บทที่ 4
ผลและวิจารณ์การทดลอง

การทดลองที่ 1 ระดับความเข้มข้มของผงถ่านกัมมันต์ และ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่เติมผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ คือ 0.00, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น 2,4-D ที่ใช้ คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 20 สูตร

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 15 วัน พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด คือ 30.94% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากเป็นอันดับสอง คือ 21.44% รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 14.71% และกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 3.40% และ 0.66% ตามลำดับ โดยการทดลองนี้พบว่ากรรมวิธีที่ผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงกว่าระดับความเข้มข้นอื่น และหากใช้ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.10 กรัมต่อลิตรขึ้นไป จะทำเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยลดลง โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยที่ได้จะน้อยกว่าการไม่ใช้ผงถ่านกัมมันต์ และการใช้ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1) อารีย์ (2541) ได้รายงานว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารช่วงหนึ่ง พืชจะมีการปล่อยของเสีย ซึ่งเป็นสารจำพวก phenolic compound ออกมา จึงมีการเติมผงถ่านกัมมันต์เพื่อช่วยดูดซับของเสียเหล่านั้น ทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งปริมาณที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้จะอยู่ที่ 0.5-2% บุญยืน (2544) ได้ระบุว่าผงถ่านกัมมันต์ มีทั้งข้อดีและข้อเสีย คือ นอกจากผงถ่านกัมมันต์จะดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญไว้แล้ว แต่ผงถ่านกัมมันต์อาจดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ลงไปได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งจะมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืชและจะทำให้อาหารมีสีดำ ทำให้แคลลัสที่จมอยู่ในอาหารไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้หากเติมในปริมาณมากเกินไป Buffard-Morel *et al*. (1995) รายงานว่าระยะเวลาที่ผงถ่านถ่านกัมมันต์ใช้ในการดูด 2,4-D จนถึงระดับสมดุล ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น 2,4-D และผงถ่านกัมมันต์ที่ใส่ลงไปในอาหาร โดยการเติมผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร จะใช้เวลาถึง 21 วันหลังจากทำการเตรียมอาหารในการที่ผงถ่านกัมมันต์จะดูด 2,4-D ให้ปริมาณ 2,4-D ที่ยังไม่ถูกดูดซึมมีปริมาณสมดุลกับ 2,4-D ที่ถูกดูดซึมแล้ว

ตารางที่ 4.1 ผลของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นเวลา 15 วัน

ผงถ่านกัมมันต์	ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)				ค่าเฉลี่ย
(กรัมต่อลิตร)	0	1	2	3	(Mean Factor)
0	0.00e	12.33e	30.67cd	42.67bc	21.44B
0.05	0.00e	11.67e	51.33ab	60.67a	30.94A
0.10	0.00e	2.40e	14.67de	41.67bc	14.71B
0.15	0.00e	0.00e	4.07e	9.33e	3.40C
0.20	0.00e	0.00e	1.07e	1.37e	0.66C
ค่าเฉลี่ย	0.00C	5.32C	20.36B	31.14A	
$LSD_{0.05}$ ผงถ่าน (A)	8.49				
$LSD_{0.05}$ 2,4-D (B)	7.59				
$LSD_{0.05}$ AxB	16.98				

หมายเหตุ :ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อย่างไรก็ตามการชักนำให้เกิดแคลลัสยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้น 2,4-D จากการทดลองพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด คือ 31.14% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 20.36% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 5.32% และกรรมวิธีที่ไม่ใส่ 2,4-D จะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสเลย จากการทดลองเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ปราศจาก 2,4-D ไม่สามารถจะเจริญไปเป็นแคลลัสได้ และเมื่อความเข้มข้น 2,4-D ลดลงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยจะมีค่าลดลง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D ตั้งแต่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรไปจนถึงความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยจะเพิ่มมากขึ้น และจากการทดลองนี้พบว่า กรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงกว่าระดับความเข้มข้นอื่น คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 31.14% (ตารางที่ 4.1) สุริยันตร์และคณะ (2540) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวนางมลเอส 4 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นทั้งในที่มืดและสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D จะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสจะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D เป็น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย Pierik (1987) รายงานว่าการที่ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เนื่องจาก 2,4-D มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะจึงทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นก้อนแคลลัสและเซลล์มีการขยายขนาด จะใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพวกธัญพืช จำเป็นต้องใส่ 2,4-D ในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัส เนื่องจาก 2,4-D มีส่วนสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ในกระบวนการเอมบริโอเจเนซิสของพืช และระดับความเข้มข้น 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสร้างขึ้น ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช อายุของพืชและองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

รังสฤษดิ์ (2540) ได้รายงานว่าความเข้มข้น 2,4-D ที่ใช้ จะอยู่ในระดับ 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Vajrabhya *et al.* (1984) ระบุความจำเป็นในการใช้ 2,4-D ว่าข้าวไทยนั้นเหมาะสำหรับการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตาม Pierik (1987) ได้ให้เหตุผลว่าความเข้มข้น 2,4-D ที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์

แต่ทั้งนี้กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ 2,4-D จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากกว่ากรรมวิธีที่ใช้ผงถ่านกัมมันต์ หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่าผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D มีปฏิกิริยาร่วมซึ่งกันและกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ซึ่งกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย คือ 60.67% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 51.33% แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น และจากการทดลองกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ 2,4-D จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยที่สูงมากกว่ากรรมวิธีที่ใช้ผงถ่านกัมมันต์หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว นั่นคือเมื่อใส่ผงถ่านกัมมันต์ไม่ว่าจะความเข้มข้นเท่าใดก็ตาม หากปราศจากการใส่ 2,4-D เนื้อเยื่อเซลล์จะไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส แต่หากใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยจะเพิ่มมากขึ้นตามสัดส่วนของระดับความเข้มข้น 2,4-D ที่เพิ่มมากขึ้น โดยกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.10 กรัมต่อลิตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยอยู่ในช่วง 41.67-60.67% และกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยอยู่ในช่วง 30.67-51.33% เมื่อใช้ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.05 กรัมต่อลิตร และหากมีการเติมผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15-0.20 กรัมต่อลิตร ไม่ว่าจะใช้ร่วมกับ 2,4-D ที่มีระดับความเข้มข้นมากน้อยเพียงใด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยก็ยังคงมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามสัดส่วนของความเข้มข้น 2,4-D ที่เพิ่มขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยที่ได้จะมีค่าน้อยมาก ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยจะมีค่าอยู่ในช่วง 0-9.33% ดังนั้น กรรมวิธีที่ใช้ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก็จะช่วยให้แคลลัสมีการเจริญและพัฒนาได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้ 2,4-D หรือผงถ่านกัมมันต์อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว (ตาราง 4.1)

Paek และ Hahn (2000) ศึกษาอิทธิพลของไซโตไคนิน ออกซิน และผงถ่านกัมมันต์ที่มีต่อการสร้างอวัยวะของดอกไลซิแอนตัส พบว่า การใช้ N_6-Benzyladenine (BA) และ kinetin ในระดับความเข้มข้นที่สูง (13.32-22.2 และ 13.94-23.23 ไมโครโมล) จะมีผลทำให้เกิดยอดได้ดี และการเพิ่มปริมาณ indole-3-acetic acid (IAA) และ indole butyric acid (IBA) ในอาหารจะช่วยให้เกิดราก แต่เมื่อมีการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปจะเป็นตัวไปยับยั้งการพัฒนาของยอดและราก ทำให้แคลลัสสามารถดูดสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ และ Buffard-Morel *et al.* (1995) ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงส่วนยอดของมะพร้าวในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์พบว่าผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวส่งเสริมให้เกิด somatic embryogenesis และเป็นตัวช่วยดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโตได้อีกด้วยโดยเฉพาะสารประกอบฟีโนลิก คำนูณ (2544) กล่าวไว้ว่าถึงแม้ว่าอวัยวะทุกส่วนและเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืชสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่การที่เนื้อเยื่อจะสร้างแคลลัสปริมาณมากน้อยเพียงใดนั้น จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิด ตำแหน่ง และอายุของชิ้นส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พืชเริ่มต้น และความต้องการอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นก็จะแตกต่างออกไปในแต่ละชิ้นส่วนของพืช และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งความเข้มข้นและสัดส่วนที่ใช้จะขึ้นกับจีโนไทป์และระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในพืช และยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการสร้างแคลลัสอีก เช่น องค์ประกอบของแร่ธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยง แสงและอุณหภูมิ

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่เติมผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณความเข้มข้น 2,4-D ที่ใช้ คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 20 สูตร และทำการบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส พบว่า

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นเวลา 5 วัน

จากการทดลองพบว่า การใส่ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ เมื่อความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ที่ใส่ลงไปในอาหารเพิ่มขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะลดลง โดยกรรมวิธีที่ ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์จะทำให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย เท่ากับ 0.89 มิลลิเมตร ส่วนกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05-0.10 กรัมต่อลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.44-0.72 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15-0.2 กรัมต่อลิตร จะไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลย (ตารางที่ 4.2)

และจากการทดลองพบว่าปริมาณ 2,4-D มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยจะมีขนาดใหญ่มากที่สุด คือ 1.05 มิลลิเมตร เมื่อใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.47 มิลลิเมตร, กรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.19 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่ 2,4-D จะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส ทั้งนี้กรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะใหญ่ขึ้น (ตารางที่ 4.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.2 ผลของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (มิลลิเมตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นเวลา 5 วัน

ผงถ่านกัมมันต์	ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)				ค่าเฉลี่ย
(กรัมต่อลิตร)	0	1	2	3	(Mean Factor)
0	0.00	0.50	0.60	2.37	0.89
0.05	0.00	0.13	1.13	1.50	0.72
0.10	0.00	0.00	0.40	1.17	0.44
0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ค่าเฉลี่ย	0.00B	0.19B	0.47AB	1.05A	
$LSD_{0.05}$ ผงถ่าน (A)	ns				
$LSD_{0.05}$ 2,4-D (B)	0.60				
$LSD_{0.05}$ AxB	ns				

หมายเหตุ :ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

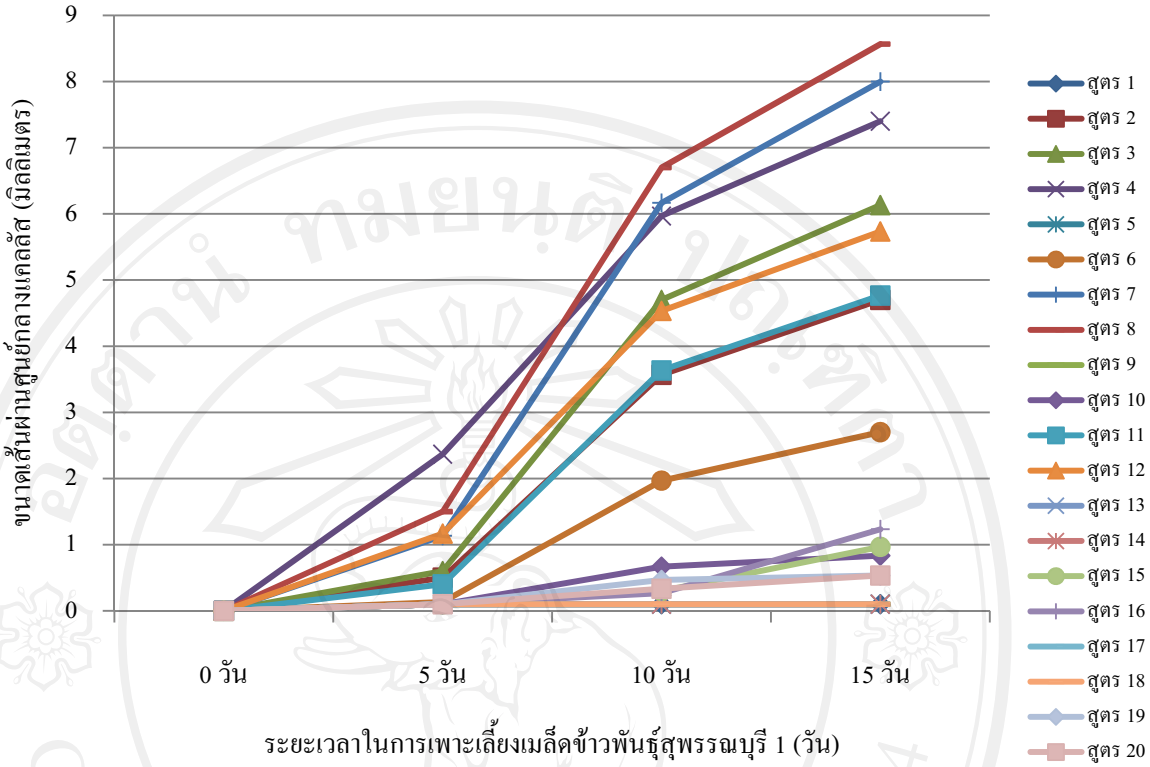
จากการทดลองพบว่า ผงถ่านกัมมันต์ และ 2,4-D ไม่มีปฏิกิริยาร่วมซึ่งกันและกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัส กรรมวิธีที่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ แต่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม สามารถชักนำแคลลัสที่เกิดขึ้นให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย คือ 2.37 มิลลิเมตรและไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่ผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.50 มิลลิเมตร, กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.17 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 2 มิลลิกรัม แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.13 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.2)

โดยทั่วไปการงอกของเมล็ดพืช ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเมล็ดจะดูดน้ำรวดเร็วแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ด และอุณหภูมิในขณะนั้น เมื่อน้ำเข้าไปในเมล็ดในปริมาณที่เพียงพอ น้ำจะไปช่วยกระตุ้นการทำงานขององค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ ทำให้มีการย่อยสลายอาหารต่างๆที่เก็บสะสมไว้ในเมล็ด อาหารที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กๆ ในรูปที่ละลายน้ำนี้ก็จะเคลื่อนย้ายไปยังจุดเจริญ เพื่อสร้างหรือสังเคราะห์อาหารขึ้นมาใหม่ เพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตของแคลลัส (ชยพร, 2546) และเมื่อแคลลัสมีการเจริญเติบโตและสารอาหารภายในเมล็ดเริ่มที่จะหมดลง จึงเริ่มมีการดูดสารอาหารจากอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมล็ดข้าวจะมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณคัพภะของเมล็ดที่เพาะเลี้ยง แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสยังไม่ใหญ่มากพอที่จะเห็นความแตกต่างในแต่ละสูตรได้ชัดเจน เนื่องมาจากแคลลัสยังไม่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ยังใช้อาหารสะสมภายในเมล็ด และเมื่อนำข้อมูลที่ได้นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัส (แกน Y) กับ ระยะเวลา (แกน X) ดังภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสไปแล้ว 5 วัน จะเรียกช่วงแรก คือ ช่วงระยะเวลา 0-5 วัน ว่า ระยะแลคเฟส (lag phase) ซึ่งจัดว่าอยู่ในระยะพัก (คำนูณ, 2544) ซึ่งเป็นระยะแรกหลังจากที่เซลล์ได้รับอาหาร ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ไม่มีการเติบโต มีแต่การเปลี่ยนแปลงทางเคมีเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์ (สมพร, 2549) ดังนั้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัส ในกรรมวิธีที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ จึงมีขนาดใกล้เคียงใกล้ แต่แคลลัสที่เจริญเติบโตในกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D จะมีการเจริญเติบโตดีกว่าอาหารดัดแปลงที่ปราศจาก 2,4-D เนื่องจาก 2,4-D มีคุณสมบัติในการไปปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ ซึ่งจะใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนแคลลัสและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ (รังสฤษฎ์, 2540) จากการทดลองของ เผดิมและคณะ (2532) ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติก 370 ในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลง 9 สูตร ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% และ เติม 2,4-D 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดข้าวที่เลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสและสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตรที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยอาหารสูตรที่มีการเติม 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร , NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากสุด คือ 50% และจากการทดลองนี้พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ร่วมกับ ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.10 กรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่กว่า กรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15-0.20 กรัมต่อลิตร แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการเติมผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ระดับความเข้มข้นเท่าใดจึงจะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสจึงต้องทำการสังเกตการเจริญเติบโตของแคลลัสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นเวลา 10-15 วัน

จากการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสไปแล้ว 10 วัน เรียกช่วงที่ 2 คือ เมื่อเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ต่อไปเป็นเวลา 5-10 วัน ว่า ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียลเฟส (exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์เริ่มมีการแบ่งตัว ทำให้เซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและมีการเจริญของเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าระยะแลคเฟส (คำนูณ, 2544) ดังการทดลองจะพบว่าที่ระยะเวลา 10 วันหลังจากทำการเพาะเลี้ยงแคลลัส อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสจะเพิ่มขึ้นและเป็นระยะที่มีการเจริญของแคลลัสอย่างรวดเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากแคลลัสเริ่มดูดใช้ธาตุอาหารจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นแหล่งธาตุอาหารที่สมบูรณ์มากกว่า อีกทั้งยังมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะต่อการพัฒนาของแคลลัส จึงทำให้การเจริญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของแคลลัสเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ 5 วันแรกที่แคลลัสยังใช้อาหารสะสมจากภายในเมล็ดข้าว

และพบว่าที่ระยะเวลา 15 วันหลังจากทำการเพาะเลี้ยงแคลลัส จะเป็นระยะที่แคลลัสมีการเจริญเติบโตมากที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่ที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวไปแล้ว 15 วัน กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.84 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.58 มิลลิเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใส่ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.86 มิลลิเมตร, กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.60 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.20 กรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.32 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของผงถ่านกัมมันต์เพิ่มมากขึ้น แคลลัสจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยลดลง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสจะต่ำ หากใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.3)

นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 15 วัน พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆมีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสใหญ่ขึ้น พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.69 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.08 มิลลิเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.69 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ไม่ใส่ 2,4-D จะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสเลย (ตารางที่ 4.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3 ผลของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (มิลลิเมตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นระยะเวลา 15 วัน

ผงถ่านกัมมันต์	ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)				ค่าเฉลี่ย
(กรัมต่อลิตร)	0	1	2	3	(Mean Factor)
0	0.00f	4.70d	6.13bcd	7.40abc	4.58A
0.05	0.00f	2.70e	8.00ab	8.57a	4.84A
0.10	0.00f	0.83ef	4.77d	5.73cd	2.86B
0.15	0.00f	0.00f	0.97ef	1.23ef	0.60C
0.20	0.00f	0.00f	0.53f	0.53f	0.32C
ค่าเฉลี่ย	0.00C	1.69B	4.08A	4.69A	
$LSD_{0.05}$ ผงถ่าน (A)	0.96				
$LSD_{0.05}$ 2,4-D (B)	0.86				
$LSD_{0.05}$ AxB	1.92				

หมายเหตุ :ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

แต่ทั้งนี้กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ 2,4-D จะมีผลทำให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่กว่ากรรมวิธีที่ใช้ผงถ่านกัมมันต์หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D มีมีปฏิกิริยาร่วมซึ่งกันและกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัส โดยกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8.57 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8.00 มิลลิเมตร แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีอื่น จากการทดลองกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ 2,4-D แคลลัสที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่มากกว่า กรรมวิธีที่ใช้ผงถ่านกัมมันต์หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว นั่นคือเมื่อใส่ผงถ่านกัมมันต์ไม่ว่าจะมีระดับความเข้มข้นเท่าใดก็ตาม หากปราศจากการใส่ 2,4-D จะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส แต่หากใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะเพิ่มมากขึ้นตามสัดส่วนของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2,4-D ที่เพิ่มมากขึ้น โดยการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสมีขนาดใหญ่ คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 7.40-8.57 มิลลิเมตร และหากมีการเติมผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร ไม่ว่าจะใช้ร่วมกับ 2,4-D ที่มีระดับความเข้มข้นมากน้อยเพียงใด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสก็ยังคงมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามสัดส่วนของความเข้มข้น 2,4-D ที่เพิ่มขึ้น แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้จะมีค่าน้อยมาก ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแคลลัสจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.53-5.73 มิลลิเมตร ดังนั้นกรรมวิธีที่ใช้ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จะช่วยให้แคลลัสมีการเจริญและพัฒนาได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้ 2,4-D หรือผงถ่านกัมมันต์อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4.3)

จากการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสไปแล้ว 15 วัน เรียกช่วงที่ 3 คือ เมื่อเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ต่อไปเป็นระยะเวลา 10-15 วัน ว่า ระยะลิเนียเฟส (linear phase) ระยะนี้จะมีการแบ่งตัวของเซลล์มากที่สุด ซึ่งหากผ่านระยะนี้ไป การแบ่งเซลล์ก็จะเริ่มลดลง จนจำนวนเซลล์คงที่และหยุดการเจริญเติบโตในที่สุด ดังภาพที่ 4.1 (สมพร, 2549) ระยะนี้จะมีอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด ก่อนที่อัตราการเจริญเติบโตจะคงที่และลดลงในที่สุด ระยะที่แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่ถึง 8.57 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นแคลลัสที่เกิดขึ้นในกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ใช้ผงถ่านและ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะทำให้แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด เช่นเดียวกับที่ระยะเวลา 10 วัน

ซึ่งการเจริญของแคลลัสที่เพิ่มมากขึ้นนี้จะทำให้มีการใช้อาหารไปเป็นจำนวนมากและจะทำให้แคลลัสมีการปล่อยของเสียออกมา โดย รังสฤษฎ์ (2540) ได้รายงานไว้ว่าสารประกอบที่เนื้อเยื่อพืชปล่อยออกมานี้ เรียกว่าสารประกอบฟีโนลิก สารนี้จะทำให้การเจริญและการเติบโตของแคลลัสหยุดชะงักไป การเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปในอาหารจะช่วยไปดูดซับสารพิษพวกสารประกอบฟีโนลิกที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงได้ปล่อยออกมา ให้เอื้ออำนวยต่อสภาพการเจริญเติบโตของแคลลัส จึงทำให้แคลลัสสามารถเจริญต่อไปได้ และคำนูณ (2544) ได้รายงานอีกว่าของเสียที่ปล่อยออกมาจะทำให้ pH มีค่าต่ำเกินไป ทำให้ฮอร์โมนบางตัว สลายได้ง่ายและวุ้นไม่แข็งตัว ทำให้พืชดูดฮอร์โมนเหล่านี้ไปใช้ไม่เพียงพอ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวบัฟเฟอร์ที่ใช้เพื่อควบคุม pH ของอาหาร ช่วยคงคงสภาพเสถียรของ pH

นอกจากนี้ Pierik (1987) รายงานว่า ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพวกธัญพืช จำเป็นต้องใส่ 2,4-D ในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัส ซึ่ง 2,4-D มีส่วนสำคัญในกระบวนการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอมบริโอเจเนซิสของพืช รังสฤษดิ์ (2540) ขยายความอีกว่าปริมาณความเข้มข้น 2,4-D ที่ใช้ จะอยู่ในระดับ 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่จากรายงานของ Vajrabhya *et al.* (1984) ระบุความจำเป็นในการใช้ 2,4-D แคบขึ้นมาอีกว่า ข้าวไทยนั้นเหมาะสำหรับการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร Pierik (1987) รายงานว่าการที่ 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสให้มีจำนวนมากและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ได้ เนื่องจาก 2,4-D ไปยับยั้งการเกิดยอดจึงทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นก้อนแคลลัสและเซลล์มีการขยายขนาด แต่ในการทดลองนี้พบว่าหากมีการใช้ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือตั้งแต่ 0.10 – 0.20 กรัมต่อลิตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสจะมีค่าลดลง บุญยืน (2544) ได้ระบุว่าผงถ่านกัมมันต์มีทั้งข้อดีและข้อเสีย คือ นอกจากผงถ่านกัมมันต์จะสามารถดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญ แต่ผงถ่านกัมมันต์อาจดูดซับฮอร์โมนที่ใส่ลงไปได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งจะมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืชและจะทำให้อาหารมีสีดำ ทำให้แคลลัสที่จมอยู่ในอาหารไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้หากเติมในปริมาณมากเกินไป และจากงานทดลองของ Buffard-Morel *et al*. (1995)ได้กล่าวว่าผงถ่านนอกจากจะดูดสารยับยั้งการเจริญแล้ว ผงถ่านอาจจะดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกด้วย การเติม 2,4-D และผงถ่านกัมมันต์ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อเติม 2,4-D ปริมาณ $4.5x10^{-4}$ โมลาร์ และผงถ่านกัมมันต์ 3 กรัมต่อลิตร หลังจากผ่านไป 21 วัน ผงถ่านจะไปดูด 2,4-D จนมีปริมาณเหลือแค่ 0.47% ของปริมาณ 2,4-D ที่ใส่ไปทั้งหมด ดังนั้นการใช้ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในปริมาณที่เหมาะสมก็จะช่วยให้แคลลัสมีการเจริญและพัฒนาได้ดีกว่าการใช้ 2,4-D หรือผงถ่านกัมมันต์อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว

สีของแคลลัส

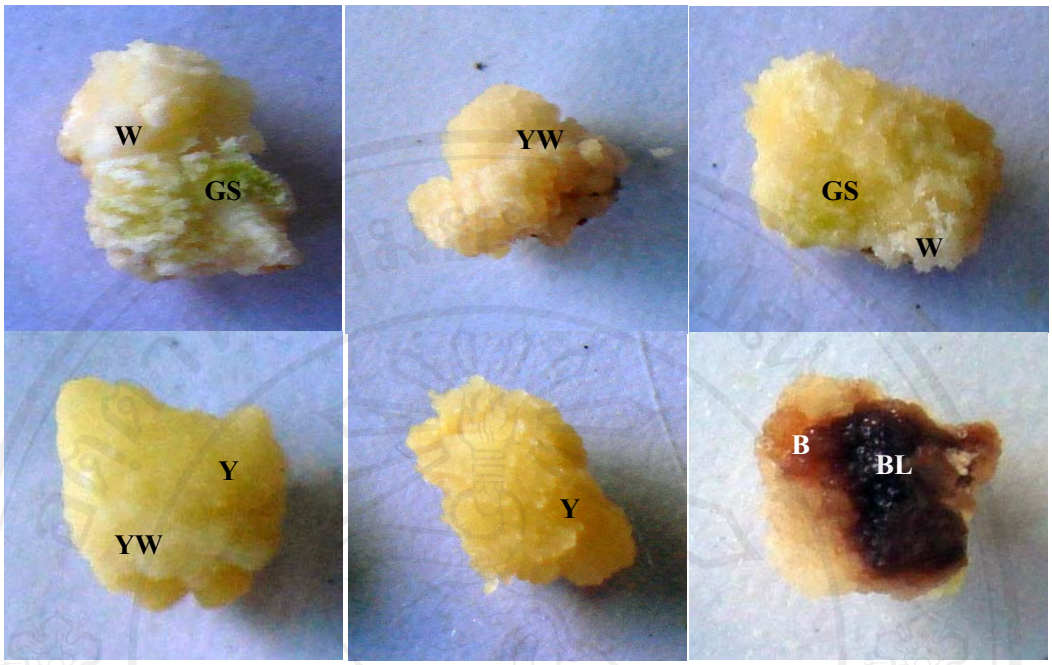
การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร LS ดัดแปลงที่เติมผงถ่านกัมมันต์และฮอร์โมน 2,4-D ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 5-10 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว พบว่าอาหารทุกสูตร ยกเว้นอาหารสูตรที่ 1, 5, 9, 13, 14,17 และ 18 เริ่มมีการชักนำให้เกิดแคลลัสและแคลลัสมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งแคลลัสที่เกิดอาจเจริญเป็นแคลลัสต่อไปหรืออาจจะมีการเปลี่ยนสภาพไปเป็นยอดหรือราก ในภายหลัง การเจริญของแคลลัสในระยะนี้ยังไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวได้ 15 วัน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีการเจริญเติบโตมากขึ้น แต่ยกเว้นอาหารสูตรที่ 1, 5, 9, 13, 14,17 และ 18 ยังคงไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการทดลองสามารถแบ่งสีของแคลลัสได้เป็น 6 สี คือ ขาว เหลืองปนขาว เหลือง น้ำตาล ดำและจุดสีเขียว โดยกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่ 2,4-D ลงไปในอาหารจะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสไม่ว่าจะใส่ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นเท่าใดก็ตาม แต่ในกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ในระดับความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้นต่างๆ แต่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขึ้นได้ และการใช้ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น แคลลัสที่เกิดก็จะมีปริมาณการเกิดแคลลัสที่เป็นสีเหลืองมากขึ้นตามความเข้มข้น 2,4-D ที่เพิ่มมากขึ้น โดยกรรมวิธีที่มีการใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสที่เกิดมีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลือง 66.67% รองลงมาคือ การใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสที่เกิดมีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลือง 46.67% แต่ทั้งนี้การใส่ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสที่เกิดมีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลืองมากขึ้น โดยการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลืองมากที่สุด คือ 73.33% รองลงมาคือการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลือง 60.00% ซึ่งมีค่ามากกกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อใช้ 2,4-D ไม่ว่าจะมีระดับความเข้มข้นมากน้อยเท่าใด ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น คือ กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลืองลดลง นั่นคือ เมื่อความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้น จะทำให้มีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลืองลดลง ตามสัดส่วนของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองหากใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสที่เกิดมีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลือง 0.00-53.33% และหากใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15-0.20 กรัมต่อลิตร ไม่ว่าจะใช้ร่วมกับ 2,4-D ปริมาณมากน้อยเท่าใด จะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส หรือหากมีการชักนำให้เกิดแคลลัส จะทำให้แคลลัสที่เกิดมีปริมาณการเกิดเป็นแคลลัสสีเหลืองน้อยมาก และจากการทดลองนอกเหนือจากนั้นบางสูตรอาจเกิดแคลลัสสีขาว จุดเขียวและน้ำตาลบ้างเล็กน้อย โดยแคลลัสที่เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ แสดงว่าเนื้อเยื่อถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อและตายในที่สุด (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.2 สีแคลลัสหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นระยะเวลา 15 วัน ขาว (White calli; W) เหลืองปนขาว (Yellow white calli; YW) เหลือง (Yellow calli; Y) น้ำตาล (Brown calli; B) ดำ (Black calli; BL) และจุดสีเขียว (Green spot; GS)

คำนูณ (2544) รายงานว่า แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น เมล็ด ราก ใบ ชิ้นส่วนพืชเหล่านี้จะประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น อิพิเดอร์มิส คอร์เทกซ์ เนื้อเยื่อลำเลียง ซึ่งแต่ละชั้นประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ ที่อาจเหมือนหรือแตกต่างกัน ดังนั้นการเจริญของแต่ละชั้นก็จะแตกต่างกันออกไป บางชั้นจะให้แคลลัสที่ดีกว่าอีกชั้นหนึ่ง หรือให้แคลลัสที่มีสีและรูปร่างไม่เหมือนกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง และการเกิดสีของแคลลัสก็ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสีของชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง กล่าวคือชิ้นส่วนของพืชที่มีสีเขียวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงอาจให้แคลลัสที่ไม่มีสี ทั้งนี้การเกิดสีของแคลลัสขึ้นอยู่กับสภาวะทางเคมีและกายภาพ เช่นเดียวกับประศาสตร์ (2536) ได้กล่าวว่าสีของแคลลัสจะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของรงควัตถุต่างๆ ภายในเซลล์ แต่ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ มีส่วนน้อยจะพบว่ามีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์และฟราโวนอยด์ สิ่งเหล่านี้จะสามารถสร้างขึ้นมาในระหว่างการเพาะเลี้ยง และจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะปัจจัยแสง แคลลัสที่มีสีเหลืองจะสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ แต่แคลลัสที่มีสีขาวจะตายในที่สุดเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และหากแคลลัสมีสีน้ำตาลหรือดำ ซึ่งเรียกว่า necrotic tissue จะเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว หากมีการสับ

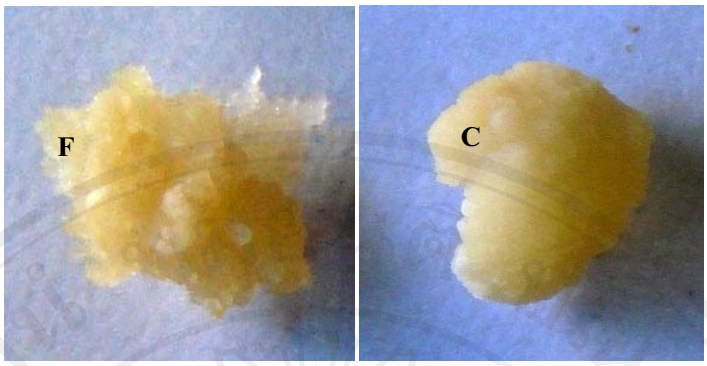
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คัลเจอร์ควรตัดส่วนเดิมที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำทิ้ง เพราะถ้าไม่ตัดทิ้งอาจลามทำให้แคลลัสที่เกิดใหม่และแคลลัสที่อยู่ข้างเคียงที่แข็งแรงตายไปด้วย

ชนิดของแคลลัส

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวได้ 15 วัน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีการเจริญเติบโตมากขึ้น แต่ยกเว้นอาหารสูตรที่ 1, 5, 9, 13, 14,17 และ 18 ยังคงไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ปราศจากการใส่ 2,4-D ลงไปในอาหารจะไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสไม่ว่าจะใส่ผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นเท่าใดก็ตาม แต่ในกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆ แต่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขึ้นได้ และการใช้ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะทำให้แคลลัสที่ได้นั้นเป็นชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสมากขึ้น และแคลลัสชนิดคอมแพคแคลลัสลดลง โดยกรรมวิธีที่มีการใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสมากถึง 66.67% รองลงมา คือ การใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัส 60.00% แต่ทั้งนี้การใส่ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสที่ได้นั้นเป็นชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสมากขึ้น และแคลลัสชนิดคอมแพคแคลลัสลดลง โดยการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสมากที่สุด คือ 83.33% รองลงมาคือการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัส 76.67% ซึ่งมีค่ามากกกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อใช้ 2,4-D ไม่ว่าจะมีระดับความเข้มข้นมากน้อยเท่าใดร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ กรรมวิธีที่มีผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสที่เกิดส่วนใหญ่เป็นแคลลัสชนิดคอมแพคแคลลัส นั่นคือ เมื่อระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้น แคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นชนิดคอมแพคแคลลัสมากขึ้นตามสัดส่วนของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ที่เพิ่มขึ้น และแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสลดลงจากการทดลองหากใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดคอมแพคแคลลัส 49.17-100% เกิดไฟรเอเบิลแคลลัส 0.00-50.83% และหากใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.15-0.20 กรัมต่อลิตร ไม่ว่าจะใช้ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นมากน้อยเท่าใด จากผลการทดลองกรรมวิธีที่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ หรือใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดส่วนใหญ่เป็นแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัส (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.3 ชนิดของแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นระยะเวลา 15 วัน (F = friable callus, C = compact callus)

ประศาสตร์ (2536) กล่าวว่าเนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ ไฟรเอเบิลแคลลัสเนื่องจากเป็นแคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกออกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน โดยศิวพงศ์ (2546) ได้รายงานไว้ว่าเมื่ออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความเข้มข้นของออกซินสูง เนื้อเยื่อจะสามารถสร้างแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสได้ แต่จากการทดลองกรรมวิธีที่ที่ใส่ผงถ่านเพียงอย่างเดียว โดยปราศจาก 2,4-D จะไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลย และหากใช้ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ กรรมวิธีที่มีระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ตั้งแต่ 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดส่วนใหญ่จะเป็นชนิด คอมแพคแคลลัส(compact callus) โดย Inoue และ Maeda (1980) รายงานว่าการเกิดยอดและรากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวมักจะเกิดโดยผ่านแคลลัสชนิดคอมแพคแคลลัสมากกว่าไฟรเอเบิลแคลัส และ บุญยืน (2544) กล่าวว่าผงถ่านกัมมันต์นอกจากจะมีคุณสมบัติในการดูดสารประกอบฟีโนลิกแล้ว ยังสามารถดูดซับฮอร์โมนที่ใส่ลงไปในอาหารได้อีกด้วย ดังนั้นการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับความเข้มข้นที่สูง ผงถ่านกัมมันต์จะไปแย่งดูดฮอร์โมนในอาหาร จึงทำให้แคลลัสไม่สามารถดูดฮอร์โมนไปใช้ได้อย่างเพียงพอต่อการเจริญและพัฒนา และคำนูณ (2544) รายงานว่า พืชชนิดเดียวกันอาจให้แคลลัสเป็นทั้งแบบไฟรเอเบิลแคลลัสและคอมแพคแคลลัส และอาจเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างกันได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารที่เลี้ยง เช่น Blakely และ Steward (1961) ได้เพาะเลี้ยง *Haplopappus gracilis* ในอาหารที่เปลี่ยนระดับความเข้มข้นของ NAA และน้ำมะพร้าวจะทำให้แคลลัสเกิดการเปลี่ยนไปมาระหว่างไฟรเอเบิลแคลลัสและคอมแพคแคลลัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 ผลของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อสีและชนิดของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 เป็นเวลา 15 วัน

สูตรอาหาร LS (1965) ดัดแปลง	สีของแคลลัส (%)						ชนิดของแคลลัส (%)	
	ขาว	เหลืองปนขาว	เหลือง	น้ำตาล	ดำ	จุดสีเขียว	คอมแพค	ไฟรเอเบิล
1) LS	-	-	-	-	-	-	-	-
2) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D	16.67	23.33	26.67	20.00	-	13.33	46.67	53.33
3) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D	13.33	26.67	46.67	3.33	-	10.00	40.00	60.00
4) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D	3.33	20.00	66.67	6.67	-	3.33	33.33	66.67
5) LS + 0.05 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
6) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} AC	10.00	23.33	36.67	20.00	3.33	6.67	43.33	56.67
7) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} AC	6.67	26.67	60.00	3.33	-	3.33	23.33	76.67
8) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} AC	-	16.67	73.33	6.67	-	3.33	16.67	83.33
9) LS + 0.10 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
10) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} AC	-	100.00	-	-	-	-	100.00	-
11) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} AC	7.50	39.17	53.33	-	-	-	49.17	50.83
12) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} AC	-	30.00	46.67	23.33	-	-	53.33	46.67

*หมายเหตุ : - = ไม่เกิดแคลลัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลของระดับความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อสีและชนิดของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว พันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นเวลา 15 วัน

สูตรอาหาร LS (1965) ดัดแปลง	สีของแคลลัส (%)						ชนิดของแคลลัส (%)	
	ขาว	เหลืองปนขาว	เหลือง	น้ำตาล	ดำ	จุดสีเขียว	คอมแพค	ไฟรเอเบิล
13) LS + 0.15 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
14) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
15) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} AC	-	-	-	100.00	-	-	100.00	-
16) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} AC	-	57.78	34.81	7.41	-	-	92.60	7.40
17) LS + 0.20 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
18) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
19) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} AC	-	-	-	-	100.00	-	100.00	-
20) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} AC	-	-	-	100.00	-	-	100.00	-

*หมายเหตุ : - = ไม่เกิดแคลลัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

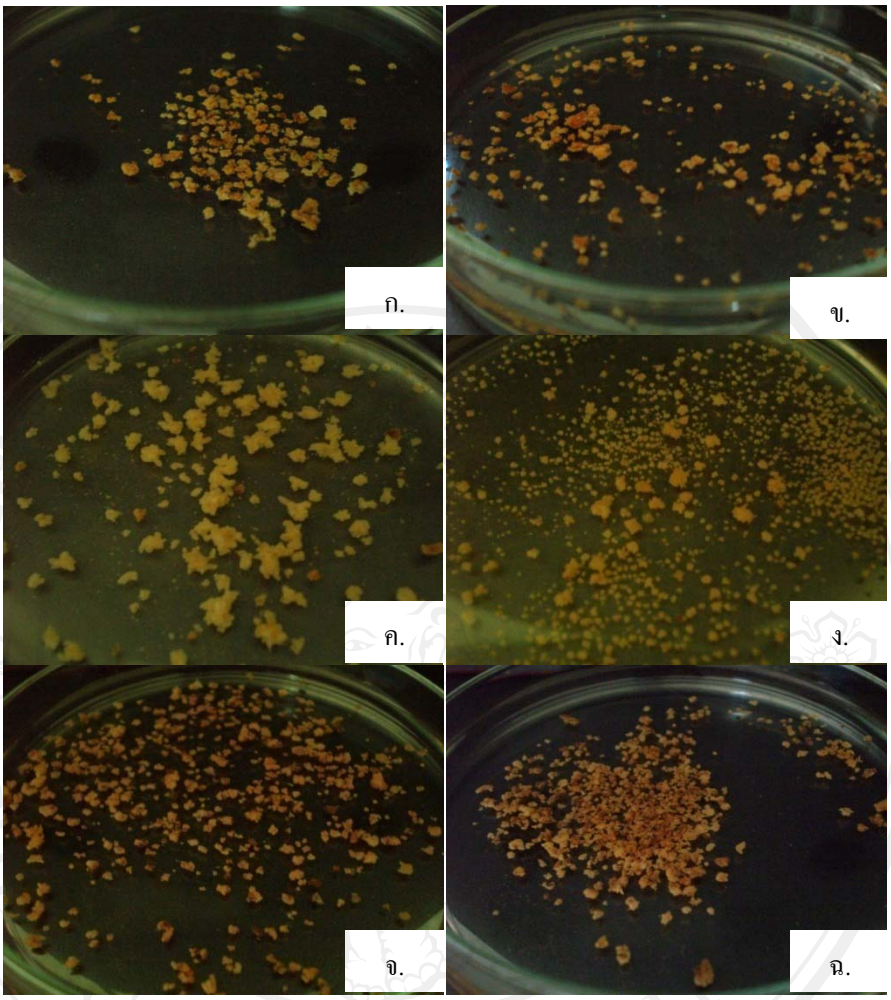
การทดลองที่ 2 ระดับ 2,4-D ที่เหมาะสมที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัส เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอ

หลังจากนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสอายุ 15 วัน มาแยกเป็นชิ้นเล็กๆ และนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 6 ระดับ คือ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ เพื่อชักนำให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ

จากการทดลองแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวยังคงอยู่ในระยะ proembryo ไม่มีการแยกตัวไปเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์มีสีเหลืองซีด มีเพียงการเจริญเติบโตขยายขนาดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังภาพที่ 4.4 (ก.) หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในระยะแรกของการเลี้ยงนี้จะเป็นการปรับตัวของแคลลัส จากการเลี้ยงในสภาพอาหารแข็งไปสู่การเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว หลังจากนั้น 2 สัปดาห์แคลลัสเริ่มมีการแยกตัวไปเป็นเซลล์เดี่ยวเล็กน้อย แคลลัสที่เหลือยังคงเป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการแยกไปเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์จะมีสีเหลืองซีดอมน้ำตาล ดังภาพที่ 4.4 (ข.)หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ และเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.4 การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ก. 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ค. 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ง. 12 มิลลิกรัมต่อลิตร จ. 16 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉ. 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในระยะแรกของการเลี้ยงนี้จะเป็นการปรับตัวของแคลลัส จากการเลี้ยงในสภาพอาหารแข็งไปสู่การเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว มีการแยกตัวไปเป็นเซลล์เดี่ยวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ แคลลัสที่เหลือยังคงเป็นกลุ่มเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดขึ้นมีเพียงการเจริญเติบโตขยายขนาดมากขึ้นเท่านั้น และกลุ่มเซลล์ยังไม่มีการแยกตัวไปเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์มีสีเหลือง ดังภาพที่ 4.4 (ค.) หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในระยะแรกของการเลี้ยงนี้จะเป็นการปรับตัวของแคลลัส จากการเลี้ยงในสภาพอาหารแข็งไปสู่การเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว แต่มีการแยกตัวของแคลลัสไปเป็นเซลล์เดี่ยวเร็วกว่าและมีปริมาณเซลล์เดี่ยวมากกว่าระดับความเข้มข้นอื่น โดยมีการแยกตัวจากกลุ่มเซลล์ไปเป็นเซลล์เดี่ยว 80% หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ และเซลล์เดี่ยวมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอยู่ในระยะ globular ประมาณ 30-40% และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพัฒนาไปสู่ระยะ heart เล็กน้อย ซึ่งจะมีกลุ่มเซลล์และเซลล์เดี่ยวหลงเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เซลล์มีสีเหลืองเข้ม ดังภาพที่ 4.4 (ง.) หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 16 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีการแยกตัวของแคลลัสไปเป็นเซลล์เดี่ยวเร็วรองลงมาจากการกระตุ้นด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการแยกตัวจากแคลลัสไปเป็นเซลล์เดี่ยว 60% หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ เซลล์เดี่ยวมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอยู่ในระยะ globular ประมาณ 10-20% และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอยู่ในระยะ heart เล็กน้อย ซึ่งจะมีกลุ่มเซลล์และเซลล์เดี่ยวหลงเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ดังภาพที่ 4.4 (จ.)

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แคลลัสที่นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวมีการแยกตัวไปเป็นเซลล์เดี่ยวเล็กน้อย และเซลล์ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังภาพที่ 4.4 (ฉ.) และหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์เซลล์จะตายในที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทดลองเซลล์เดี่ยวสามารถเจริญขึ้นมาเป็นต้นพืชได้เนื่องจากมีสารพันธุกรรมอยู่ครบในเซลล์แต่ละเซลล์ (ศิวพงศ์, 2546)

Torres (1989) ได้รายงานขั้นตอนการทำให้เกิดเอมบริโอไม่เกี่ยวกับเพศจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยไว้ว่า ควรทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนและออกซิน นำแคลลัสที่ได้มาพัฒนาเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารชนิดเดียวกันกับที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัส จากนั้นจึงทำการลดออกซินในอาหารให้มีความเข้มข้นน้อยลงหรือไม่มีออกซินในอาหารเลย หลังจากนั้นจะได้เอมบริโอที่สามารถงอกและเจริญเป็นต้นอ่อน

ซึ่งจากการทดลอง การนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติม2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่มีการลดปริมาณออกซินในอาหารลง คือให้มี 2,4-D ความเข้มข้นเพียง 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะพบว่าเซลล์เดี่ยวมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอยู่ในระยะ globular ประมาณ 40-50% ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าความเข้มข้นระดับอื่น และเซลล์บางเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอยู่ในระยะ heart บ้างเล็กน้อย และจะมีกลุ่มเซลล์และเซลล์เดี่ยวเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นระดับอื่น ทั้งนี้การใช้ 2,4-D ความเข้นข้น12 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในระยะแรกอาจเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะกระตุ้นให้เซลล์และยีนบางตัวที่หยุดทำงานไปกลับมาทำงานใหม่อีกครั้ง ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์และมีการเจริญพัฒนาต่อไป

ซึ่งสอดคล้องกับ Torres (1989) ที่รายงานไว้ว่า การเกิดเอมบริโอโดยอ้อมนั้น เกิดจากการที่เซลล์เปลี่ยนไปเป็นแคลลัส แล้วจึงเปลี่ยนมาเป็นเซลล์ที่จะเป็นเอมบริโอ เรียกเซลล์ที่จะเปลี่ยนไปเป็นเอมบริโอนี้ว่า อินดิวซ์เอมบริโอเจนิกดีเทอร์มีนด์เซลล์ (induced-embryogenic determined cells, IEDC) โดยเซลล์ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นแคลลัสแล้วนี้ จะกลับมาเป็นเซลล์เอมบริโอได้ใหม่ เพื่อเจริญเป็นเอมบริโอต่อไป จะต้องมีการใช้สารเร่งการเจริญเติบโตที่พอเหมาะเพื่อช่วยให้เซลล์กลับเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ช่วงที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ใหม่ และยีนบางยีนที่หยุดทำงานไปก็จะกลับมาทำงานได้ใหม่ทั้งหมด โดยสารเร่งการเจริญเติบโตที่ใช้จะเป็นสารพวกออกซิน หรืออาจใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนิน ซึ่ง 2,4-D เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชพวกข้าวและธัญพืชทั้งหลายในวงศ์แกรมินีและยังสามารถกระตุ้นได้ในระดับการถอดรหัสเซลล์และการแปลงรหัส โดยขั้นตอนการกระตุ้นจะเกิดขึ้นตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารตอนเริ่มต้น และเมื่อย้ายเนื้อเยื่อไปใส่ในอาหารใหม่ กระบวนการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหล่านี้ก็จะเกิดขึ้นทันที นอกจากนี้ ศิวพงศ์ (2546) ได้รายงานว่า นอกจากออกซินจะเป็นตัวที่สามารถกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอแล้ว การใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไคเนติน, ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออน, โพแทสเซียม และน้ำมะพร้าว ก็สามารถช่วยในการกระตุ้นให้เกิดเอมริโอได้เช่นกัน

จากการทดลองนี้หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์เป็นระยะเวลา 1 วันจึงมีการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ลดลง คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 25 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าหลังจากทำการเปลี่ยนอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นในทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการกระตุ้น แต่กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปได้มากที่สุด คือ ถึงระยะ globular หลังจากนั้นจะหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด

โดย Torres (1989) รายงานว่า สารเร่งการเจริญเติบโตที่ใส่ในอาหารจะช่วยให้เกิดการเปลี่ยนสภาพในเซลล์หรือยับยั้งไม่ให้เกิดการเปลี่ยนสภาพ แต่จะไม่ใช่ตัวกำหนดการเปลี่ยนสภาพภายในเซลล์ และ รังสฤษฏ์ (2540) ได้รายงานเกี่ยวกับการกำหนดพัฒนาของแคลลัสว่า การที่เซลล์มีความสามารถแรกเริ่มที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสิ่งจำเป็นอันดับแรก จะต้องมีการจัดสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงการพัฒนาหรือกำหนดพัฒนาการอื่นๆ คือ มีความพร้อมและมีกำหนดการพัฒนา โดยขั้นตอนคือต้องชักนำแคลลัสให้มีความสามารถเสียก่อนที่จะเริ่มมีการกำหนดพัฒนาเป็นเซลล์เอมบริโอ คือ เซลล์ที่ได้จากแคลลัสที่มีสภาพเป็นเซลล์เอมบริโอนั้นแรกสุดต้องได้รับออกซินสังเคราะห์ 2,4-D ก่อน ซึ่ง 2,4-D จะทำให้เกิดความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ คำนูณ (2542) กล่าวว่าเซลล์จะเติบโตในชั่วระยะเวลาแรกในสูตรอาหารที่มีออกซินอยู่ด้วยเป็นระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จากนั้นเซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต แต่ถ้าใส่สารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ตัวอื่นลงไปนอกเหนือจากสารพวกออกซิน เซลล์จะมีการเจริญพัฒนารูปร่างได้ต่อไป ขั้นตอนสุดท้ายจึงย้ายเซลล์ไปไว้ในอาหารที่ปราศจาก 2,4-D ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสภาพเงื่อนไขใหม่ จึงจะทำให้สามารถชักนำให้มีการกำหนดพัฒนาไปเป็นเอมบริโอได้ ก่อนย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตต้องใช้ระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เพราะถ้านานเกินไปจะยับยั้งไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อไปเป็นเอมบริโอ (รังสฤษฏ์, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

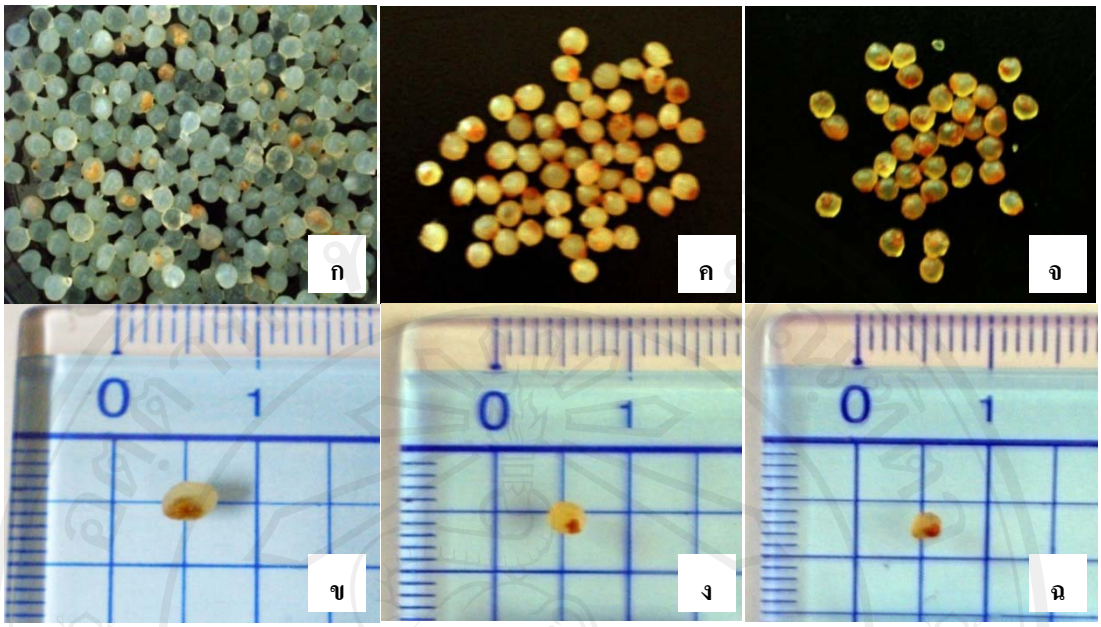
ศิวพงศ์ (2546) รายงานว่า การเจริญของเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเอมบริโอนั้น เริ่มต้นจากเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วกลับกลายไปเป็นเซลล์ที่ยังมีการเจริญ มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น แต่การเจริญของเซลล์เอมบริโอในระยะสุดท้ายก่อนที่จะมีการเปลี่ยนไปเป็นเอมบริโอจะเกิดขึ้นเมื่อในอาหารไม่มีออกซิน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Srinivasan and Mullins (1980) ได้ทำการเพาะเลี้ยงออวุลขององุ่นในอาหารสังเคราะห์ องุ่นจะมีการเจริญเป็นไฟรเอเบิลแคลลัส และเมื่อนำไฟรเอเบิลแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน แคลลัสจะสามารถเจริญไปเป็นเอมบริโอได้ เช่นเดียวกับ Reynolds and Murashige (1979) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์ม ในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดีนีนซัลเฟต 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ไมโออิโนซิทอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทอะมีน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อทำแคลลัสย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมนจะเกิดเอมบริโอขึ้น และเอมบริโอสามารถเจริญไปเป็นต้นอ่อนได้

ดังนั้นการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตลงไปในอาหารระยะแรกก็เพื่อช่วยให้เซลล์กลับเข้าสู่วัฏจักร ช่วยให้เซลล์มีการแบ่งตัว เจริญพัฒนารูปร่าง ดังนั้น หากมีการมีการเติมไซโตไคนิน, ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออน, โพแทสเซียม และน้ำมะพร้าว ร่วมในปริมาณที่เหมาะสม การเจริญของเซลล์จะสามารถเจริญต่อไปจนถึงระยะ heart และระยะ torpedo พัฒนาต่อไปจนเป็นเซลล์เอมบริโอ แล้วจึงทำการย้ายเซลล์เอมบริโอไปเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากฮฮร์โมนเซลล์เอมบริโอก็จะสามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริโอได้

การทดลองที่ 3 ผลของเปอร์เซ็นต์การดึงน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์โดยซิลิกาเจลต่อความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1

การศึกษาการดึงน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์ของข้าวด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 0, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5 ก.-ฉ.) ก่อนจะนำไปเก็บรักษาในจานเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการศึกษาการงอกในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการเพาะทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชั่วโมง เพื่อดูความงอกรวมที่เกิดขึ้นตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.5 เมล็ดสังเคราะห์ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ก่อนและหลังจากดึงน้ำออกจากเมล็ด

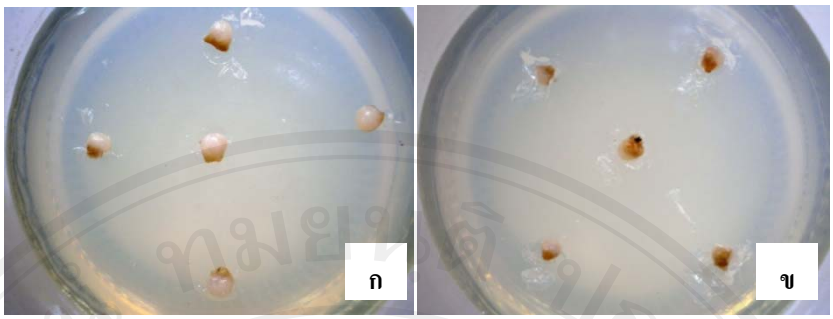
ก.-ข. เมล็ดสังเคราะห์ที่ไม่ได้ดึงนำออกจากเมล็ด

ค.-ง. เมล็ดสังเคราะห์ที่มีระดับการสูญเสียน้ำ 60 เปอร์เซ็นต์

จ.-ฉ. เมล็ดสังเคราะห์ที่มีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองพบว่า ไม่ว่าจะเป็นเมล็ดสังเคราะห์ที่ไม่ได้ทำการระเหยน้ำออก เมล็ดสังเคราะห์ที่มีระดับการสูญเสียน้ำ 60 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดสังเคราะห์ที่มีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีการงอกในระหว่างการเก็บรักษา และเมื่อพิจารณาถึงความงอกรวมที่เกิดขึ้นของเมล็ดสังเคราะห์ของข้าว พบว่าภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมล็ดสังเคราะห์ที่ไม่ได้ทำการระเหยน้ำออก เมล็ดสังเคราะห์ที่มีระดับการสูญเสียน้ำ 60 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดสังเคราะห์ที่มีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีการงอกเกิดขึ้นหลังจากทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.6 ก.-ข.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.6 ก.-ข. เมล็ดสังเคราะห์ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 หลังจากทำการเพาะความงอก

George (2008) ได้รายงานว่าเซลล์ที่กำลังมีการพัฒนาอยู่ในระยะ globular จะอยู่ในช่วงที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ยังไม่เห็นความแตกต่างของขนาดของเซลล์ องค์ประกอบภายในเซลล์และกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ยังไม่สมบูรณ์ เป็นระยะที่โครงสร้างภายในเซลล์กำลังมีการสร้างและพัฒนาในระยะเริ่มต้น เซลล์จะยังมีการพัฒนาต่อไป โดยจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ heart, ระยะ torpedo และเจริญเป็นเอมบริโอตามลำดับ ซึ่งเป็นเหตุผลที่รองรับการทดลองนี้ว่า เซลล์ที่กำลังมีการพัฒนาอยู่ในระยะ globular ยังมีการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์

เมื่อนำเซลล์ที่กำลังมีการพัฒนาอยู่ในระยะ globular จากการทดลองที่ 2 มาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ของข้าว โดยการนำเซลล์ที่กำลังมีการพัฒนาอยู่ในระยะ globular มาเคลือบด้วยวุ้นอัลจิเนต เพื่อทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม และนำมาทดสอบความงอกหลังจากทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดสังเคราะห์ของข้าวไม่มีการงอกระหว่างการเก็บรักษาและไม่สามารถงอกได้หลังจากทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เช่นเดียวกัน

ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า เปอร์เซ็นต์การดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยซิลิกาเจลจะมีผลต่อความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 หรือไม่ แต่จากการทดลองของ Senaratna (1990) พบว่าการดึงน้ำออกจากโซมาติกเอมบริโอมีผลต่อความแข็งแรงของเอมบริโอและต้นกล้าโดยโซมาติกเอมบริโอของถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa) ที่ผ่านการดึงน้ำออก (dehydrated) จะให้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงกว่าโซมาติกเอมบริโอที่ไม่ผ่านการดึงน้ำออก

และ สราวุธ (2546) รายงานว่าระดับของการสูญเสียน้ำมีผลต่อความงอกของเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งของอ้อย โดยพบว่าการไม่ระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์จะมีความงอกรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ระหว่างและหลังเก็บรักษา) 59 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อระดับการสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้น คือ ระเหยน้ำออกไป 80 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสังเคราะห์จะงอกได้เพียง 27 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved