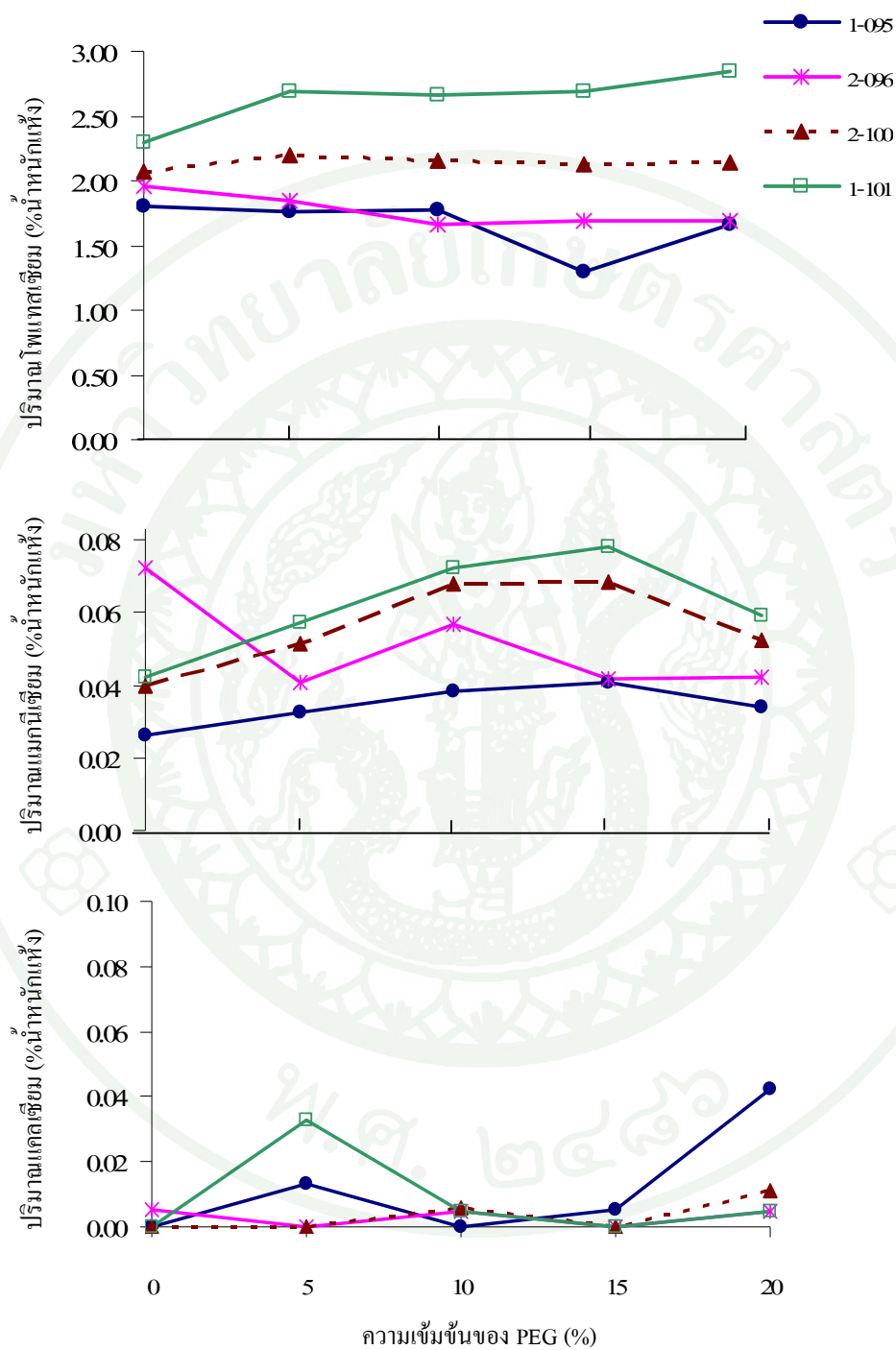
3.3 ปริมาณอออน

จากการนำแคลสท์ไฮดรูซีที่ทนแล้งมากโคลน 1-101 และ 2-100 และทนแล้งน้อยโคลน 1-095 และ 2-096 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร และเติม PEG ที่ความเข้มข้น 0-20 เปอร์เซ็นต์ นำมาวิเคราะห์ปริมาณอออนพบว่า

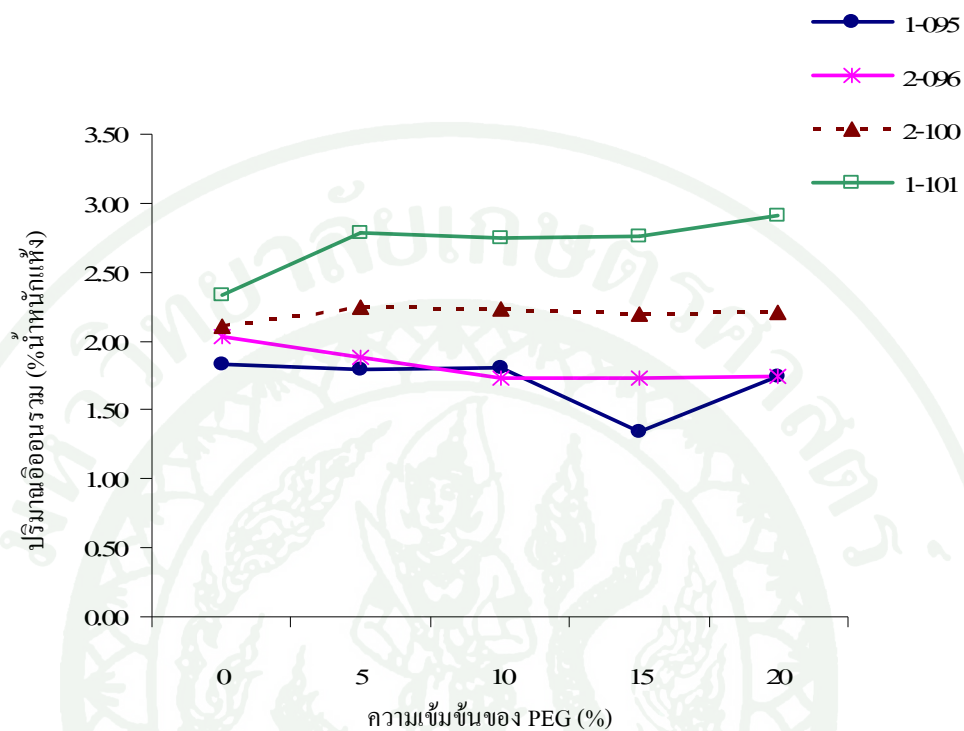
โพแทสเซียม ไฮดรูซี โคลน 1-101 ซึ่งทนแล้งได้มากที่สุด และ 1-095 ซึ่งทนแล้งได้น้อยที่สุด มีปริมาณโพแทสเซียมอออนในแคลสท์สูงกว่าชุดควบคุม เมื่อความเข้มข้นของ PEG ที่ได้รับเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ โคลนที่ 1-101 ส่วน โคลน 2-100 และ 2-096 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้มาก และน้อย พบว่าปริมาณโพแทสเซียมอออนนั้นค่อนข้างคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ระหว่าง 5-20 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะแคลสท์โคลน 2-100 (ภาพที่ 9)

แมกนีเซียม สำหรับการสะสมปริมาณแมกนีเซียมอออนในแคลสท์ไฮดรูซีพบว่ามีการสะสมแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นเมื่อแคลสท์ได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ โดยโคลน 1-101, 2-100 ที่ทนแล้งมาก และ 1-095 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้น้อย มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันคือ เมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น โดยเฉพาะ โคลน 1-101 และ 2-100 พบว่ามีปริมาณแมกนีเซียมอออนเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุม และ โคลน 1-095 ส่วนแคลสท์โคลน 2-096 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้น้อยนั้น พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นปริมาณแมกนีเซียมอออนในแคลสท์จะลดลงยกเว้นที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จะมีปริมาณแมกนีเซียมอออนเพิ่มขึ้นแต่น้อยกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 9)

แคลเซียม ปริมาณแคลเซียมอิสระในแคลสท์ไฮดรอกซีโคลน 1-101 ที่ทนมาก และ 1-095 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้น้อยนั้น มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันคือ เมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้นในแคลสท์ของทั้งสองโคลนจะมีปริมาณแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะ โคลน 1-095 พบว่ามีปริมาณแคลเซียมเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุม และ โคลน 1-101 และพบว่าที่ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แคลสท์ โคลน 1-101 มีปริมาณแคลเซียมสูงกว่าโคลน 1-095 ส่วนแคลสท์โคลน 2-100 และ 2-096 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้มาก และทนแล้งได้น้อยเช่นกันนั้นมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียมอิสระที่คล้ายกันคือ เมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นปริมาณแคลเซียมในแคลสท์จะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ โคลน 2-100 มีปริมาณแคลเซียมสูงกว่าชุดควบคุมและ โคลน 2-096 (ภาพที่ 9)



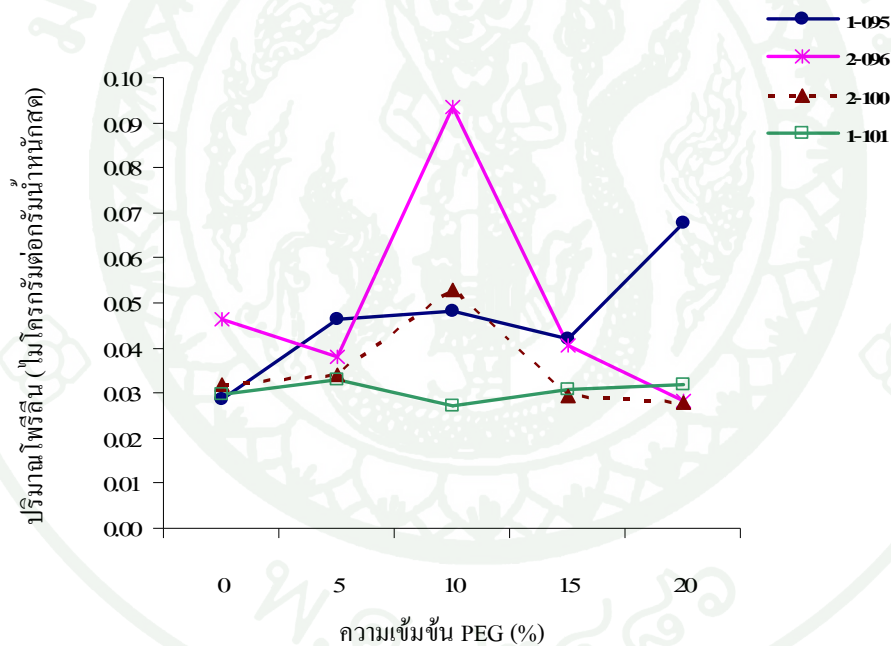
ภาพที่ 9 ผลของ PEG ต่อปริมาณไอออนในแคลลัสหนูรัฐ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 10 ผลของ PEG ต่อปริมาณไอออนรวม (โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียมไอออน) ในแคลคัสทูรูซี่ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

3.4 ปริมาณโพรตีน

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของโพรตีนพบว่า โคลน 1-101 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งมาก พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโพรตีนค่อนข้างน้อยเมื่อได้รับPEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 2-100 พบว่า ปริมาณโพรตีนค่อนข้างคงที่เช่นกันยกเว้นที่PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แคลสมีปริมาณโพรตีนเพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม สำหรับโคลนที่ทนแล้งได้น้อยคือ โคลน 1-095 พบว่าปริมาณโพรตีนในแคลสเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับPEG ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโพรตีนที่ได้รับสูงสุดที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 2-096 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพรตีนเหมือนกับโคลน 2-100 แต่ปริมาณโพรตีนของโคลน 2-096 นั้นสูงกว่า โคลน 2-100



ภาพที่ 11 ผลของ PEG ต่อปริมาณโพรตีนของแคลสผู้ารู้ชื่อ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

วิจารณ์

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคในการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ (แคลลัส) บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารทำให้เกิดสภาพเครียดของน้ำ เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของน้ำเนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสนี้ทำให้เห็นพัฒนาการของเซลล์ในระยะต่างๆซึ่งจะแสดงถึงความสามารถในการทนต่อสภาพเครียดของน้ำของแคลลัส (Tewary *et al.*, 2000) ในการทดลองนี้จึงคัดเลือกแคลลัสหุ้ญารูซึ่งมีระดับการทนแล้งแตกต่างกันมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการ

การชักนำเมล็ดหุ้ญารูให้เกิดแคลลัส และการเพิ่มปริมาณแคลลัส

ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดหุ้ญารูซึ่งโดยอาหารที่เติม 2, 4-D พบว่า 2, 4-D ความเข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์กระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการชักนำแคลลัสจากเมล็ดหุ้ญารู Napier (*Pennisetum purpureum*) และ Indiangrass (*Sorghastrum nutans* (L.) Nash.) ที่พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (Bajaj and Dhanju, 1981 และ Lia *et al.*, 2009) เนื่องจาก 2, 4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation ซึ่งการที่ DNA ถูก methylate มากกว่าปกติ จะทำให้รูปแบบการเจริญเติบโตที่ถูกกำหนดไว้กับเนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เนื้อเยื่อไม่เจริญไปเป็นอวัยวะแต่จะเกิดเป็นแคลลัสแทน (Raven *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ 2, 4-D ในอาหารลดลงเป็น 9.0 ไมโครโมลาร์ Lia *et al.* (2009) กล่าวว่า ในการชักนำให้แคลลัสต้องการ 2,4-D ความเข้มข้นสูงและในขั้นตอนเพิ่มปริมาณแคลลัสควรใช้ 2, 4-D ความเข้มข้นต่ำลง ดังเช่นการชักนำแคลลัสจากเมล็ดหุ้ญารู Napier พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด และเมื่อต้องการเพิ่มปริมาณแคลลัสต้องลดความเข้มข้นของ 2, 4-D เป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Bajaj and Dhanju, 1981)

ระดับการทนแล้งของแคลลัสและการคัดเลือกแคลลัสทนแล้งด้วย polyethylene glycol 6000

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม PEG นาน 42 วัน พบว่า ความเข้มข้นของ PEG 12 เปอร์เซ็นต์ทำให้อัตราการตายของแคลลัสเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม และเมื่อความเข้มข้นของ PEG มากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตของแคลลัสจะลดลง และไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (แคลลัสมีสีน้ำตาล) เนื่องจาก PEG ทำให้ค่า osmotic potential ของสารละลายอาหารที่อยู่ล้อมรอบแคลลัสลดลง เมื่อ PEG ความเข้มข้นสูงเกินไป แคลลัสจึงไม่สามารถดูดซึมน้ำจากอาหารได้ เป็นสาเหตุให้แคลลัสอยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (Bressan *et al.*, 1981) นอกจากนี้พบว่าแคลลัสของหนักรูซี่ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 136.6 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม เนื่องจากเซลล์สามารถปรับค่า osmotic potential ให้ลดลงต่ำกว่าสารละลายภายนอก โดยการสะสม osmolyte ส่งผลให้เกิดการออสโมซิสของน้ำเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการเจริญเติบโต และน้ำหนักสดของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Handa *et al.* (1983) ที่พบว่าเซลล์แขวนลอยของมะเขือเทศหลายสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้นต่ำๆ (5 เปอร์เซ็นต์) จะมีน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น และพบว่าที่ PEG ความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตที่ลดลง และสอดคล้องกับการทดลอง (Hassan *et al.*, 2004) ซึ่งเพาะเลี้ยงแคลลัสของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L. cv Myak) ในสภาพเครียดของน้ำซึ่งชักนำโดย PEG พบว่า เมื่อค่า water potential ของ PEG เป็น -0.4 MPa แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้รับ PEG และเมื่อค่า water potential ของ PEG ลดลงเป็น -0.6 ถึง -10 MPa แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ลดลง

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการของแคลลัสหนักรูซี่

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแคลลัสหนักรูซี่ได้แก่ ปริมาณน้ำในเซลล์ ค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณอามิโน และปริมาณโพรตีน ซึ่งจะอธิบายถึงกลไกที่ทำให้แคลลัสแต่ละโคลนทนแล้งต่างกัน โดย

ปริมาณน้ำในเซลล์ จะแสดงถึงกลไก drought avoidant และ drought tolerant (Carmo-Silva *et al.*, 2007)

ออสโมแลลลิตีหรือ ความเข้มข้นสารละลายภายในเซลล์ แสดงถึง การปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ (Clifford, 1998; Almansourictal, 2000; Huang, 2006)

ปริมาณออสโมส แสดงถึง การปรับค่า osmotic potential ภายในแวคิวโอล โดย ใช้ตัวถูกละลายอินทรีย์ (Marschner, 1995; Clifford *et al.*, 1998; Hopkins, 1999; Shaul, 2002)

ปริมาณโปรตีน แสดงถึง การปรับค่า osmotic potential ภายใน cytoplasm โดยใช้ตัวถูกละลายอินทรีย์ให้สมดุลกับภายในแวคิวโอล (Handa *et al.*, 1983; Boyer 1983; Morgan, 1984)

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการปรับค่า osmotic potential ของแคลลัส หนักรูชี 4 โคลน มีดังนี้

แคลลัสโคลน 1-101 ซึ่งเป็น โคลนที่ทนแล้งได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์ชดควบคุม) สูงกว่าชดควบคุมเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-15 เปอร์เซ็นต์ และสูงสุดเมื่อเทียบกับโคลนอื่นๆ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางภาคผนวกที่ 2 และ 3) อีกทั้ง ปริมาณน้ำในเซลล์นั้นเพิ่มขึ้นสูงกว่าชดควบคุมเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าการปรับค่าออสโมแลลลิตี นั้นมีประสิทธิภาพ กล่าวคือ ทำให้น้ำจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นได้ ทำให้ เซลล์รักษาความเต่งไว้ได้ จึงทำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัส (Almansourictal, 2000; Huang, 2006) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าที่ PEG ความเข้มข้น 5-15 เปอร์เซ็นต์ ค่าออสโมแลลลิตีนั้นสูงกว่า ชดควบคุม (382 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม) และเมื่อ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งจะลดต่ำกว่าชดควบคุม ขณะที่ปริมาณน้ำใน เซลล์ลดต่ำกว่าชดควบคุมมาก แสดงให้เห็นว่า PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์ สูญเสียน้ำจนมีผลกระทบต่อการเติบโตของแคลลัส โดยสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์แขวนลอย ของพริก (*Capsicum annuum* L.) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเครียดของน้ำที่สูง (PEG ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เป็น 15-30 เปอร์เซ็นต์) มีการเจริญเติบโตที่ลดลง เนื่องจากไม่สามารถรักษาความเต่งของเซลล์ไว้ได้ ซึ่งส่งผลให้กระบวนการเมแทบอลิซึมหยุดชะงัก ในขณะที่เซลล์แขวนลอยของพริกที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 0-10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสด และปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น และพบว่าแคลลัสหนักรูชีที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณน้ำในเซลล์ที่ต่ำกว่าชดควบคุมมาก (70 เปอร์เซ็นต์ ของชดควบคุม) แต่ยังคงการเจริญเติบโตให้สูงเท่ากับชดควบคุมได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจาก

แคลลัสโคลน 1-101 อาจมีผนังเซลล์ที่ยืดหยุ่นมากโดยสอดคล้องกับ Clifford *et al.* (1998) ที่กล่าวว่า ที่ค่า osmotic potential หนึ่งๆ การเพิ่ม elasticity ช่วยให้การคงความเต่งเกิดขึ้นได้ในช่วง water content ที่กว้างขึ้นโดยการลดปริมาณของเซลล์ทำให้ตัวถูกละลายมีความเข้มข้นมากขึ้น

สำหรับปริมาณอออนในแคลลัสหน่อชูรู่โคลน 1-101 ซึ่งมีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-15 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้น พบว่า ปริมาณโพแทสเซียมอออนเพิ่มขึ้นที่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ PEG ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์แล้วลดลงเล็กน้อยที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนปริมาณแคลเซียมอออนเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ PEG 5 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นไปได้ว่า อออนเหล่านี้มีบทบาทในการปรับค่า osmotic potential ในส่วนของแวคคิวโอลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง โพแทสเซียม การสะสมอออนนี้จะช่วยให้พืชสามารถปรับตัวอยู่ในสภาพเครียดของน้ำได้ โดยอออนจะช่วยลดค่า water potential ภายในเซลล์ ทำให้การดูดซึมน้ำยังคงดำเนินต่อไปได้ (Morgan, 1984; Munns, 1988) และการที่พืชสามารถรักษาระดับโพแทสเซียม และแมกนีเซียมอออนไว้ได้จะเป็นประโยชน์กับพืช เนื่องจากโพแทสเซียมอออนเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น รักษาความเต่งภายในเซลล์ให้เป็นปกติโดยการปรับค่า osmotic potential ให้ภายในเซลล์สมดุลกับภายนอกเซลล์ (Hopskins, 1999; Taiz and Zeiger, 2002;) ส่วนแมกนีเซียม นั้นมีบทบาทสำคัญ คือช่วยกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ และเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น RNA polymerases, ATPases, protein kinases, phosphatases, glutathione synthase and carboxylases เป็นต้น (Shaul, 2002; Hopskins, 1999) นอกจากนี้ แมกนีเซียมที่เป็นอออนอิสระ (free Mg^{2+}) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในแวคคิวโอลนั้นทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของประจุ และควบคุมความเต่งของเซลล์ (Marschner, 1995) แต่ในแคลลัสหน่อชูรู่ไม่มีคลอโรฟิลล์ ดังนั้นบทบาทของแมกนีเซียมจึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ การควบคุมสมดุลของประจุ นอกจากนี้ยังอาจมีส่วนการปรับค่า osmotic potential ของสารละลายภายในเซลล์ ดังการทดลองของ Errabii *et al.* (2006) ซึ่งเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อย (*Saccharum officinarum* Linn.) ในสภาพเครียดของน้ำซึ่งถูกชักนำโดยแมนนิทอล (mannitol) พบว่าเมื่อค่า water potential ต่ำสุด (-1.08 MPa) แคลลัสจะมีการสะสมแมกนีเซียมอออนเพื่อใช้ในการปรับค่า osmotic potential

เมื่อความเข้มข้นของ PEG ที่แคลลัสของหน่อชูรู่ได้รับสูงขึ้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ค่าออสโมแลลลิตีลดลงเช่นเดียวกับปริมาณน้ำในเซลล์ที่ลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า

เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ ในขณะที่ปริมาณออสโมล (โพแทสเซียม แมกนีเซียมไอออน) ยังคงสูงกว่า หูดควบคุม จึงเป็นไปได้ว่าออสโมลเหล่านี้ไม่ได้สะสมอยู่ในแวคิวโอล แต่อาจรั่วออกสู่ภายนอกเซลล์ คือบริเวณ intercellular space และผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรากและเหง้า ที่เพิ่มขึ้นที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นั้นลดลง ซึ่งอาจเกิดจากเมมเบรนได้รับผลกระทบจาก water stresss เห็นได้จากปริมาณแคลเซียมไอออนที่ลดลงที่ PEG ความเข้มข้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ Abdel-Basset (1998) กล่าวว่าแคลเซียมไอออนนั้นเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการทำให้เมมเบรนคงสภาพอยู่ได้ภายใต้สภาพเครียดของน้ำ โดยสอดคล้องกับ Hassan *et al.* (2004) เพราะเลี้ยงแคลลัส ทานตะวันในสภาพเครียดของน้ำที่ชักนำโดย PEG พบว่าแคลลัสพันธุ์ที่ทนแล้งมากที่สุดมีการ สะสมออสโมลโดยเฉพาะ โพแทสเซียมไอออน มากกว่าพันธุ์ที่ทนน้อยกว่า และ Javed (2002) เพราะเลี้ยง แคลลัสข้าวสาลีในสภาพเครียดของน้ำที่ชักนำโดย NaCl พบว่า เมื่อแคลลัสข้าวสาลีได้รับ NaCl ความ เข้มข้นสูงขึ้น แคลลัสพันธุ์ที่ทนเค็มสูงสุดมีการสะสมออสโมล (K^+ , Na^+) มากกว่าแคลลัสพันธุ์ที่ทน เค็มน้อยกว่า

ในส่วนของโพรลีนซึ่งเป็นตัวทำลายอินทรีย์ พบว่าปริมาณโพรลีน ในแคลลัสโคลน 1-101 ก่อนข้างคองที่ ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลลิตี แสดงให้เห็นว่าโพรลีน ไม่มีบทบาทในการปรับค่า osmotic potential ภายในไซโทพลาสซึมของแคลลัสโคลนนี้นี้ แต่อาจใช้ ตัวถูกละลายตัวอื่นเช่น ไกลซีนบีเทน หรือ soluble sugar (Diaz and Alejo, 1994; Volkmar *et al.*, 1997)

แคลลัสโคลน 2-100 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดีเช่นกันพบว่า การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักราก และเหง้าที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์หูดควบคุม) ลดลงเล็กน้อย และก่อนข้างคองที่เมื่อได้รับ PEG ความ เข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงเล็กน้อย (81.85 เปอร์เซ็นต์) ที่ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 81.85 เปอร์เซ็นต์ของหูดควบคุม และก่อนข้างคองที่ ที่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ (มีค่าเท่ากับ 81.85-80.65 เปอร์เซ็นต์ของหูดควบคุม) และค่าออสโมลลิตีนั้นก่อนข้างคองที่เช่นกัน การที่แคลลัสยังคงมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาพเครียด จากการขาดน้ำ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการปรับค่า osmotic potential ทำให้ค่า water potential ภายใน เซลล์ต่ำกว่าสารละลายภายนอก ทำให้สามารถดูดซึมน้ำเข้าสู่เซลล์ จึงสามารถรักษาการเจริญเติบโต ไว้ได้ แต่การปรับค่า osmotic potential ที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มากดังเช่นโคลน 1-101 จึงทำให้ค่าออสโมลลิตีเปลี่ยนแปลงไปไม่มากเมื่อ PEG ที่ได้รับเพิ่มขึ้น

สำหรับการปรับค่า osmotic potential ในสภาพที่พืชขาดน้ำนั้นมี 2 วิธีคือ โดยการสะสมสารละลาย (active accumulation) และโดยการลดปริมาตรเซลล์ (passive solute accumulation) อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ใช้กลไกการปรับค่า osmotic potential โดยการลดปริมาตรเซลล์หรือปริมาณของน้ำในเซลล์ลงได้ เนื่องจากสภาพเครียดจากการขาดน้ำทำให้ผนังเซลล์มีความยืดหยุ่นมากขึ้น ซึ่งการลดปริมาตรเซลล์นี้จะทำให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายในเซลล์เพิ่มขึ้น ในกรณีเช่นนี้ค่า osmotic potential จะไม่แตกต่างกับสภาพที่ไม่ขาดน้ำมากนัก ซึ่งจะช่วยให้พืชรักษาความเต่งไว้ได้ และเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตต่อไปในสภาพที่ขาดน้ำ (Morgan, 1984; Clifford *et al.*, 1998) การที่สันนิษฐานว่าเซลล์ของโคลน 2-100 ใช้กลไกการลดปริมาตรเซลล์ เนื่องจากพบว่า เมื่อได้รับ PEG มากขึ้น ค่าออสโมแลลลิตีของโคลนนี้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม นอกจากนี้ปริมาณตัวถูกละลายที่สำคัญคือ โพลีแซ็กคาไรด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ก่อนข้างคกที่ ซึ่งแสดงว่าไม่มีการสะสมออสโมไนต์ในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่เซลล์ยังสามารถเจริญเติบโตได้เท่ากับชุดควบคุม

ในส่วนของคุณสมบัติโปรตีนนั้นก่อนข้างคกที่ แต่พบว่าที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนสูงกว่าชุดควบคุม แต่ไม่สัมพันธ์กับค่าออสโมแลลลิตี แสดงว่า โปรตีนไม่มีบทบาทในการปรับค่า osmotic potential ของสารละลายภายในเซลล์ แต่โปรตีนมีบทบาทอื่นที่สำคัญคือทำหน้าที่เป็น osmoprotectant ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพของเมมเบรน รักษาโครโมเลกุล ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตในสภาพเครียดจากการขาดน้ำได้ (Pollard and Jones 1979; Nash *et al.*, 1982)

เซลล์โคลน 1-095 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้น้อยที่สุด พบว่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดและแห้งที่เพิ่มขึ้นนั้นลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมมากที่ PEG ความเข้มข้น 5, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ PEG ความเข้มข้น 5, 15 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณน้ำในเซลล์ของโคลน 1-095 นี้ก่อนข้างคกที่ เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่สูญเสีย น้ำ ในขณะที่ค่าออสโมแลลลิตีนั้นก่อนข้างคกที่ และใกล้เคียงกับชุดควบคุม จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์สามารถปรับค่า osmotic potential ให้ต่ำกว่าสารละลายภายนอกทำให้ water potential ลดลง น้ำจึงเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ แต่เซลล์สามารถปรับค่า osmotic potential ได้ไม่มาก ดังนั้นค่าออสโมแลลลิตี จึงเปลี่ยนแปลงไม่มาก อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของเซลล์ก็ได้รับผลกระทบจากสภาพขาดน้ำทำให้การเจริญการเจริญเติบโตลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม

เมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นเป็น 15-20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม ในขณะที่ค่าออสโมแลลิตีลดลงเพียงเล็กน้อย และใกล้เคียงกับชุดควบคุมเมื่อแคลลัสได้รับ PEG ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และสูงกว่าชุดควบคุมถึง 127.6 เปอร์เซ็นต์เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณออสโมลเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณโพแทสเซียมออสโมลก่อนข้างคงที่ และลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมที่ PEG ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าปริมาณแมกนีเซียมออสโมลนั้นสูงกว่าชุดควบคุมตั้งแต่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณแคลเซียมออสโมลสูงกว่าชุดควบคุมที่ PEG ความเข้มข้น 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ปริมาณออสโมลรวมนี้น้อยกว่าโคลนอื่นๆ ดังนั้นกลไกที่เป็นไปได้ในการปรับค่า osmotic potential คือการลดปริมาณเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง และค่าออสโมแลลิตีสูงขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นจากการที่ผนังมีความยืดหยุ่นมากขึ้น โดย Iraki *et al.* (1989) กล่าวว่า การลดปริมาณเซลล์ของพืชจะทำให้พืชรักษาความเต่งไว้ได้ซึ่งทำให้พืชสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาพเครียดของน้ำได้ หรือการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ โดยการสะสมตัวถูกละลายอื่นที่ไม่ใช่ไอออน เช่น โกลซีนบีเทน ฯลฯ (Binzli and Rauveni, 1994; Javed, 2000) และจากผลการทดลองพบว่าที่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโพรลีนสูงกว่าชุดควบคุม และสูงสุดที่ PEG 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมแลลิตี แสดงให้เห็นว่า โพรลีนนี้มีบทบาทในการปรับค่า osmotic potential ในส่วนของไซโทพลาสซึม และจากผลการทดลองที่พบว่า ถึงแม้ว่าเซลล์จะรักษาความเต่งไว้ได้แต่การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นยังคงลดต่ำกว่าชุดควบคุม อาจมีสาเหตุจากเซลล์สูญเสียพลังงานในการสังเคราะห์ตัวถูกละลายอินทรีย์ในการปรับค่า osmotic potential ภายในไซโทพลาสซึม ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุมที่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Bhaskaran *et al.* (1985) กล่าวว่า การสะสมโพรลีนนั้นมีผลทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมที่กำลังดำเนินอยู่นั้นลดลงเนื่องจากเซลล์สูญเสียพลังงานส่วนหนึ่งในการสังเคราะห์กรดอะมิโน (กลูตามีน) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพรลีน ส่วนที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นนั้นใกล้เคียงกับแคลลัสที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณน้ำในเซลล์ก็ใกล้เคียงกันทั้งๆ ที่ได้รับสภาพเครียดมากกว่า จึงเป็นไปได้ว่า การสะสมโพรลีนในระดับที่สูงนั้น นอกจากมีบทบาทเป็น compatible solute หรือ osmoticum แล้ว ยังช่วยรักษาสภาพเมมเบรน มาโครโมเลกุล โดยเฉพาะเอนไซม์ (Evans *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 2007) จึงทำให้การเจริญเติบโตที่ PEG ความเข้มข้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ให้คงที่ได้

แคลลัสโคลน 2-096 ซึ่งเป็น โคลนที่ทนแล้งได้น้อยที่สุดเช่นกัน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ น้ำหนักสด และแห้งที่เพิ่มขึ้นนั้น ลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมมากที่ PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงที่ PEG ความเข้มข้น 5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นที่ PEG ความเข้มข้น 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าออสโมแลลลิตีเปลี่ยนแปลงในทิศทางตรงข้ามกัน กล่าวคือ เมื่อปริมาณน้ำในเซลล์มาก สารละลายในเซลล์มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อปริมาณน้ำในเซลล์น้อย สารละลายในเซลล์มีความเข้มข้นสูง จึงค่อนข้างชัดเจนว่า เซลล์ใช้กลไกการลดปริมาตรเซลล์ เพื่อควบคุมค่า osmotic potential ซึ่ง *Iraki et al.* (1989) กล่าวว่า การลดปริมาตรเซลล์ของพืชนี้จะทำให้ พืชรักษาความเต่งไว้ได้ ซึ่งทำให้พืชสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาพเครียดของน้ำได้ และจากการที่ พบว่า เมื่อแคลลัสได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำมากที่สุด คือ เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้นสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังคงรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ไว้ได้สูงกว่าชุดควบคุม และมีแนวโน้มว่าการ เติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งให้เห็นว่า แคลลัสโคลนนี้มีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอด หรือทนต่อสภาวะแล้งได้ด้วย กลไกเลี่ยงการขาดน้ำ (drought avoidant) ซึ่งพบได้ในพืชที่เซลล์มีผนังที่ยืดหยุ่นมาก (elasticity) เมื่อ สูญเสียน้ำเพียงเล็กน้อย จะทำให้ความเต่งลดลง ส่งผลให้ค่า water potential ภายในเซลล์ลดต่ำลง จึง ทำให้เซลล์สามารถดูดซึมน้ำจากภายนอกได้ (*Cheung et al.*, 1975; *Osonubi and Davies*, 1981)

สำหรับปริมาณออออนรวม (โพลีแซคคาไรด์ แมนนิแซคคาไรด์ และแคลแซคคาไรด์) นั้นคงที่ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่ได้อาศัยออออนเหล่านี้ในการปรับค่า osmotic potential อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อ แคลลัสได้รับ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้ความยืดหยุ่น (elasticity) ของผนังเซลล์ลดลง (rigid มากขึ้น) ซึ่งในสภาพเช่นนี้ การเปลี่ยนแปลงความเต่งเพียงเล็กน้อยจะสามารถรักษาความต่างของค่า water potential ภายในเซลล์ และนอกเซลล์ จึงทำให้รักษาน้ำไว้ในเซลล์ได้ ซึ่งการที่ความยืดหยุ่น ของผนังเซลล์ลดลงนั้น มีสาเหตุจากกลไกที่เกี่ยวข้องกับ phenolic cross-linking และการสะสม ลิคินินที่โพลีเมอร์ของผนังเซลล์ (lignification of wall polymer) (*Moore*, 2008) หรือมีผลต่อการ สังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการสร้างผนังเซลล์ (*Iraki et al.*, 1989) ส่วนผนังเซลล์ที่มีความยืดหยุ่น มากมีสาเหตุมาจากค่า pH และ กระบวนการทางชีวโมเลกุลที่มีผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์ เช่น การทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น

เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าแคลลัสของ โคลน 2-096 จะสามารถ รักษาปริมาณน้ำในเซลล์ไว้ได้ในระดับที่ใกล้เคียงหรือสูงกว่าชุดควบคุม แต่การเติบโตยังคงลดต่ำ กว่าชุดควบคุม เช่นเดียวกับโคลน 1-095 อาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น เซลล์ต้องสูญเสียพลังงานใน การสังเคราะห์ตัวถูกละลายอินทรีย์ในไซโทพลาสซึม เพื่อปรับให้สมดุลกับสารละลายในแวคิว

โอด (Handa *et al.*, 1983, 1986; Mansour, 2000) สภาพขาดน้ำชักนำให้เกิด oxidative stress ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้การเจริญเติบโตลดลง (Chool and Jung, 1999)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม เมื่อแคลลัสได้รับ PEG 5, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุมถึง 2 เท่า เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ค่าออสโมแลลิตีต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนอาจไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรับค่า osmotic potential ในไซโทพลาสซึมให้สมดุลกับสารละลายในแวคิวโอล คล้ายคลึงกับผลการศึกษาในข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.) และ ข้าวสาลี (*Triticum* L.) พบว่าพันธุ์ที่ทนแล้งน้อยมีการสะสมโปรตีนมากกว่าพันธุ์ที่ทนแล้งมากกว่า (Bhaskaran *et al.*, 1985; Mansour, 2000) ซึ่งอาจเกิดขึ้นจาก โปรตีนถูกสลาย (breakdown) น้อยลง หรือมีการรวมตัวกันของโปรตีนที่จะนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนข้าง (Braskaran *et al.*, 1985; Hanson and Hitz, 1982)

จากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแคลลัสหุ้รฐ์ทั้ง 4 โคลน สามารถสรุปได้ว่าลักษณะที่จะบ่งชี้ถึงความทนแล้งคือ ปริมาณออสโม (โพแทสเซียมออสโม) จากผลการทดลองพบว่า แคลลัสหุ้รฐ์โคลนที่ทนแล้งมากที่สุด (1-101) มีการสะสมออสโมโดยเฉพาะโพแทสเซียมออสโมมากขึ้น เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้นสูงขึ้น ขณะที่ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงมากเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้นสูง โดยสอดคล้องกับ มัทนภรณ์ (2553) ซึ่งหาความสัมพันธ์ของระดับการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหุ้รฐ์ที่ขาดน้ำในสภาพแปลงเป็นเวลา 7 วัน พบว่า โคลนที่ทนแล้งได้ดีมีปริมาณน้ำสัมพัทธ์น้อยกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ และจากการทดลองในแคลลัสหุ้รฐ์แสดงให้เห็นว่า ปริมาณโปรตีนมีความสัมพันธ์กับความทนแล้งน้อยของแคลลัสหุ้รฐ์ โดยแคลลัสหุ้รฐ์โคลนที่ทนแล้งน้อย (1-095 และ 2-096) สะสมโปรตีนมากกว่าพันธุ์ที่ทนแล้งมากกว่า สอดคล้องกับ Bhaskaran *et al.* (1985) และ Mansour and Mutawa (2000) ซึ่งเพาะเลี้ยงข้าวฟ่าง และข้าวสาลีในสภาพเครียดของน้ำ พบว่าเมื่อสภาพเครียดของน้ำสูงขึ้น ข้าวฟ่าง และข้าวสาลีพันธุ์ที่ทนแล้งน้อยสะสมโปรตีนมากกว่าพันธุ์ที่ทนแล้งมากกว่า แต่แตกต่างจากการศึกษาของ มัทนภรณ์ (2553) ซึ่งหาความสัมพันธ์ของระดับการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหุ้รฐ์ที่ขาดน้ำในสภาพแปลงเป็นเวลา 7 วัน พบว่า โคลนที่ทนแล้งได้ดีสะสมโปรตีนมากกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และการเพิ่มปริมาณแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาหารกึ่งแข็งสูตร MS คือ 13.5 และ 9 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ
2. จากการทดสอบระดับการทนแล้งของแคลลัส พบว่า PEG ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ทำให้อัตราการตายของแคลลัสเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม
3. จากการคัดเลือกแคลลัสจำนวน 113 โคลน ด้วย PEG ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแคลลัสจำนวน 22 โคลน สามารถเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณได้ เมื่อคัดเลือกแคลลัสจำนวน 22 โคลน พบว่า แคลลัสโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสูงสุด หรือทนแล้งมากที่สุด คือ โคลน 1-101 และ 2-100 โคลนที่มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดต่ำสุด หรือทนแล้งน้อยที่สุดคือ โคลน 1-095 และ 2-096
4. เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสพันธุ์ที่ใช้ PEG ชักนำให้เกิดสภาพที่ขาดน้ำพบว่าแคลลัสโคลน 1-101 ที่ทนแล้งได้ดี มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม โคลน 2-100 เป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดีเช่นกัน มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นลดต่ำกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย ส่วนโคลน 1-095 และ 2-096 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้น้อยมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นลดต่ำกว่าชุดควบคุมมาก
5. แคลลัสโคลน 1-101 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นสารละลายภายในเซลล์ และปริมาณน้ำในเซลล์ที่สัมพันธ์กัน และสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้น แคลลัสโคลน 2-096 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้น้อยมีการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมแลลลิตี และปริมาณน้ำในเซลล์ที่ทิศทางตรงข้ามกัน แต่ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้น ส่วนแคลลัสโคลน 2-100 และ 1-095 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี และทนแล้งได้น้อย มีการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมแลลลิตี และปริมาณน้ำในเซลล์ที่ทิศทางตรงข้ามกันที่ PEG ความเข้มข้น 0-10 เปอร์เซ็นต์ และสัมพันธ์กันที่ PEG ความเข้มข้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งที่ลดลง ซึ่งแสดงถึงกลไกการปรับค่า osmotic potential ที่แตกต่างกัน

6. ปริมาณอออนรวม (โพแทสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียมอออน) โดยเฉพาะโพแทสเซียมอออนในโคลน 1-101 เท่านั้น ที่สัมพันธ์กับค่าออสโมแลลลิตีเมื่อได้รับPEG ความเข้มข้น 0-15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณอออนรวมในโคลนอื่นนั้นค่อนข้างคงที่

7. ปริมาณโปรตีนของโคลน 1-095 ซึ่งทนแล้งได้น้อย มีค่าเพิ่มขึ้น และสัมพันธ์กับค่าออสโมแลลลิตี เมื่อได้รับPEG ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่วนในโคลน 1-101 ปริมาณโปรตีนนั้นค่อนข้างคงที่ แต่ไม่สัมพันธ์กับค่าออสโมแลลลิตี โคลน 2-100 และ 2-096 ซึ่งทนแล้งได้มาก และน้อย ปริมาณโปรตีนนั้นเพิ่มขึ้น ที่PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

8. ลักษณะที่สัมพันธ์กับระดับการทนแล้งได้มาก คือ การสะสมโพแทสเซียมอออนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นPEG สูงขึ้น และปริมาณน้ำที่ลดลงเมื่อ PEG สูงขึ้น แต่ยังคงมีการเติบโตซึ่งแสดงถึงกลไกการทนทานต่อสภาพขาดน้ำ (drought tolerance) ส่วนลักษณะที่สัมพันธ์กับระดับการทนแล้งได้น้อยคือ การสะสมโปรตีนเพิ่มขึ้น และปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับPEG ความเข้มข้นสูงซึ่งแสดงถึงกลไกการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. 2545. **หยูร์ซูชี**. โรงพิมพ์ชุมนุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ.

ฉายแสง ไผ่แก้ว 2534. **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลักษณะทางการเกษตร และคุณสมบัติบางประการของหยูร์ซูชี และถั่วฮามาต้า**. เอกสารประกอบการบรรยายการอบรมการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์แก่นักวิชาการสัตวบาลประจำเขต และประจำจังหวัด ณ สถานีอาหารสัตว์ทุ่งกุลาร้องไห้. วันที่ 26-28 มิถุนายน 2534, จังหวัดร้อยเอ็ด.

ชนกภัฏ อินชอด 2545. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหยูร์อะตราตรัมโดยใช้รังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภา ศรีพิจิตต์ 2538. **การคัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ทนทานต่อสภาพแล้งโดยใช้สารเคมี polyethylene glycol**. วารสารวิชาการเกษตร. 13(2): 117-124.

มัทนภรณ์ ใหม่คามิ 2553. **ความสัมพันธ์ของระดับการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหยูร์ซูชี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีสม สุวรรณวงศ์ 2544. **การวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาขันธ์ ทัดศรี 2540. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อนการผลิตและการจัดการ**. ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Aazami M.A., M. Torabi and E. Jalili. 2010. *In vitro* response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. **Afr. J. Biotechnol.** 9(26): 4014-4017.

Abdel-Basset, R. 1998. Calcium channels and membrane disorders induced by drought stress in *Vicia faba* plants supplemented with calcium. **Acta. Physiol. Plant.** 20(2): 149-153.

- Ahmad, M.S.A., F. Javed and M. Ashraf. 2007. Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cation and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Plant Growth Regul.** 53: 53-63.
- Almansouri, M., J.M. Kinet and S. Lutts. 2000. Physiological analysis of salinity resistance in *Triticum turgidum* var durum Desf. callus versus whole plant responses. **Option Meriterraneenes** 40: 263-265.
- Al-Khayri, J.M. and A.M. Al-Bahrany. 2004. Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. **Biol. Plant.** 48(1): 105-108.
- Bajaj, Y.P.S. and M.S. Dhanju. 1981. Regeneration of plants from callus cultures of Napier grass (*Pennisetum purpureum*). **Plant Sci. Lett.** 20: 343-345.
- Bates, L. S. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil** 39: 205-207.
- Bhaskaran, S., R. H. Smith and R. J. Newton. 1985. Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. **Plant Physiol.** 79: 266-269.
- Binzil, M. L. and M. Reuveni. 1994. Cellular mechanisms of salt tolerance in plant cell. **Hort. Rev.** 16: 33-69.
- Biswas, J., C. Bikash, A. Bhattacharya and A.B. Mandal. 2002. *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.** 38: 525-530.
- Bogges, S.F., C.R. Stewart, D. Aspinall and L.G. Paleg. 1976. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. **Plant Physiol.** 58: 398-401.

- Bowman, W.D. and S.W. Roberts. 1985. Seasonal changes in tissue elasticity in chaparral shrubs. **Physiol. Plant.** 65: 233–236.
- Boyer, J. S. 1983. Subcellular mechanisms of plant response to low water potential. **Agric Water Manage.** 7: 239-248.
- Bressan, R.A., P.M. Hasegawa and A.R. Handa. 1981. Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol induced water stress. **Plant Sci. Lett.** 21: 23-30.
- Carmo-Silva, A.E., A.S. Soares, J.M. da Silva, A.B. da Silva, A.J. Keys and M.C. Arrabaca. 2007. Photosynthetic responses of three C_4 grasses of different metabolic subtypes to water deficit. **Funct. Plant. Biol.** 34: 204-213.
- Chen, C.S., S.M. Wrang and Y.K. Chen. 2001. Morphological and RAPD variations of regenerations derived from cell suspension culture of Pangolagrass. Paper ID 232. **Proc. 19th Int. Grassland Congress, Brazil.**
- Chool, Y.B. and J. Jung. 1999. Water deficit: Induce oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. **J. Plant Physiol.** 155: 255-261.
- Clifford, S.C., S.K. Arndt, J.E. Corlett, S. Joshi, N. Sankhla, M. Popp and H.G. Jone. 1998. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and change in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). **J. Ext. Bot.** 49(323): 967-977.
- Cheung, Y.N.S., M.T. Tyree and J. Dainty. 1975. Water relations parameters on single leaves obtained in a pressure bomb and some ecological interpretations. **Can. J. Bot.** 53: 1342-1346.

- Daiz-Santos, M.S. and N. Alejo-Ochoa. 1994. Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chilli pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte). **Plant Sci.** 96: 21-29.
- Davison, D.E. 1966. Five pasture plants for Queensland. **Qld. Agric. J.** 92: 461-463.
- Dienum, B. and J. G.P. Dirven. 1972. Climate, nitrogen and grass. 5. Influence of age, light intensity and temperature on the production and chemical composition of Congo grass (*Brachiaria germainet* Ever.). **Neth. J. Agric. Sci.** 20: 125-132.
- Errabii, T., C.B. Gandonou, H. Essalmani, J. Abrini, M. Idaomar and N. Skali-Senhaji. 2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. **Afri. J. Biotech.** 5(16): 1488-1493.
- Evans, R.D., R.A. Black, W.H. Loescher and R.J. Fellows. 1992. Osmotic relations of the drought tolerant shrub *Artemisia tridentate*. **Plant Cell Environ.** 15: 49-59.
- Gangopadhyay, G., S. Basu and S. Gupta. 1997. *In vitro* selection and physiological characterization of NaCl and mannitol adapted callus lines in *Brassica juncea*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 50(3): 161-169.
- Handa, A.K., R.A. Bressan, S. Handa and P.M. Hasegawa. 1983. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured tomato cells. **Plant Physiol.** 72: 645-653.
- Hassan, N.S., L.D. Shaaban, A., El-S. Hashem and E.E. Seleem. 2004. *In vitro* selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. cv. Myak. **Int. J. Agr. Biol.** 6: 13-18.

Hanson, A.D. and W.D. Hitz. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits.

Annu. Rev. Plant. Physiol. 33: 163-203.

Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, S. Handa and A.K. Handa. 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **Hort. Sci.** 19: 371-377.

Hopkins, G.W. 1999. **Introduction to Plant Physiology.** John Wiley & Sons, Inc. USA.

Hore, P.D., W.A. Cress and J.V. Staden. 1998. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environ.** 21: 535-553.

Huang, B. 2006. **Plant-Environment Interactions.** Taylor & Francis Group, LLC. USA.

Iraki, N.M., A. Bressan Ray., P.M. Hasegawa and C.C. Nicholas. 1989. Alteration of the Physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limit plant cells adapted to osmotic stress. **Plant Physiol.** 91: 39-47.

Javed, F. 2002. In vitro salt tolerance in wheat I: growth and ion accumulation in *Triticum aestivum*. **Int. J. Agr. Biol.** 4: 459-461.

_____. 2008. Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. **Pak. J. Bot.** 40(4): 1487-1495.

Jones, M.M. and H.M. Rawson. 1979. Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency and osmotic potential in sorghum. **Plant Physiol.** 45 : 103-111.

Jones, M.M., N.C. Turner and C.B. Osmond. 1981. Mechanisms of drought resistance, pp. 63-69. In L.G. Paleg and D. Aspinall. **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants.** Academic Press Australia, Australia.

- Knapp, A.K. 1984. Water relations and growth of three grasses during wet and drought years in a tall grass prairie. **Oecol.** 65: 35-43.
- Kramer, P.J. 1983. **Water Relations of Plants**. Academic Press, Inc., California.
- Larther, F., L. Leport, M. Petrivalsky and M. Chappart. 1993. Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.** 31(6): 911-922.
- Lia, Y., G. Junping and F. Shui-zhang. 2009. High frequency *in vitro* embryogenic callus induction and plant regeneration from indianguass mature caryopsis. **Sci. Hort.** 119: 306-309
- Malik, R.S., J.S. Dhankar and N.C. Turner. 1979. Influence of soil water deficits on root growth of cotton seedlings. **Plant Soil** 53: 109-115.
- Marschner H. 1995. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Boston, MA, USA: Academic Press.
- Mansour, M.M. F. and M.M. Al-Mutawa. 2000. Protoplasmic characteristics of wheat cultivars differing in drought tolerance. **Physiol. Plant.** 6: 35-43.
- Marcum, B.K. and C.L. Murdoch. 1992. Salt tolerance of the coastal salt marsh grass, *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. **New Phytol.** 120: 281-288.
- Moore, J.P., M. Vire-Gibouin, M.J. Farrant and A. Driouch. 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. **Physiol. Plant.** 134: 237-245.
- Morgan, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher stress on proline accumulation in two varieties of cassava plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 35: 299-319.
- Munns, R. 1988. Why measure osmotic adjustment?. **Aust. J. Plant Physiol.** 15: 717-26.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A review medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiol.** 15: 473-492.
- Newton, R.J., S. Bhaskaran, J.D. Puryear and R.H. Smith. 1986. Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. **Plant Physiol.** 81: 626-629.
- Nash, D., L.G. Paleg and J.T. Wiskich. 1982. Effect of proline, betaine and some other solutes on the heat stability of mitochondrial enzymes. **Aust. J. Plant Physiol.** 9: 47-57.
- Norsaengsri, M. 2006. **Systematics of Poaceae Subtribe Setariinae in Thailand**. Ph.D. Thesis, Khon Kaen University.
- Noy-Meie, I. and B.Z. Ginzburg. 1969. An analysis of the water potential isotherm in plant tissue. II. Comparative studies on leaves of different types. **Aust. J. Biol. Sci.** 22: 35-52.
- Osonubi, O. and W.J. Davies. 1981. Root growth and water relations of oak and birch seedlings. **Oecologia (Berlin)** 51: 343-350.
- Osuna, P. and R.B. Jerry. 2003. Regeneration of black Grama (*Bouteloua eriopoda* Torr.) plants via somatic embryogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.** 40: 299-302.
- Pollard, A. and R.G. Wyn Jones. 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. **Planta** 144: 291-298.
- Raven, P.H., R.F. Evert and S.E. Eichhorn. 1992. **Biology of Plants**. New York. Worth. pp. 545-572.
- Richard, R.A., H.M. Rawson and D.A. Johnson. 1986. Glaucousness in wheat: Its development and effect on water-use efficiency, gas exchange and photosynthetic tissue temperatures. **Plant Physiol.** 13: 465-73

- Smith, R.H., S. Bhaskaran and F.R. Miller. 1985. Screening for drought tolerance in sorghum using cell culture. ***In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*** 21: 541-545.
- Salehi, H. and M. Khosh-Khui. 2005. Effect of genotype and growth regulator on callus induction and plant regeneration in four important turf grass genera: A comparative study. ***In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*** 41: 157-161.
- Serraj, R. and T.R. Sinclair. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought condition. ***Plant Cell Environ.*** 25: 333-341.
- Shaul, O. 2002. Magnesium transport and function in plants: The tip of the iceberg. ***BioMetals*** 15: 309-323.
- Skerman, P.J. and F Riveros. 1990. **Tropical Grasses**. FAO Plant Production and Protection Series. No. 23, Rome.
- Slatyer, O.R. 1969. Physiological significance of internal water relations to crop yield. ***Amer. Soc. Agron. Crop Sci.*** 35: 116-117.
- Stewart C.R. 1972. Effects of pProline and carbohydrates on the metabolism of exogenous proline by excised bean leaves in the dark. ***Plant Physiol.*** 50: 551-555.
- Sussex, I., M. Clutter and V. Walbot. 1978. Benzyladenine reversal of abscisic acid inhibition of growth and RNA synthesis in germinating bean axes. ***Plant Physiol.*** 56: 575-578.
- Taiz, L. and E. Zeiger.. 2006. **Plant Physiology**. Sinaueciates, Inc. USA
- Tewary, P.K., A. Sharma, M.K. Raghunath, A. Sarkar. 2000. *In vitro* response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. ***Plant Growth Regul.*** 30: 17-21.

Turner, N. C. and J. E. Begg. 1981. Plant water relations and adaptation to stress. **Plant Soil.** 58: 97-131.

Valladares F. and R.W. Pearcy. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. **Plant Cell Environ.** 20: 25-36.

Volkmar, K.M., Y. Hu and H. Steppuhn. 1997. Physiological responses of plants to salinity: A review. **Can. J. Plant Sci.** 78: 19-27.

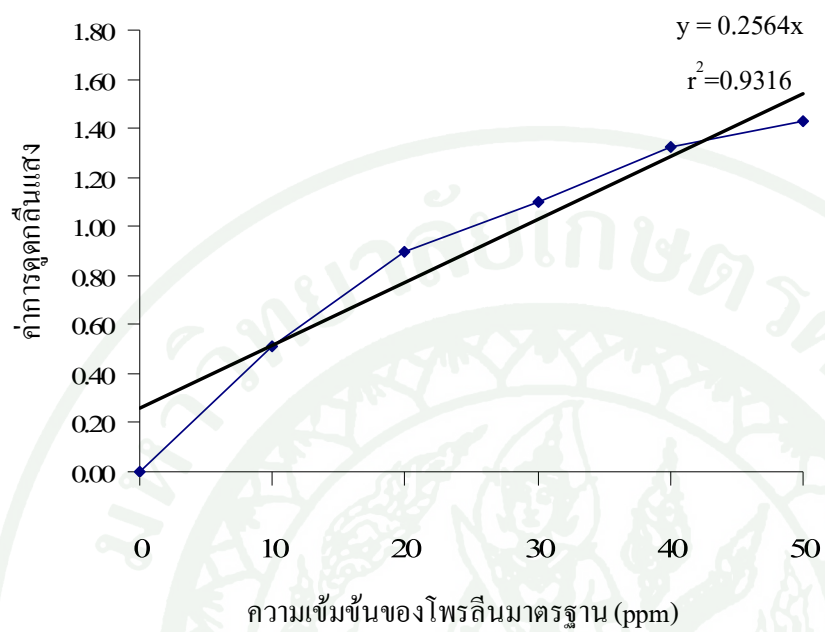
Wang, W., S.X. Cui and C.L. Zhang. 2002. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed. **Plant Cell. Tiss. Org. Cult.** 67: 11-17.



ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS

ชื่อสารเคมี	มีลติกรัมต่อลิตร
Macro-elements	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Micro- elements	
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.90
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
Organic Compounds	
Glycine	2.00
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine	0.10
Sucrose	30,000.00
Agar	8,000.00
pH	5.6-5.8

ที่มา: Murashige and Skoog (1962)



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อน้ำหนักสด
ของแคลลัสหูกฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	$9.019 \times 10^{-3}^{**}$
Conc.PEG	4	$2.278 \times 10^{-3}^{**}$
Clone $\times$ PEG	12	$6.377 \times 10^{-4}^{ns}$
Error	40	6.060×10^{-4}
CV(%)		0.44

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^{**} มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักสด (กรัม)				ค่าเฉลี่ย
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	
0	$8.200 \times 10^{-2} \pm 0.028^{abc}$	$6.330 \times 10^{-2} \pm 0.015^{abcde}$	$5.900 \times 10^{-2} \pm 0.009^{abcde}$	$4.330 \times 10^{-2} \pm 0.018^{bcde}$	$6.190 \times 10^{-2} \pm 0.021^x$
5	$9.300 \times 10^{-2} \pm 0.035^a$	$8.670 \times 10^{-2} \pm 0.050^{ab}$	$5.530 \times 10^{-2} \pm 0.024^{abcde}$	$2.030 \times 10^{-2} \pm 0.019^e$	$6.380 \times 10^{-2} \pm 0.042^x$
10	$0.102 \times 10^{-2} \pm 0.036^a$	$7.030 \times 10^{-2} \pm 0.018^{abcd}$	$6.570 \times 10^{-2} \pm 0.016^{abcde}$	$1.870 \times 10^{-2} \pm 0.015^e$	$6.400 \times 10^{-2} \pm 0.036^x$
15	$9.900 \times 10^{-2} \pm 0.037^a$	$6.300 \times 10^{-2} \pm 0.031^{abcde}$	$2.500 \times 10^{-2} \pm 0.019^{de}$	$2.670 \times 10^{-2} \pm 0.018^{de}$	$5.340 \times 10^{-2} \pm 0.039^x$
20	$4.070 \times 10^{-2} \pm 0.004^{bcde}$	$3.800 \times 10^{-2} \pm 0.022^{cde}$	$2.700 \times 10^{-2} \pm 0.006^{de}$	$2.060 \times 10^{-2} \pm 0.008^e$	$3.160 \times 10^{-2} \pm 0.013^y$
ค่าเฉลี่ย	$8.330 \times 10^{-2} \pm 0.035^x$	$6.420 \times 10^{-2} \pm 0.003^y$	$4.640 \times 10^{-2} \pm 0.002^y$	$2.593 \times 10^{-2} \pm 0.017^z$	
C.V.	0.44				

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อน้ำหนักแห้ง
ของแคลสท์หุ้มรูซี่เมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	5.099×10^{-4} **
Conc.PEG	4	7.755×10^{-6} ns
Clone×PEG	12	2.153×10^{-5} ns
Error	38	1.226×10^{-5}
CV(%)		0.04

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)				ค่าเฉลี่ย
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	
0	$2.700 \times 10^{-2} \pm 0.002^{bc}$	$2.870 \times 10^{-2} \pm 0.004^{ab}$	$3.030 \times 10^{-2} \pm 0.002^{ab}$	$2.100 \times 10^{-2} \pm 0.005^{cde}$	$2.68 \times 10^{-2} \pm 0.004$
5	$3.430 \times 10^{-2} \pm 0.006^a$	$2.700 \times 10^{-2} \pm 0.001^{bc}$	$2.370 \times 10^{-2} \pm 0.002^{bcd}$	$1.630 \times 10^{-2} \pm 0.004^e$	$2.53 \times 10^{-2} \pm 0.007$
10	$3.400 \times 10^{-2} \pm 0.003^a$	$2.900 \times 10^{-2} \pm 0.000^{ab}$	$2.700 \times 10^{-2} \pm 0.002^{bc}$	$1.670 \times 10^{-2} \pm 0.006^e$	$2.67 \times 10^{-2} \pm 0.007$
15	$3.430 \times 10^{-2} \pm 0.004^a$	$3.000 \times 10^{-2} \pm 0.002^{ab}$	$2.430 \times 10^{-2} \pm 0.005^{bcd}$	$1.800 \times 10^{-2} \pm 0.003^{de}$	$2.67 \times 10^{-2} \pm 0.006$
20	$2.970 \times 10^{-2} \pm 0.002^{ab}$	$2.830 \times 10^{-2} \pm 0.001^{ab}$	$2.370 \times 10^{-2} \pm 0.004^{bcd}$	$1.860 \times 10^{-2} \pm 0.001^{de}$	$2.51 \times 10^{-2} \pm 0.005$
ค่าเฉลี่ย	$3.180 \times 10^{-2} \pm 0.004^w$	$2.860 \times 10^{-2} \pm 0.002^x$	$2.580 \times 10^{-2} \pm 0.004^z$	$1.810 \times 10^{-2} \pm 0.004^y$	
C.V.	0.04				

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำในเซลล์ (กรัม)				ค่าเฉลี่ย
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	
0	$16.573 \times 10^{-2} \pm 3.419^{abc}$	$19.377 \times 10^{-2} \pm 3.490^a$	$13.543 \times 10^{-2} \pm 1.189^{abcd}$	$17.710 \times 10^{-2} \pm 2.069^{ab}$	$16.801 \times 10^{-2} \pm 3.212$
5	$19.563 \times 10^{-2} \pm 3.085^a$	$15.770 \times 10^{-2} \pm 1.018^{abcd}$	$15.070 \times 10^{-2} \pm 1.646^{abcd}$	$13.827 \times 10^{-2} \pm 4.601^{abcd}$	$16.057 \times 10^{-2} \pm 3.503$
10	$20.050 \times 10^{-2} \pm 2.219^a$	$15.860 \times 10^{-2} \pm 0.650^{abcd}$	$14.393 \times 10^{-2} \pm 3.458^{abcd}$	$19.477 \times 10^{-2} \pm 7.841^a$	$17.445 \times 10^{-2} \pm 4.718$
15	$17.300 \times 10^{-2} \pm 3.403^{ab}$	$15.883 \times 10^{-2} \pm 1.763^{abcd}$	$9.320 \times 10^{-2} \pm 0.721^d$	$16.287 \times 10^{-2} \pm 3.481^{abc}$	$14.697 \times 10^{-2} \pm 3.761$
20	$11.617 \times 10^{-2} \pm 1.022^{bcd}$	$14.907 \times 10^{-2} \pm 0.893^{abcd}$	$10.013 \times 10^{-2} \pm 1.290^{cd}$	$19.163 \times 10^{-2} \pm 5.011^a$	$13.925 \times 10^{-2} \pm 4.310$
ค่าเฉลี่ย	$17.021 \times 10^{-2} \pm 3.899^x$	$16.359 \times 10^{-2} \pm 2.399^x$	$12.468 \times 10^{-2} \pm 2.883^y$	$17.293 \times 10^{-2} \pm 4.726^x$	
C.V.			20.6		

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อค่าออกส
แลลลิตีของแคลลัสหูกุ้งเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	15876.02 ^{**}
Conc.PEG	4	2793.64 ^{ns}
Clone×PEG	12	8414.86 ^{**}
Error	40	2995.70
CV(%)		13.0

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^{**} มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

ความเข้มข้นของPEG (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณค่าออสโมแลลลิตี (มิลลิโมลต่อกิโลกรัม)				
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	ค่าเฉลี่ย
0	$356.330 \times 10^{-2} \pm 26.35^{bc}$	$451.330 \times 10^{-2} \pm 34.350^b$	$445.670 \times 10^{-2} \pm 59.230^b$	$384.000 \times 10^{-2} \pm 93.260^{bc}$	$409.330 \times 10^{-2} \pm 65.890$
5	$382.000 \times 10^{-2} \pm 101.53^{bc}$	$407.330 \times 10^{-2} \pm 76.770^b$	$398.330 \times 10^{-2} \pm 24.540^{bc}$	$422.330 \times 10^{-2} \pm 30.090^b$	$402.500 \times 10^{-2} \pm 58.760$
10	$438.670 \times 10^{-2} \pm 106.46^b$	$448.000 \times 10^{-2} \pm 82.020^b$	$443.000 \times 10^{-2} \pm 3.600^b$	$356.670 \times 10^{-2} \pm 37.650^{bc}$	$421.580 \times 10^{-2} \pm 71.330$
15	$420.670 \times 10^{-2} \pm 33.00^b$	$432.000 \times 10^{-2} \pm 12.120^b$	$407.000 \times 10^{-2} \pm 20.800^b$	$438.670 \times 10^{-2} \pm 53.800^b$	$424.580 \times 10^{-2} \pm 31.420$
20	$302.000 \times 10^{-2} \pm 11.53^c$	$458.000 \times 10^{-2} \pm 47.280^b$	$568.670 \times 10^{-2} \pm 39.390^a$	$438.670 \times 10^{-2} \pm 12.090^b$	$442.080 \times 10^{-2} \pm 102.630$
ค่าเฉลี่ย	$379.930 \times 10^{-2} \pm 76.69^x$	$439.333 \times 10^{-2} \pm 51.620^{xy}$	$452.530 \times 10^{-2} \pm 69.760^x$	$408.270 \times 10^{-2} \pm 56.180^{yx}$	
C.V.	13.0				

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณ
โปรตีนของแคลลัสหูกำรื้อเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	$1.22 \times 10^{-3**}$
Conc.PEG	4	$8.84 \times 10^{-4**}$
Clone×PEG	12	$6.57 \times 10^{-4**}$
Error	39	1.66×10^{-4}
CV(%)		0.3

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^{**} มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)				
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	ค่าเฉลี่ย
0	$2.970 \times 10^{-2} \pm 0.005$	$3.230 \times 10^{-2} \pm 0.012$	$2.900 \times 10^{-2} \pm 0.003$	$4.630 \times 10^{-2} \pm 0.006$	$3.430 \times 10^{-2} \pm 0.009$
5	$3.370 \times 10^{-2} \pm 0.007$	$3.430 \times 10^{-2} \pm 0.006$	$4.670 \times 10^{-2} \pm 0.015$	$3.833 \times 10^{-2} \pm 0.007$	$3.800 \times 10^{-2} \pm 0.010$
10	$2.730 \times 10^{-2} \pm 0.002$	$5.300 \times 10^{-2} \pm 0.007$	$4.830 \times 10^{-2} \pm 0.005$	$9.370 \times 10^{-2} \pm 0.040$	$5.560 \times 10^{-2} \pm 0.030$
15	$3.070 \times 10^{-2} \pm 0.001$	$2.950 \times 10^{-2} \pm 0.012$	$4.230 \times 10^{-2} \pm 0.004$	$4.030 \times 10^{-2} \pm 0.003$	$3.570 \times 10^{-2} \pm 0.008$
20	$3.170 \times 10^{-2} \pm 0.004$	$2.800 \times 10^{-2} \pm 0.020$	$6.770 \times 10^{-2} \pm 0.016$	$2.800 \times 10^{-2} \pm 0.004$	$3.890 \times 10^{-2} \pm 0.020$
ค่าเฉลี่ย	$3.040 \times 10^{-2} \pm 0.005$	$3.540 \times 10^{-2} \pm 0.140$	$4.680 \times 10^{-2} \pm 0.157$	$4.940 \times 10^{-2} \pm 0.280$	
C.V.			0.3		

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณ
โพแทสเซียมไอออนของแคลสท์หญ้าที่เมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	2.84 ^{**}
Conc.PEG	4	3.65×10 ⁻² ns
Clone×PEG	12	7.56×10 ⁻² ^{**}
Error	38	2.55×10 ⁻²
CV(%)		0.7

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^{**} มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโพแทสเซียมไอออน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)				ค่าเฉลี่ย
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	
0	2.293 ± 0.358^b	2.072 ± 0.119^{bcde}	1.802 ± 0.076^{ef}	1.960 ± 0.219^{cdef}	2.032 ± 0.265
5	2.694 ± 0.093^a	2.193 ± 0.086^{bc}	1.754 ± 0.067^f	1.844 ± 0.047^{def}	2.121 ± 0.408
10	2.668 ± 0.238^a	2.160 ± 0.039^{bc}	1.772 ± 0.129^{ef}	1.668 ± 0.238^{fg}	2.067 ± 0.458
15	2.686 ± 0.010^a	2.131 ± 0.061^{bcd}	1.390 ± 0.339^g	1.686 ± 0.010^f	1.973 ± 0.531
20	2.844 ± 0.047^a	2.142 ± 0.048^{bcd}	1.665 ± 0.077^{fg}	1.694 ± 0.093^f	2.086 ± 0.501
ค่าเฉลี่ย	$2.637 \pm 0.252x$	2.139 ± 0.076	1.677 ± 0.212	1.770 ± 0.174	
C.V.			0.778		

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณ
แมกนีเซียมออกไซด์ของแคลสท์หญ้าฐีเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	$2.07 \times 10^{-3**}$
Conc.PEG	4	5.20×10^{-4ns}
Clone×PEG	12	3.85×10^{-4ns}
Error	38	2.32×10^{-4}
CV(%)		0.3

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

^{**} มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณแมกนีเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)				
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	ค่าเฉลี่ย
0	$4.233 \times 10^{-2} \pm 0.009^{bcde}$	$3.967 \times 10^{-2} \pm 0.006^{cde}$	$2.633 \times 10^{-2} \pm 0.002e$	$7.233 \times 10^{-2} \pm 0.026^{ab}$	$4.517 \times 10^{-2} \pm 0.021$
5	$5.733 \times 10^{-2} \pm 0.020^{abcd}$	$5.150 \times 10^{-2} \pm 0.012^{abcde}$	$3.233 \times 10^{-2} \pm 0.013de$	$4.067 \times 10^{-2} \pm 0.021^{cde}$	$4.546 \times 10^{-2} \pm 0.018$
10	$7.233 \times 10^{-2} \pm 0.005^{ab}$	$6.800 \times 10^{-2} \pm 0.029^{abc}$	$3.833 \times 10^{-2} \pm 0.002^{cde}$	$5.700 \times 10^{-2} \pm 0.019^{abcde}$	$5.892 \times 10^{-2} \pm 0.019$
15	$7.833 \times 10^{-2} \pm 0.007^a$	$6.830 \times 10^{-2} \pm 0.023^{abc}$	$4.100 \times 10^{-2} \pm 0.006^{cde}$	$4.160 \times 10^{-2} \pm 0.014^{cde}$	$5.733 \times 10^{-2} \pm 0.021$
20	$5.933 \times 10^{-2} \pm 0.012^{abcd}$	$5.230 \times 10^{-2} \pm 0.022^{abcde}$	$3.400 \times 10^{-2} \pm 0.003^{de}$	$4.200 \times 10^{-2} \pm 0.006^{bcde}$	$4.692 \times 10^{-2} \pm 0.152$
ค่าเฉลี่ย	$6.193 \times 10^{-2} \pm 0.016^x$	$5.597 \times 10^{-2} \pm 0.020^x$	$3.440 \times 10^{-2} \pm 0.007^y$	$5.073 \times 10^{-2} \pm 0.020^x$	
C.V.	0.3				

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของโคลนและความเข้มข้นของ PEG ต่อปริมาณ
แคลเซียมออกไซด์ของแคลสท์หญ้าที่เมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

Source of Variation	DF	Mean square
Clone	3	2.11×10^{-4} ns
Conc.PEG	4	4.22×10^{-4} ns
Clone×PEG	12	3.98×10^{-4} ns
Error	37	4.51×10^{-4}
CV(%)		2.8

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณแคลเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)				
	โคลน 1-101	โคลน 2-100	โคลน 1-095	โคลน 2-096	ค่าเฉลี่ย
0	$0.000 \times 10^{-2} \pm 0.000$	$1.730 \times 10^{-2} \pm 0.000$	$6.939 \times 10^{-18} \pm 0.000$	$5.330 \times 10^{-2} \pm 0.009$	$1.330 \times 10^{-2} \pm 0.004$
5	$3.300 \times 10^{-2} \pm 0.037$	$0.000 \times 10^{-2} \pm 0.000$	$1.300 \times 10^{-2} \pm 0.012$	$0.000 \times 10^{-2} \pm 0.000$	$1.150 \times 10^{-2} \pm 0.022$
10	$4.670 \times 10^{-2} \pm 0.008$	$6.000 \times 10^{-2} \pm 0.008$	$1.390 \times 10^{-17} \pm 0.000$	$4.660 \times 10^{-2} \pm 0.008$	$3.830 \times 10^{-2} \pm 0.006$
15	$0.000 \times 10^{-2} \pm 0.000$	$1.430 \times 10^{-2} \pm 0.024$	$5.500 \times 10^{-3} \pm 0.007$	$2.170 \times 10^{-2} \pm 0.000$	$4.950 \times 10^{-2} \pm 0.013$
20	$5.000 \times 10^{-2} \pm 0.008$	$1.130 \times 10^{-2} \pm 0.019$	$4.230 \times 10^{-2} \pm 0.073$	$5.000 \times 10^{-2} \pm 0.009$	$1.590 \times 10^{-2} \pm 0.365$
ค่าเฉลี่ย	$8.530 \times 10^{-2} \pm 0.019$	$6.330 \times 10^{-2} \pm 0.014$	$1.210 \times 10^{-2} \pm 0.030$	$3.000 \times 10^{-2} \pm 0.006$	
C.V.			2.8		

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ 10 ผลของ PEG ต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสด (กรัม) ของแคลสท์หญาฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		น้ำหนักสด (กรัม)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	0.082	0.064	0.059	0.043
5	0.093	0.067	0.055	0.020
10	0.101	0.007	0.066	0.019
15	0.099	0.063	0.035	0.027
20	0.038	0.038	0.027	0.021

ตารางผนวกที่ 11 ผลของ PEG ต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์ชุดควบคุม) ของแคลสท์หญาฐิเมื่อได้รับ PEG นาน 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		น้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์ชุดควบคุม)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	100	100	100	100
5	113.74	104.92	93.71	47.30
10	124.01	109.84	111.39	43.45
15	120.91	99.25	60.09	62.40
20	46.84	59.63	45.44	47.38

ตารางผนวกที่ 12 ผลของ PEG ต่อน้ำหนักแห้ง (กรัม) ของแคลสสทัญรูซี่ โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	0.027	0.029	0.030	0.021
5	0.034	0.027	0.024	0.016
10	0.034	0.029	0.027	0.016
15	0.034	0.030	0.024	0.018
20	0.030	0.028	0.024	0.018

ตารางผนวกที่ 13 ผลของ PEG ต่อน้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์ชุดควบคุม) ของแคลสสทัญรูซี่ โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์ชุดควบคุม)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	100	100	100	100
5	128.21	93.43	78.85	77.41
10	127.47	100.87	88.55	78.83
15	128.34	103.69	79.74	85.31
20	110.61	97.69	79.07	88.47

ตารางผนวกที่ 14 ผลของ PEG ต่อปริมาณน้ำในเซลล์ (กรัม) ของแคลสท์หุ้มารูซี่โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณน้ำในเซลล์ (กรัม)			
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096	
0	16.573	19.377	13.543	17.710	
5	19.563	15.770	15.070	13.826	
10	20.050	15.860	14.393	19.476	
15	17.300	15.883	9.320	16.287	
20	11.617	14.907	10.013	20.585	

ตารางผนวกที่ 15 ผลของ PEG ต่อค่าออสโมแลลลิตี (มิลลิโมลต่อกิโลกรัม) ของแคลสท์หุ้มารูซี่โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ค่าความเข้มข้นสารละลายภายในเซลล์ (มิลลิโมลต่อกิโลกรัม)			
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096	
0	356	451	446	384	
5	382	407	398	422	
10	439	448	443	357	
15	421	432	407	439	
20	302	458	569	440	

ตารางผนวกที่ 16 ผลของ PEG ต่อปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ของแคลลัส
หนักรูชี้โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	0.030	0.032	0.029	0.047
5	0.033	0.034	0.047	0.038
10	0.027	0.053	0.048	0.093
15	0.031	0.029	0.042	0.041
20	0.032	0.028	0.068	0.028

ตารางผนวกที่ 17 ผลของ PEG ต่อปริมาณโพแทสเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของ
แคลลัส หนักรูชี้โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณโพแทสเซียมออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	2.293	2.072	1.802	1.960
5	2.694	2.193	1.754	1.844
10	2.668	2.160	1.772	1.668
15	2.686	2.131	1.297	1.686
20	2.844	2.142	1.665	1.694

ตารางผนวกที่ 18 ผลของ PEG ต่อปริมาณแมกนีเซียมอออน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของแคลสท์
ห้วยารูชีโดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณแมกนีเซียมอออน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	0.042	0.0397	0.026	0.0723
5	0.057	0.0515	0.032	0.0407
10	0.072	0.068	0.038	0.0570
15	0.078	0.068	0.0410	0.0417
20	0.059	0.0523	0.0340	0.0420

ตารางผนวกที่ 19 ผลของ PEG ต่อปริมาณแคลเซียมอออน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)
ของแคลสท์ห้วยารูชีโดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณแคลเซียมอออน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)		
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096
0	0.000	0.000	0.000	0.005
5	0.033	0.000	0.013	0.000
10	0.005	0.006	0.000	0.005
15	0.000	0.000	0.006	0.000
20	0.005	0.011	0.042	0.005

ตารางผนวกที่ 20 ผลของ PEG ต่อปริมาณอออนรวม (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) ของแคลสัทฮูรูซี่
โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณอออนรวม (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)			
โคลน	1-101	2-100	1-095	2-096	
0	2.335	2.111	1.829	2.037	
5	2.784	2.244	1.800	1.884	
10	2.745	2.234	1.810	1.729	
15	2.765	2.199	1.343	1.728	
20	2.908	2.205	1.741	1.741	

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	กรวรรณ ทรงความดี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	23 พฤษภาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดอ่างทอง
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(วิทยาศาสตร์ทั่วไป) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-