หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

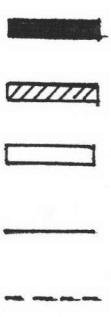
ในการศึกษาการเจริญของแคลลัสและรูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสและของต้นที่เจริญจากแคลลัสยาสูบ ใช้พืชตัวอย่างเป็นยาสูบ 2 ชนิด คือ Nicotiana tabacum และ Nicotiana rustica ได้แบ่งการรายงานผลเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. ผลการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ ซึ่งศึกษาการแปรในลักษณะการเกาะกลุ่มของเซลล์ สี น้ำหนักของแคลลัส และเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัสที่ได้จากส่วนลำต้นและใบยาสูบ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมออกซินต่างกัน

2. ผลการศึกษาการแปรในรูปแบบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในแคลลัสและต้นที่เจริญจากแคลลัสยาสูบ รวมทั้งยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกและที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมนที่ควบคุมสภาวะแวดล้อม เมื่อยาสูบอายุต่าง ๆ กัน

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ใช้เทคนิคทาง electrophoresis ซึ่งในการสกัดไอโซไซม์จากตัวอย่างพืช มีปัญหาในเรื่องคุณภาพและความอยู่ตัวของโปรตีนที่สกัดจากพืช เนื่องจากอาจมีสารพวก phenol หรือ quinone ปนมา phenol อาจเกิดปฏิกิริยาเชื่อมกับโปรตีนด้วยไฮโดรเจนบอนด์ ทำให้โปรตีนมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป จึงมีการใช้สารป้องกัน (protective reagent) เติมลงไป ในการทดลองนี้ใช้ PVP (Polyvinylpyrrolidone) ในการสกัดแยก phenol และ quinone ของพืช ออกจากโปรตีนซึ่งสอดคล้องกับที่ McCown, Beck and Hall ปี 1968 ได้อ้างถึงผลงานของ Loomis and Battaile ที่ใช้ PVP ร่วมในการสกัดโปรตีนจากใบของแอปเปิลและเปปเปอร์มินท์ด้วย และการใช้สารป้องกันร่วมไปกับการสกัดโปรตีนจากพืช จะช่วยให้โปรตีนมีคุณภาพสูงขึ้นและมีความคงที่มากขึ้น

รูปแบบไอโซไซม์ที่ได้ เมื่อนำมาเขียนเป็น zymogram จะแสดงความเข้มและตำแหน่งของแถบไอโซไซม์ในระดับต่าง ๆ กัน เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์จึงใช้สัญลักษณ์แทนดังนี้



เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีความเข้มสูงมาก

เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีความเข้มสูง

เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีความเข้มปานกลาง

เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีความเข้มต่ำ

เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีความเข้มต่ำมาก

1. ผลการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

1.1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ Nicotiana tabacum

1.1.1 การชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน

ชิ้นส่วนของลำต้นและส่วนใบของยาสูบ (รูปที่ 3 ก) ที่เลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสรอบบริเวณรอยตัดและตามรอยกรีดของลำต้นและใบ ในเวลาประมาณ 15 วัน หลังจากนั้นจึงย้ายแคลลัสลงในอาหารใหม่ ซึ่งบรรจุไว้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 200 มล. เพื่อศึกษาการเจริญของแคลลัส เมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลาต่าง ๆ กัน 30 50 70 และ 90 วัน โดยพิจารณาจากขนาดของแคลลัส (เส้นผ่าศูนย์กลาง) น้ำหนักแคลลัสความสูงของต้น regenerated plant (รูปที่ 3 ข.) โดยวัดจากส่วนโคนต้นไปยังปลายใบสุดท้ายของต้นยาสูบ ผลเป็นดังตารางที่ 7 พบว่า ขนาดและน้ำหนักของแคลลัส รวมทั้งความสูงของ regenerated plant ของแคลลัสที่เลี้ยงจากส่วนลำต้นและใบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ดูภาคผนวกที่ 1)

ตารางที่ 7 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน (ผลเฉลี่ยจากค่าการทดลอง 6 ซ้ำ)

ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)	ขนาดของแคลลัส (เส้นผ่าศูนย์กลาง, ซม.) ส่วนของ explant		น้ำหนักแคลลัส (กรัม) ส่วนของ explant		ความสูงของ (ซม.) regenerated plant ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
30	1.6	1.4	1.404	1.264	2.3	2.08
50	2.0	1.88	1.808	1.714	4.1	3.2
70	2.5	2.27	2.046	1.954	4.6	4.1
90	2.6	2.4	2.335	2.154	5.4	5.2

1.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส N. tabacum ในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้ (รูปที่ 4)

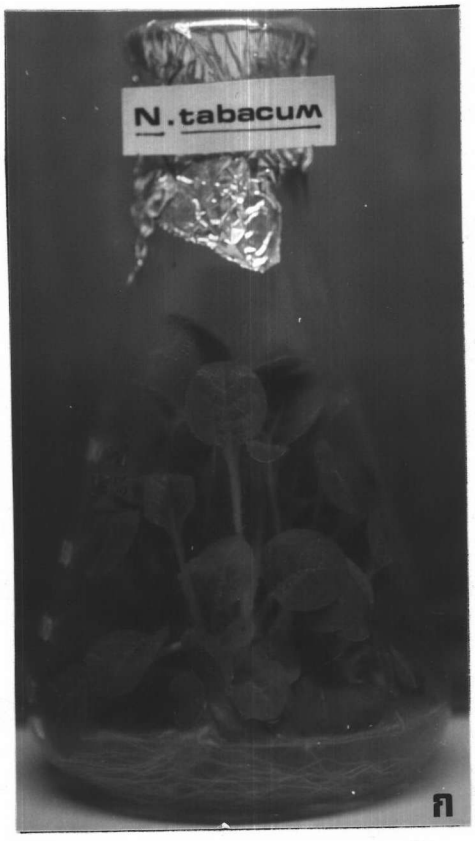
กลุ่มที่ 1 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่น มีสีค่อนข้างเขียว และเมื่อแคลลัสอายุมากขึ้นสีจะเขียวเข้มขึ้น

กลุ่มที่ 2 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ สีเขียวเหลืองและเมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีน้ำตาลปน

จากแคลลัสทั้ง 2 กลุ่ม นำส่วนหนึ่งไปศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดส ไอโซไซม์ และอีกส่วนหนึ่งเลี้ยงต่อไป เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาของแคลลัส ผลดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลแสดงว่าแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มให้เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่และมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสต่างกัน ทางสถิติ (ภาคผนวกที่ 5) โดยที่แคลลัสกลุ่มที่ 1 มีเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ และมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสสูงกว่าแคลลัสกลุ่มที่ 2 เห็นได้ชัดว่า แคลลัสที่มีลักษณะแบบกลุ่มที่ 1 น่าจะเป็นแคลลัสที่ประกอบด้วย embryogenic cells เป็นส่วนใหญ่จึงสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นได้มากกว่าแคลลัสกลุ่มที่ 2

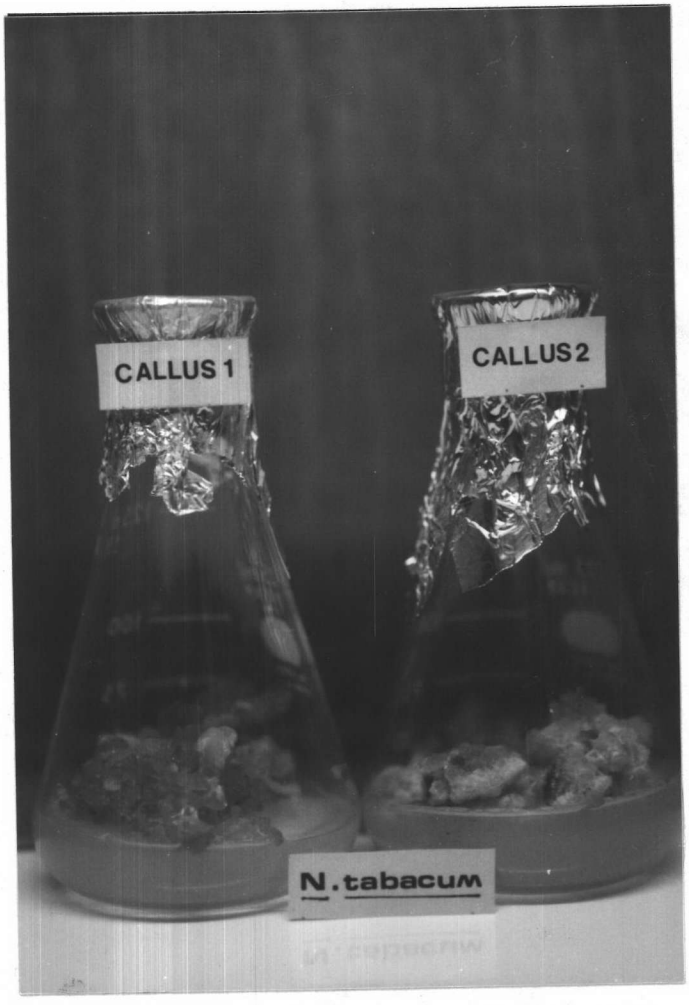
ตารางที่ 8 การพัฒนาของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ทั้ง 2 กลุ่มในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อแคลลัสอายุ 50 วัน (ผลจากการทดลอง 25 ซ้ำ)

แคลลัส	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)		น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสต่อชิ้น (กรัม)		regenerated plant (ต้น)		% regenerated plant	
	ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
กลุ่มที่ 1	54	61	1.927	1.831	36	32	66.67	52.46
กลุ่มที่ 2	36	27	1.315	1.276	9	6	25.00	22.22



รูปที่ 3. ก ต้นยาสูบ N. tabacum ที่เพาะในอาหารสังเคราะห์สำหรับใช้เป็น explant ในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ข regenerated plant ที่เกิดจากแคลลัสยาสูบ N. tabacum



รูปที่ 4. แคลลัสของ N. tabacum ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน สามารถจำแนกความแตกต่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

callus 1 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่น มีสีค่อนข้างเขียว เมื่อเลี้ยงต่อไป มีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูง

callus 2 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีเขียวเหลืองและมีสีน้ำตาลปน เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ต่ำ

1.1.3 การชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D และไคเนติน

ในการเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นและใบยาสูบ N. tabacum ในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากเลี้ยงในอาหารได้ 18 วัน หลังจากนั้นศึกษาในทำนองเดียวกันกับข้อ 1.1.1 ซึ่งได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 9 จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ขนาด น้ำหนัก และความสูงของ regenerated plant ของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและใบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ดูภาคผนวกที่ 2)

ตารางที่ 9 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล.และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน (ผลเฉลี่ยจากค่าการทดลอง 6 ซ้ำ)

ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)	ขนาดของแคลลัส เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.) ส่วนของ explant		น้ำหนักแคลลัส (กรัม) ส่วนของ explant		ความสูงของ (ซม.) regenerated plant ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
30	1.1	1.2	1.094	1.234	1.9	2.0
50	1.56	1.7	1.314	1.479	2.7	2.5
70	1.8	1.9	1.685	1.745	3.7	3.4
90	2.1	2.2	1.975	1.844	4.0	3.9

1.1.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส N. tabacum ในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D และไคเนติน

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์แบบหลวม มีสีเหลืองปนน้ำตาล และเมื่อแคลลัสมีอายุมากขึ้น จะมีสีน้ำตาลปนดำ มีลักษณะชุ่มน้ำ ดังรูปที่ 5 ก.

กลุ่มที่ 2 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์ค่อนข้างแน่น และแคลลัสมีสีเหลืองอ่อน เมื่อแคลลัสมีอายุมากขึ้นจะมีสีเขียวอ่อนปน ดังรูปที่ 5 ข.

จากแคลลัสทั้ง 2 กลุ่ม นำส่วนหนึ่งไปศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ และอีกส่วนหนึ่งเลี้ยงต่อไป เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาของแคลลัส ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10

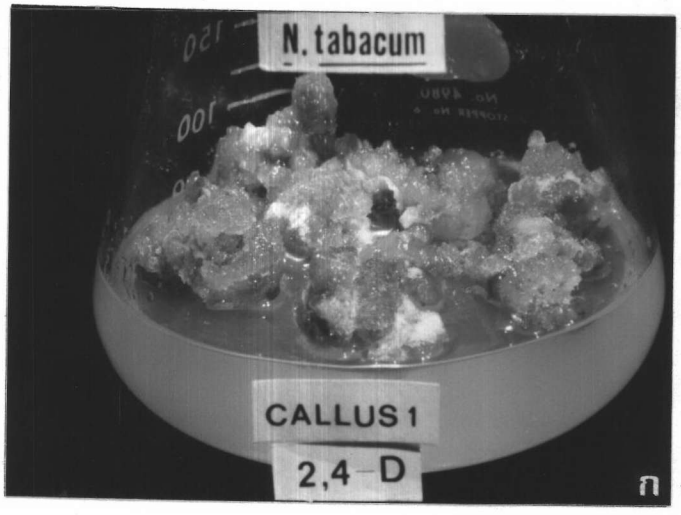
ตารางที่ 10 การพัฒนาของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ทั้ง 2 กลุ่มในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อแคลลัสอายุ 50 วัน (ผลจากการทดลอง 25 ซ้ำ)

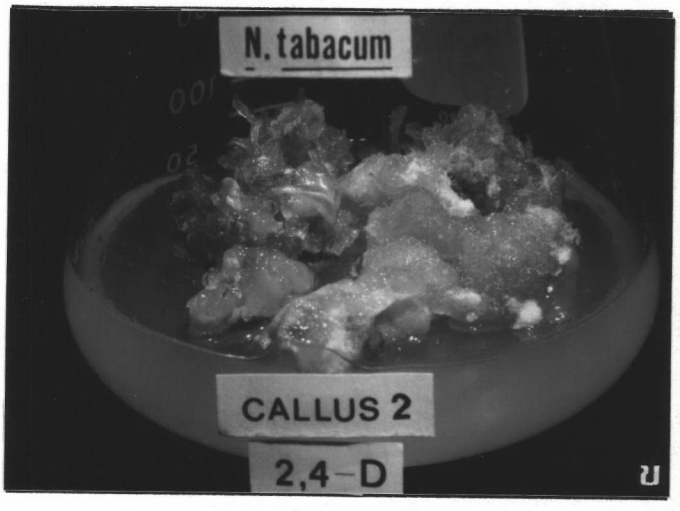
แคลลัส	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)		น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสต่อชิ้น (กรัม)		regenerated plant (ต้น)		% regenerated plant	
	ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
กลุ่มที่ 1	58	34	1.327	1.255	6	4	10.34	11.76
กลุ่มที่ 2	29	54	1.393	1.475	8	11	27.59	20.37

จากผลแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant และมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวกที่ 6) และจะสังเกตเห็นว่าเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารชักนำสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D ค่อนข้างต่ำมากเมื่อเทียบกับแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารชักนำสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA ดังรูปที่ 6 และในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัสจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ N. tabacum ในอาหารที่เติม IAA กับที่เติม 2,4-D

เปอร์เซนต์ regenerated plant ของแคลลัสที่เติม IAA				เปอร์เซนต์ regenerated plant ของแคลลัสในอาหารที่เติม 2,4-D			
แคลลัสกลุ่มที่ 1		แคลลัสกลุ่มที่ 2		แคลลัสกลุ่มที่ 1		แคลลัสกลุ่มที่ 2	
ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant	
ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
66.67	52.46	25.00	22.22	10.34	11.76	27.59	20.37

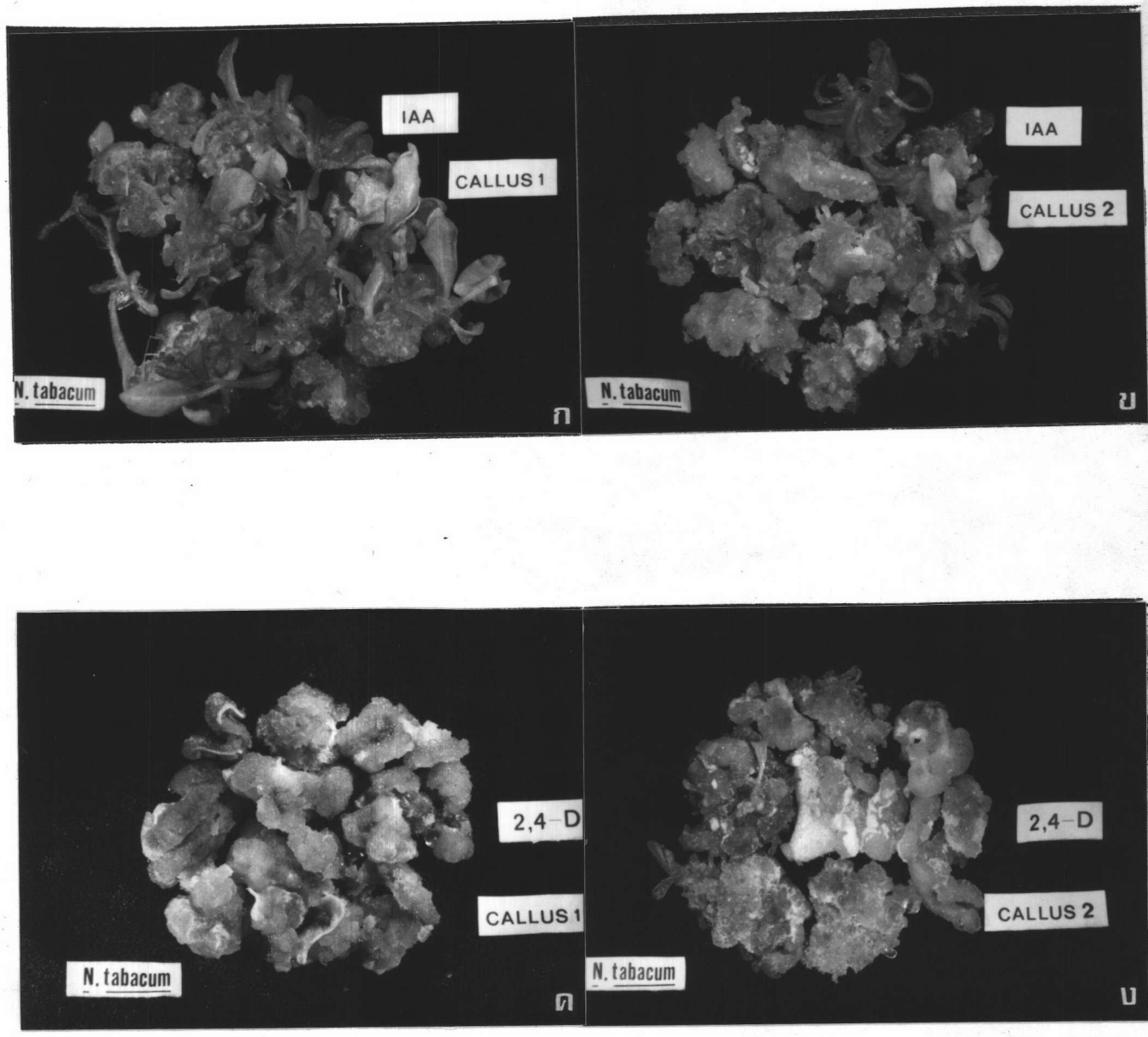




รูปที่ 5. แคลลัสของ N. tabacum ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D และไคเนติน สามารถจำแนกความแตกต่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. callus 1 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม มีสีเหลืองปนน้ำตาลดำ ชุ่มน้ำ เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ต่ำ

ข. callus 2 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่นกว่ากลุ่มที่ 1 มีสีเหลืองปนเขียว เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่า callus 1 เล็กน้อย



รูปที่ 6. เปรียบเทียบการเกิด regenerated plant ของแคลลัส N. tabacum

ก และ ข แคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แคลลัสรักนำจากอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA มี regenerated plant เกิดขึ้นมาก (โดยเฉพาะแคลลัสกลุ่มที่ 1)

ค และ ง แคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แคลลัสรักนำจากอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D จะเห็นว่า มี regenerated plant เกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแคลลัสที่รักนำในอาหารที่เติม IAA ในข้อ ก และ ข.

1.2 การเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ Nicotiana rustica

1.2.1 การชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน

ชิ้นส่วนของลำต้นและส่วนใบของยาสูบ (รูปที่ 7 ก) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสรอบบริเวณรอยตัดและตามรอยกรีด ในเวลาประมาณ 10 วัน หลังจากนั้นศึกษาในทำนองเดียวกับข้อ 1.1.1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบว่า ขนาดและน้ำหนักของแคลลัส รวมทั้งความสูงของ regenerated plant ของแคลลัสที่เลี้ยงจากลำต้นและใบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ดูภาคผนวกที่ 3)

ตารางที่ 12 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน (ผลเฉลี่ยจากค่าการทดลอง 6 ซ้ำ)

ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)	ขนาดของแคลลัส เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.) ส่วนของ explant		น้ำหนักแคลลัส (กรัม) ส่วนของ explant		ความสูงของ (ซม.) regenerated plant ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
30	1.5	1.3	0.976	0.814	2.5	2.35
50	1.9	1.63	1.114	0.995	3.6	3.4
70	2.2	1.98	1.582	1.364	4.2	3.9
90	2.3	2.1	1.617	1.449	5.0	4.58

1.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส N. rustica ในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ (รูปที่ 8)

กลุ่มที่ 1 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่น สีขาวขุ่นออกเขียวและจะมีสีเขียวเข้มขึ้น เมื่อแคลลัสอายุมากขึ้น

กลุ่มที่ 2 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ แคลลัสฟู มีสีขาวออกเหลือง และเมื่อแคลลัสอายุมากขึ้น จะมีสีออกน้ำตาลอ่อน

กลุ่มที่ 3 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์จับกันแน่นพอสมควร มีสีขาวใสออกเขียวและชุ่มน้ำ เมื่อแคลลัสอายุมากขึ้นจะมีสีเหลืองออกเขียว

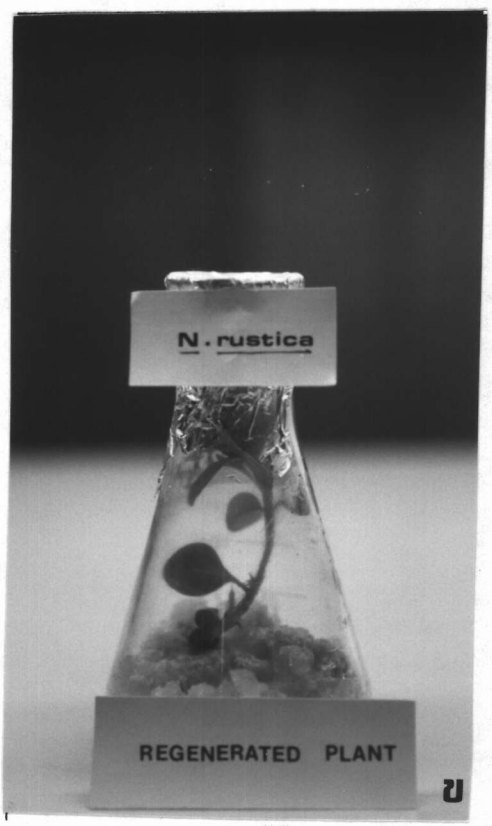
จากแคลลัสทั้ง 3 กลุ่ม นำส่วนหนึ่งไปศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ และอีกส่วนหนึ่งเลี้ยงต่อไป เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาของแคลลัส ผลดังแสดงในตารางที่ 13 เห็นได้ชัดว่า แคลลัสที่มีลักษณะแบบกลุ่มที่ 1 และ 3 น่าจะเป็นแคลลัสที่ประกอบด้วย embryogenic cells เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นได้มากกว่าแคลลัสกลุ่มที่ 2 และยังมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสสูงกว่าอีกด้วย แคลลัสทั้ง 3 กลุ่มมี % การเกิด regenerated plant และน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติ (ดังแสดงในภาคผนวกที่ 7)

ตารางที่ 13 การพัฒนาของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ทั้ง 3 กลุ่มในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อแคลลัสอายุ 50 วัน (ผลจากการทดลอง 25 ซ้ำ)

แคลลัส	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)		น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสต่อชิ้น (กรัม)		regenerated plant (ต้น)		% regenerated plant	
	ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
กลุ่มที่ 1	16	19	1.401	1.215	11	13	68.75	68.42
กลุ่มที่ 2	24	21	1.144	1.023	7	6	29.16	28.57
กลุ่มที่ 3	44	48	1.477	1.379	33	34	75.00	70.83

1.2.3 การชักนำแคลลัสจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D และไคเนติน

ในการเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นและใบยาสูบ N. rustica ในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากเลี้ยงในอาหารแล้ว 15 วัน หลังจากนั้นศึกษาในทำนองเดียวกันกับข้อ 1.1.1 ซึ่งได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 14 เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่า ขนาดน้ำหนัก และความสูงของ regenerated plant ของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและใบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ดูภาคผนวกที่ 4)



รูปที่ 7. ก ต้นยาสูบ N. rustica ที่เพาะในอาหารสังเคราะห์สำหรับใช้เป็น explant ในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ข regenerated plant ที่เกิดจากแคลลัสยาสูบ N. rustica

รูปที่ 8. แคลลัสของ N. rustica ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน สามารถจำแนกความแตกต่างได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

callus 1 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่น สีขาวขุ่นออกเขียวเข้ม เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูง

callus 2 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ , ฟู สีขาวออกเหลืองน้ำตาลอ่อน เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ต่ำ

callus 3 เป็นแคลลัสที่มีเซลล์เกาะกันแน่นพอสมควร มีสีขาวใสออกเขียว เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูง

ตารางที่ 14 การเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล.และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน (ผลเฉลี่ยจากค่าการทดลอง 6 ซ้ำ)

ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)	ขนาดของแคลลัส เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.) ส่วนของ explant		น้ำหนักแคลลัส (กรัม) ส่วนของ explant		ความสูงของ (ซม.) regenerated plant ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
30	0.8	0.7	0.327	0.315	1.4	1.2
50	1.2	1.4	0.695	0.779	2.0	1.83
70	1.58	1.8	0.877	0.919	2.3	2.1
90	1.7	1.9	1.111	1.191	2.7	2.5

1.2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส N. rustica ในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D และไคเนติน

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (รูปที่ 9)

กลุ่มที่ 1 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์แบบหลวมชุ่มน้ำ และร่วน แคลลัสมีสีขาวเหลือง เมื่อแคลลัสมีอายุมากขึ้น มีสีขาวออกน้ำตาล (9 ก)

กลุ่มที่ 2 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่นกว่ากลุ่มที่ 1 แคลลัสมีสีเหลืองออกเขียว เมื่อแคลลัสอายุมากขึ้น มีสีเขียวเพิ่มขึ้น (9 ข.)

จากแคลลัสทั้ง 2 กลุ่ม นำส่วนหนึ่งไปศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดส ไอโซไซม์ และอีกส่วนหนึ่งเลี้ยงต่อไป เพื่อศึกษาความสามารถในการพัฒนาของแคลลัส ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 จากผลแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant และมีน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวกที่ 8) และจะสังเกตเห็นว่าเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารชักนำสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D ค่อนข้างต่ำมากเมื่อเทียบกับแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารชักนำสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA ดังรูปที่ 10 และในตารางที่ 16

ตารางที่ 15 การพัฒนาของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ทั้ง 2 กลุ่มในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เมื่อแคลลัสอายุ 50 วัน (ผลจากการทดลอง 25 ซ้ำ)

แคลลัส	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)		น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสต่อชิ้น (กรัม)		regenerated plant (ต้น)		% regenerated plant	
	ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant	
	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
กลุ่มที่ 1	56	35	0.773	0.918	6	4	10.71	11.43
กลุ่มที่ 2	41	59	0.941	1.030	8	11	19.51	18.64

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัสจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ N. rustica ในอาหารที่เติม IAA กับที่เติม 2,4-D

เปอร์เซนต์ regenerated plant ของแคลลัสในอาหารที่เติม IAA						เปอร์เซนต์ regenerated plant ของแคลลัสในอาหารที่เติม 2,4-D			
แคลลัสกลุ่มที่ 1		แคลลัสกลุ่มที่ 2		แคลลัสกลุ่มที่ 3		แคลลัสกลุ่มที่ 1		แคลลัสกลุ่มที่ 2	
ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant		ส่วนของ explant	
ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ
68.75	68.42	29.16	28.57	75.00	70.83	10.71	11.43	19.51	18.64

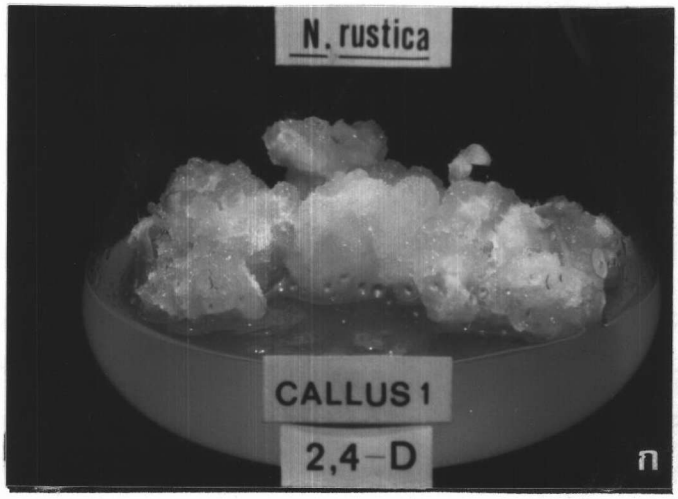
2. ผลการศึกษาไอโซไซม์

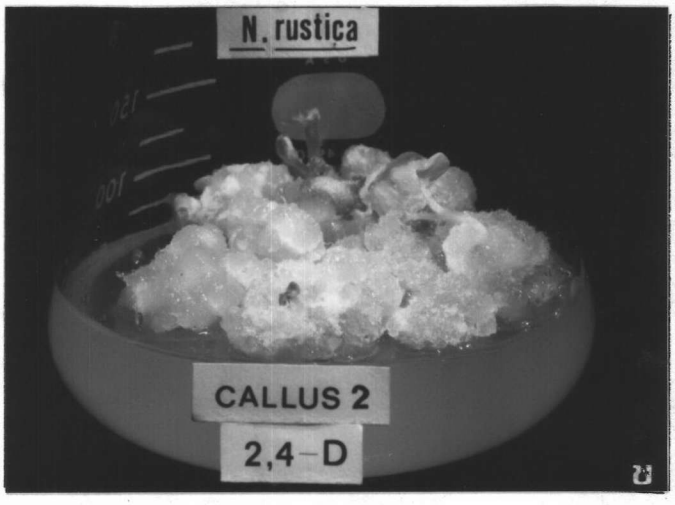
2.1 การแปรของรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ Nicotiana tabacum

2.1.1 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นกับส่วนใบ ที่เลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 30, 50, 70 และ 90 วัน

2.1.1.1 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส

แคลลัสที่ชักนำจากจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน เมื่อนำแคลลัสที่อายุดังกล่าวมาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสในกลุ่มเดียวกันที่ชักนำจากส่วนลำต้นกับส่วนใบ มีรูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ แยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีการเคลื่อนที่ (Rf) อยู่ระหว่าง 0.15-0.23 มีจำนวนแถบ 2 แถบ มีความเข้มของแถบในกลุ่มนี้สูง และ

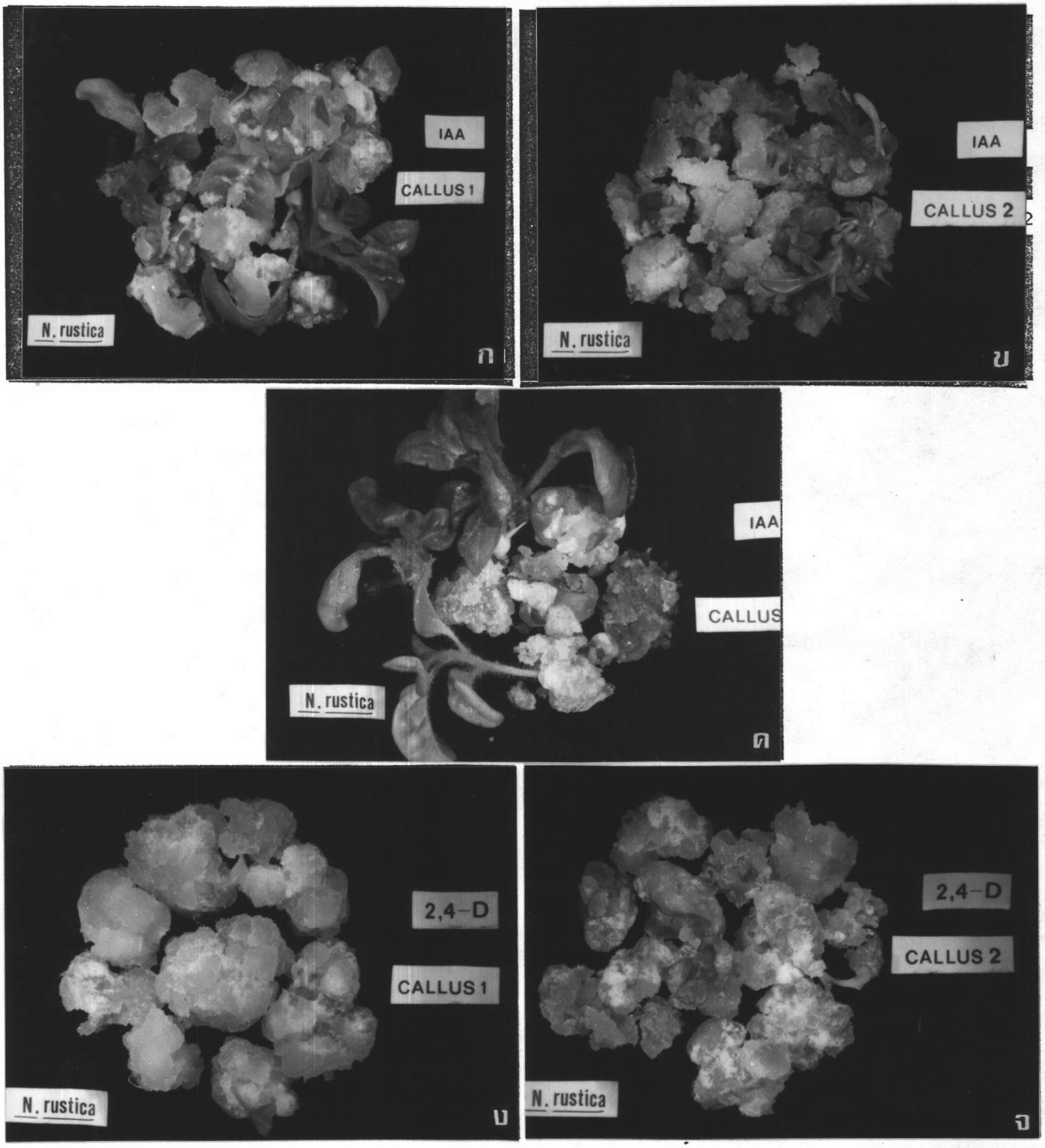




รูปที่ 9. แคลลัสของ N. rustica ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D และไคเนติน สามารถจำแนกความแตกต่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก callus 1 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม ฉ่ำน้ำ ร่วน มีสีขาวเหลือง เมื่อเลี้ยงต่อไป มีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ต่ำ

ข callus 2 เป็นแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่นกว่ากลุ่มที่ 1 มีสีเหลืองออกเขียว เมื่อเลี้ยงต่อไปมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่า callus 1 เล็กน้อย



รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเกิด regenerated plant ของแคลลัส N. rustica

ก ข และ ค แคลลัสกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ แคลลัสนำมาจากอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA จะเห็นว่า แคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 3 มี regenerated plant เกิดขึ้นมาก

ง และ จ แคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แคลลัสนำมาจากอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D จะเห็นว่า มี regenerated plant เกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแคลลัสที่นำมาในอาหารที่เติม IAA ในข้อ ก, ข และ ค

กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีการเคลื่อนที่ (ค่า Rf) อยู่ระหว่าง 0.44-0.64 มีจำนวนแถบ 7 แถบ ดังแสดงในแผนภาพที่ 4 จากแผนภาพ พบว่าแคลลัสแต่ละกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่แตกต่างกันมากนัก พบมีค่า Rf อยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุกซ้ำ แต่ในบางซ้ำของแคลลัสชักนำจากส่วนลำต้นที่เลี้ยงในอาหารนาน 90 วัน พบแถบที่ Rf 0.20 เพิ่มขึ้นมา อีกทั้งบางซ้ำของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารนาน 70 และ 90 วัน พบแถบในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วที่ Rf 0.66 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ

2.1.1.2 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ regenerated plant

เมื่อนำ regenerated plant ของแคลลัสในข้อ 2.1.1.1 มาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่า รูปแบบไอโซไซม์ของ regenerated plant ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นกับส่วนใบมีรูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์แยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.15-0.23 มีจำนวนแถบ 3 แถบ ความเข้มค่อนข้างต่ำมาก และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.44-0.66 มีจำนวนแถบ 8 แถบ และมีความเข้มค่อนข้างสูง ดังแสดงในแผนภาพที่ 4 จากแผนภาพนี้พบว่า regenerated plant ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่แตกต่างกันนัก โดยมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ในตำแหน่งเดียวกัน จะสังเกตเห็นว่า แถบสีที่ Rf 0.66 (ศรชี้ในแผนภาพที่ 4) มีความเข้มต่ำในระยะแรก และความเข้มจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เมื่อ regenerated plant ของแคลลัสถูกเลี้ยงในอาหารเป็นเวลานานขึ้น

2.1.1.3 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ subcultured ของแคลลัส

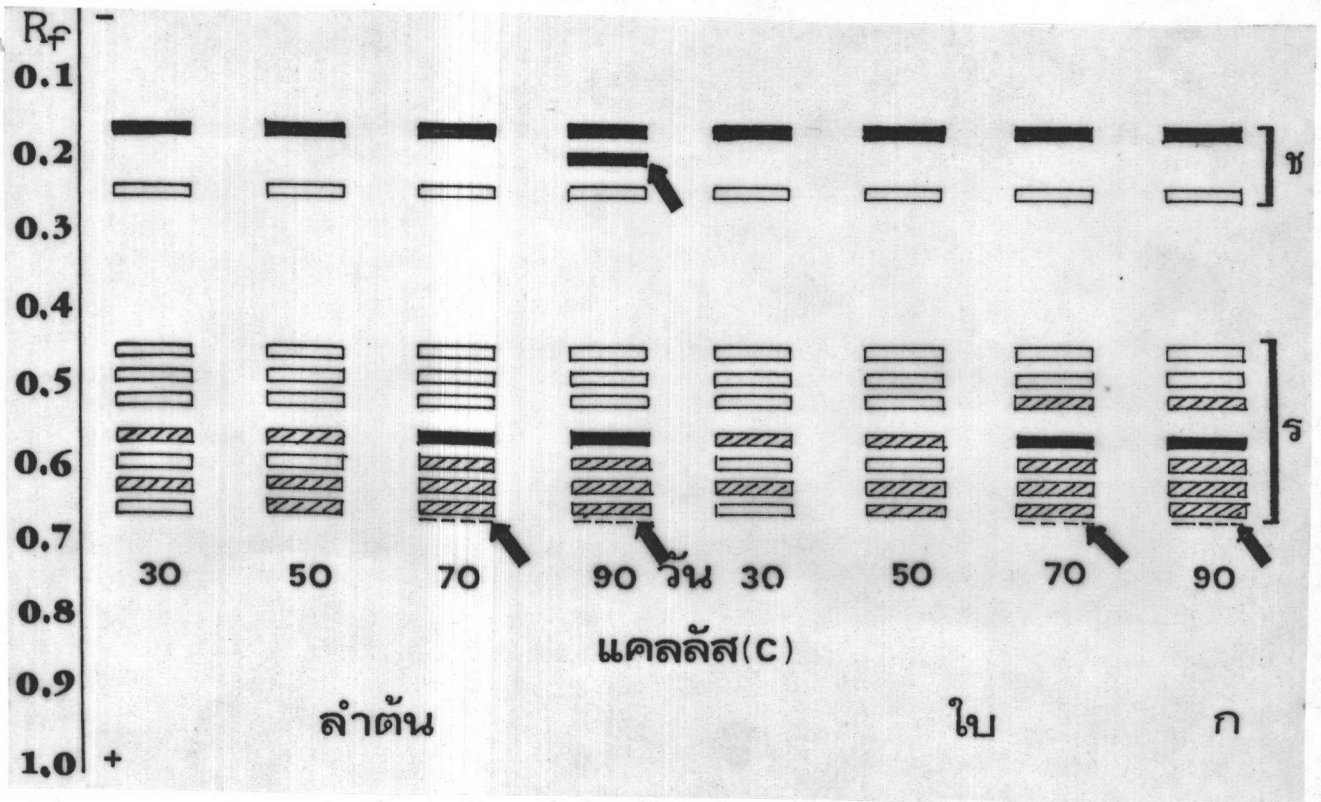
subcultured ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบที่เลี้ยงในอาหารเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างและความคงที่ของรูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการ subcultured ในข้อ 2.1.1.1 กับแคลลัสที่ผ่านการ subcultured ก่อนย้ายลงอาหาร

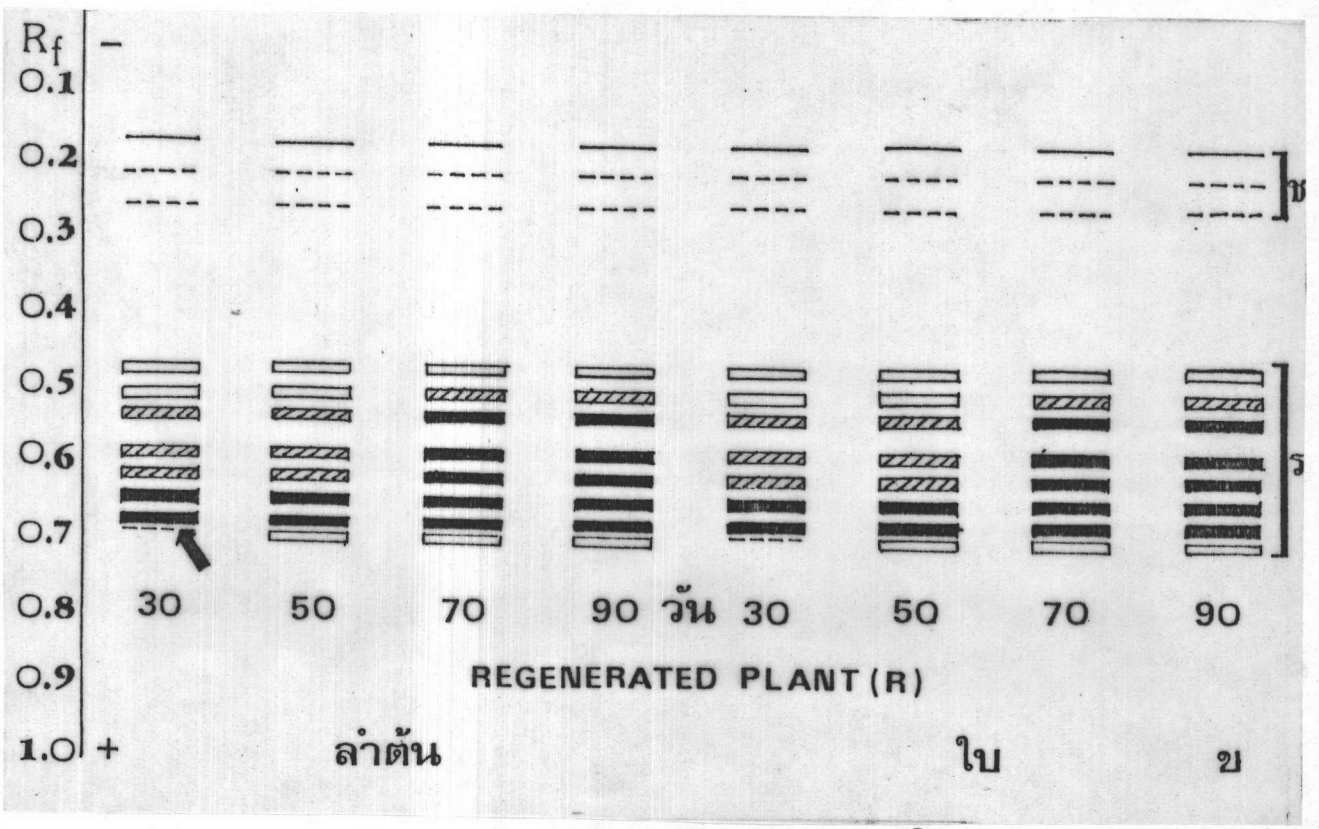
ใหม่เมื่อนำ subcultured ของแคลลัสที่อายุดังกล่าวมาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่า subcultured ของแคลลัสในกลุ่มเดียวกันที่ชักนำจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบให้รูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์แยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.15-0.23 มีจำนวน 2 แถบ ความเข้มของแถบค่อนข้างสูงมาก และกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.44-0.64 มีจำนวน 7 แถบ ดังแสดงในแผนภาพที่ 4 จากแผนภาพแสดงว่า subcultured ของแคลลัสแต่ละกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ในตำแหน่งเดียวกัน แต่ในบางช้ำจาก subcultured ของแคลลัสที่เลี้ยงนาน 90 วัน พบมีแถบที่ Rf 0.66 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ (ศรชี้ในแผนภาพที่ 4)

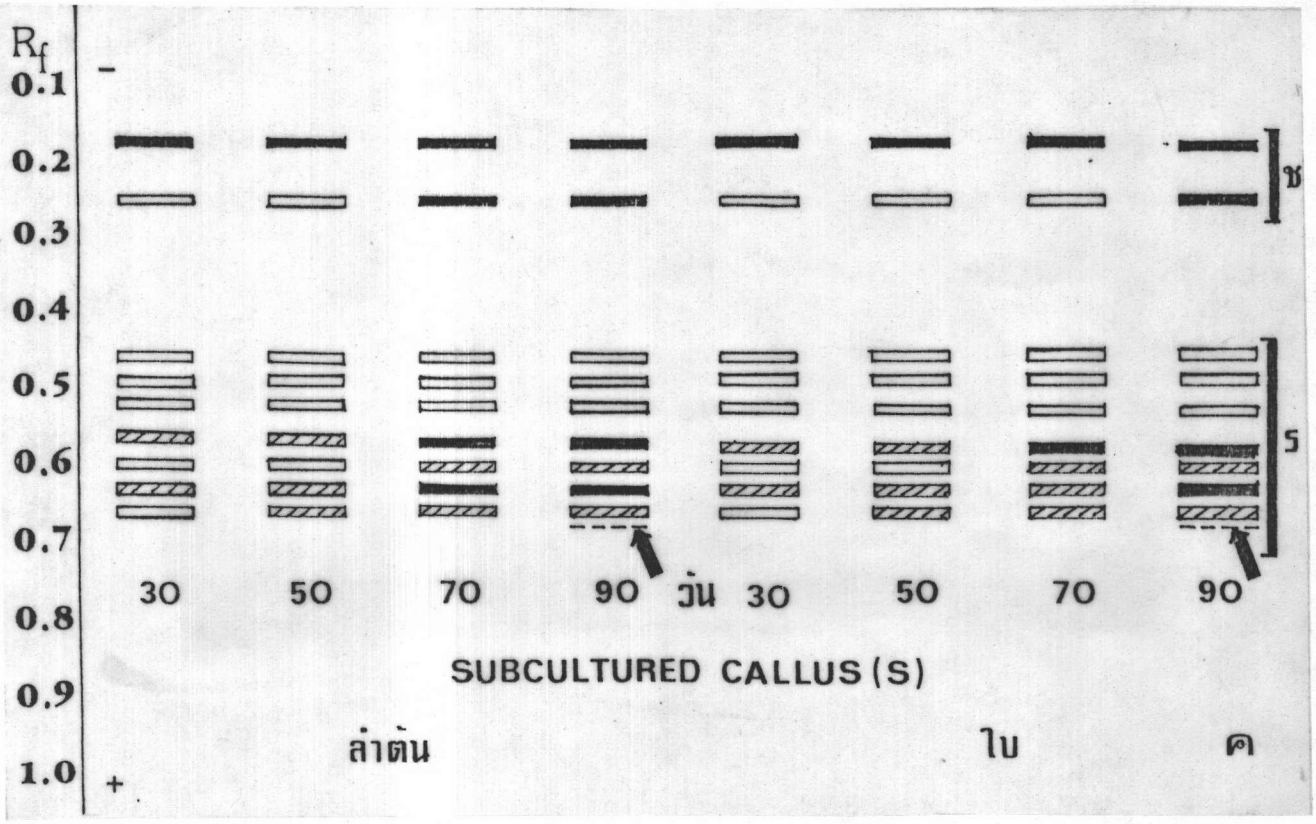
เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส, regenerated plant และ subcultured ของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและใบของ N. tabacum พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัส และ subcultured ของแคลลัสมีความคล้ายคลึงกัน โดยแบ่งไอโซไซม์ได้เป็น 2 กลุ่มเหมือนกัน อีกทั้งมีจำนวนแถบสีและความเข้มใกล้เคียงกัน แต่รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสและ subcultured ของแคลลัส มีความแตกต่างกับ regenerated plant ทั้งในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าและกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว โดยที่ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้านั้น regenerated plant จะให้แถบสีในกลุ่มนี้ 3 แถบ (โดยพบแถบสีที่ Rf 0.20 เพิ่มขึ้นมา) แต่มีความเข้มต่ำ ขณะที่ไอโซไซม์จากแคลลัสและ subcultured ของแคลลัส จะให้แถบสี 2 แถบ และมีความเข้มสูง ส่วนในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ก็มีความแตกต่างกันทั้งความเข้มและจำนวนแถบ โดยที่ไอโซไซม์จาก regenerated plant จะให้ความเข้มสูงกว่า และมีจำนวนแถบที่ Rf 0.66 เพิ่มขึ้นมาสังเกตความแตกต่างจากแผนภาพที่ 5 ในบางช้ำของแคลลัสและ subcultured ของแคลลัส จะพบแถบสีที่ Rf 0.20 และ Rf 0.66 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ คล้ายกับที่พบใน regenerated plant ด้วย ซึ่งแคลลัสและ subcultured ของแคลลัสที่มีแถบสีเพิ่มขึ้นมานี้ ต่อมาก็มีการพัฒนาให้ต้นในเวลาอันรวดเร็ว

เมื่อนำอาหารสูตรชักนำแคลลัสของยาสูบ N. tabacum ที่เลี้ยงเป็นเวลา 30, 50, 70 และ 90 วัน มาตรวจ ก็พบว่าสามารถตรวจพบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในอาหารที่

ใช้เลี้ยงแคลลัสได้ ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์ส่วนใหญ่คล้ายคลึงกับที่ตรวจพบในแคลลัส แต่ความเข้มจะต่างกันมาก โดยที่ไอโซไซม์ในอาหารมีความเข้มของแถบต่ำกว่าไอโซไซม์ในแคลลัสมาก และยังพบแถบสีที่ Rf 0.20 เพิ่มขึ้นมาในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสอายุ 70 และ 90 วัน นอกจากนั้นแถบสีที่ Rf 0.44 ที่พบในแคลลัสนั้น ตรวจไม่พบในอาหาร หรืออาจเป็นเพราะแถบสีมีความเข้มต่ำมากจนตรวจสอบไม่ได้ แต่จะเห็นว่าความเข้มของแถบสีในอาหารจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสที่มีอายุมากขึ้น (ดังแสดงในแผนภาพที่ 6)


Rf
-
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
+
ช
ร
30
50
70
90
วัน
30
50
70
90
แคลลัส(C)
ลำต้น
ใบ
ก


Rf
-
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
+
ช
ร
30
50
70
90
วัน
30
50
70
90
REGENERATED PLANT (R)
ลำต้น
ใบ
ข

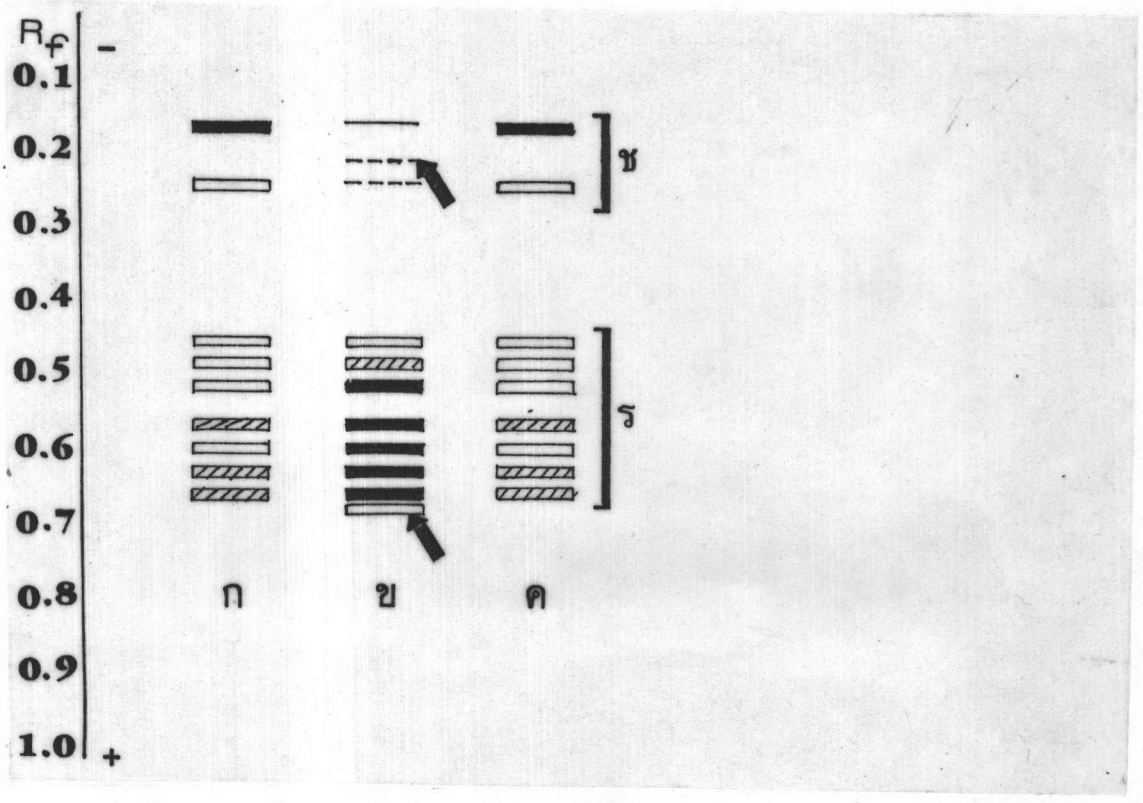


แผนภาพที่ 4 Zymogram ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช) และเร็ว (ร)

ก. รูปแบบไอโซไซม์ของ C สังเกตแคลลัสจากส่วนลำต้นที่อายุ 90 วัน มีแถบที่ Rf 0.20 เพิ่มขึ้นมาก และแคลลัสจากส่วนลำต้นและใบที่อายุ 70 และ 90 วัน มีแถบที่ Rf 0.66 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ (ลูกศรชี้) แคลลัสที่มีแถบสีเพิ่มขึ้นมานี้ต่อมาเกิดพัฒนาเป็นต้นในเวลาอันรวดเร็ว

ข. รูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จาก R

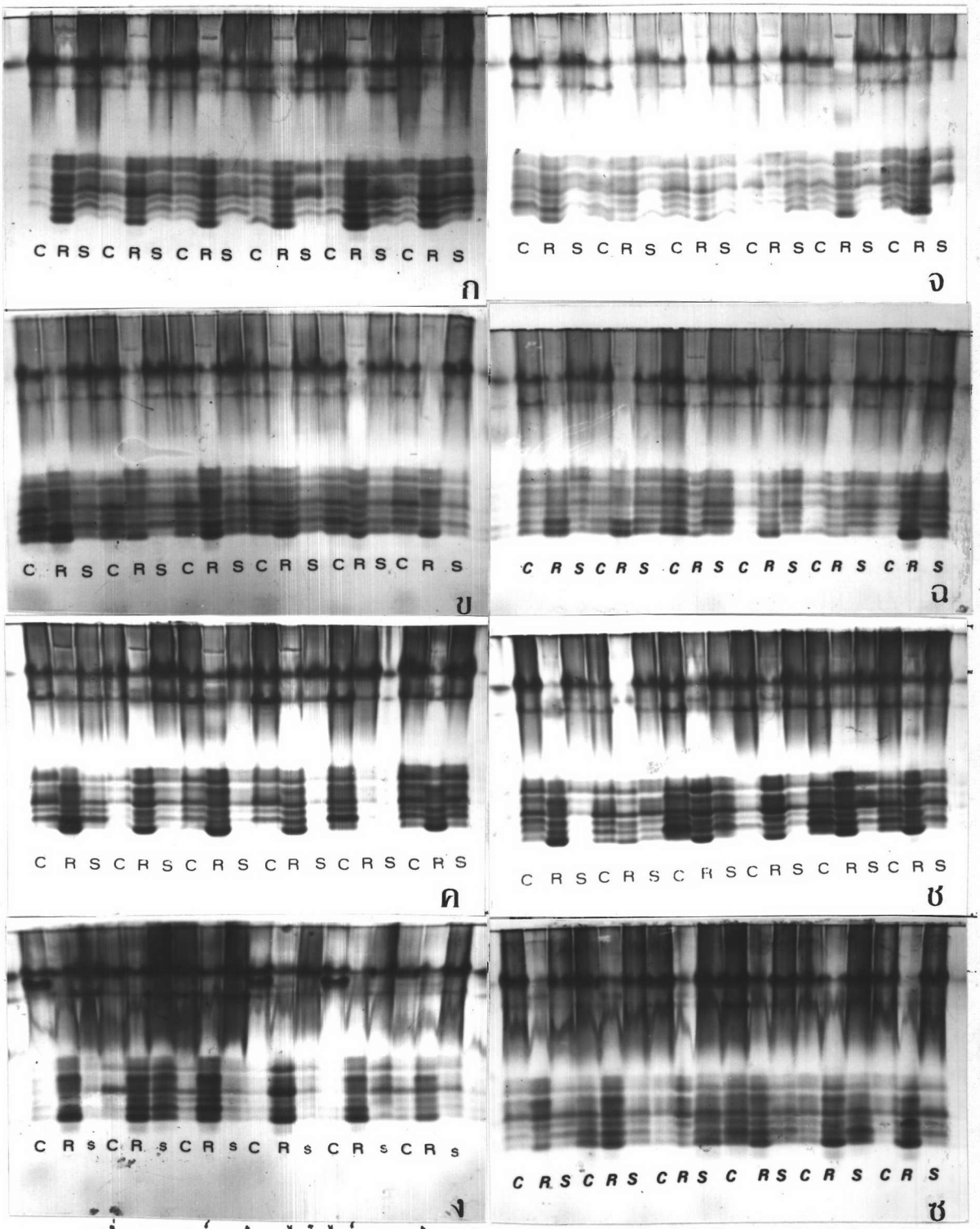
ค. รูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จาก S สังเกต subcultured ของแคลลัสจากส่วนลำต้นและใบที่อายุ 90 วันมีแถบที่ Rf = 0.66 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ (ลูกศรชี้) แคลลัสที่มีแถบเพิ่มขึ้นมานี้ต่อมาเกิดพัฒนาเป็นต้นในเวลาอันรวดเร็ว



แผนภาพที่ 5 Zymogram เปรียบเทียบรูปแบบเซอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัส N. tabacum รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตาม Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช) และเร็ว (ร)

ก. และ ค. รูปแบบไอโซไซม์ของ C และ S ตามลำดับ ไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีความเข้มสูง มีจำนวน 2 แถบ

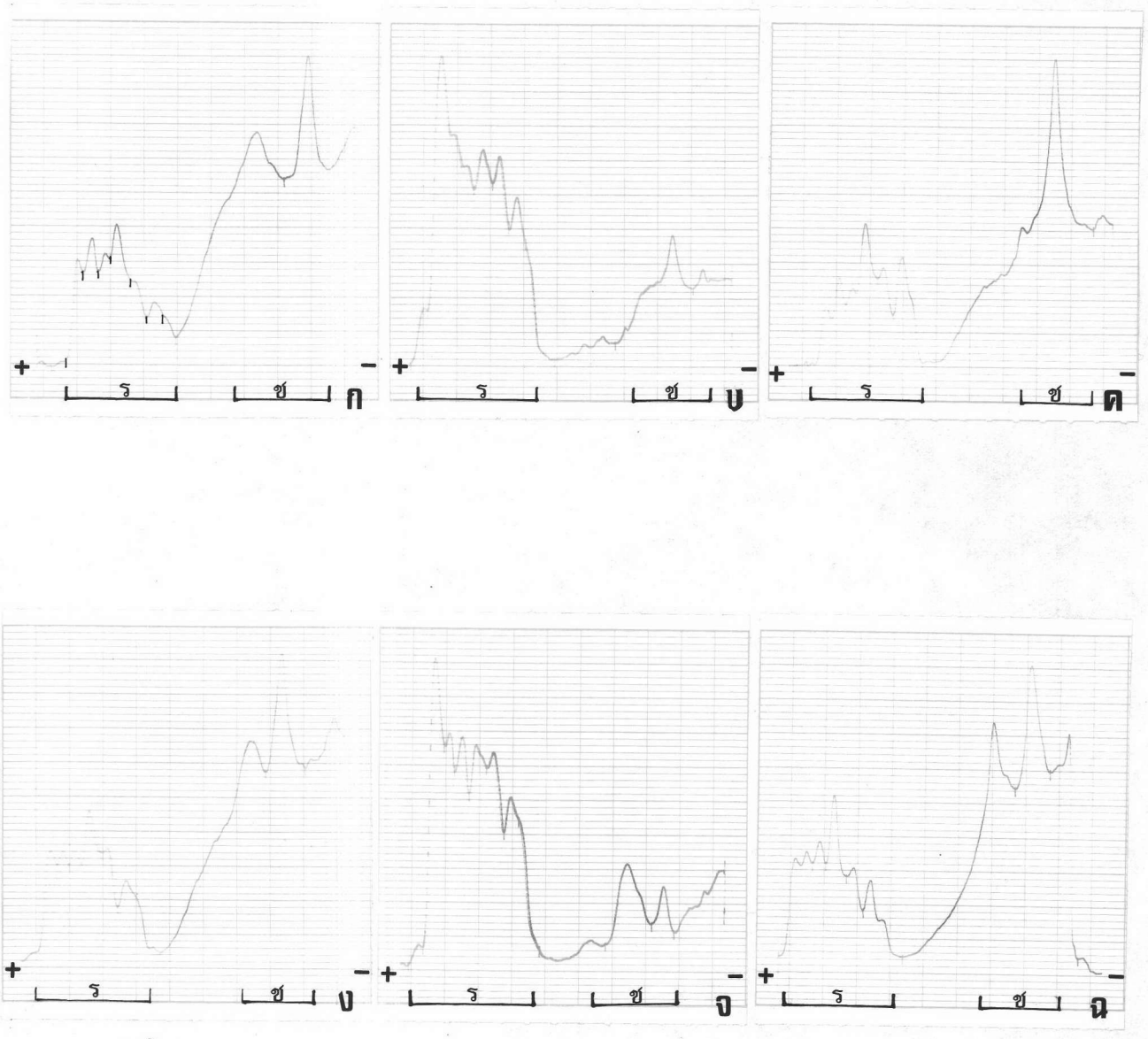
ข. รูปแบบไอโซไซม์ของ R ไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีความเข้มต่ำ มีจำนวน 3 แถบ โดยมีแถบที่ Rf 0.20 เพิ่มขึ้นมา (ลูกศรชี้) และไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มสูง และมีแถบที่ Rf 0.66 เพิ่มขึ้นมา (ดังลูกศรชี้)



รูปที่ 11 เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของ N. tabacum ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล.

ก-ง รูปแบบไอโซไซม์ของ C,R และ S ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นเนื่องเลี้ยงในอาหารนาน 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ

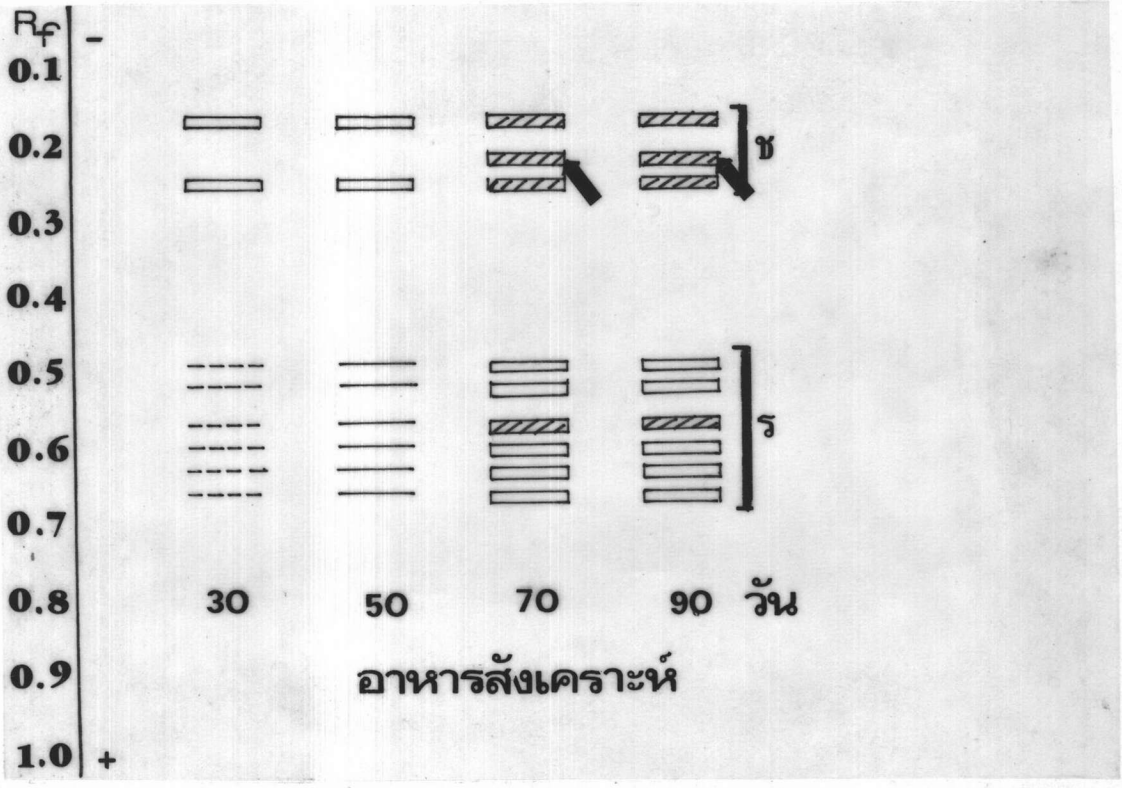
จ-ซ รูปแบบไอโซไซม์ของ C, R และ S ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเนื่องเลี้ยงในอาหารนาน 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ



กราฟที่ 1 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและใบ N. tabacum รูปแบบไอโซไซม์สามารถแยกความแตกต่างในระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช) และเคลื่อนที่เร็ว (ร)

ก-ค ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์ของ C,R และ S ที่ชักนำจากส่วนลำต้น

ง-ฉ ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์ของ C, R และ S ที่ชักนำจากส่วนใบ จะสังเกตเห็นความเข้มของไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วของ R มี peak สูงมาก เมื่อเทียบกับ C และ S



แผนภาพที่ 6 Zymogram ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส N. tabacum เมื่อเลี้ยงแคลลัสนาน 30, 50, 70 และ 90 วัน รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช) และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว (ร) สังเกตุเห็นแถบที่ Rf 0.20 เพิ่มขึ้นมาในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสอายุ 70 และ 50 วัน (ลูกศรชี้) และความเข้มของแถบสูงขึ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสนานขึ้น

2.1.2 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส N. tabacum อายุ 10 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. กับรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แทน IAA

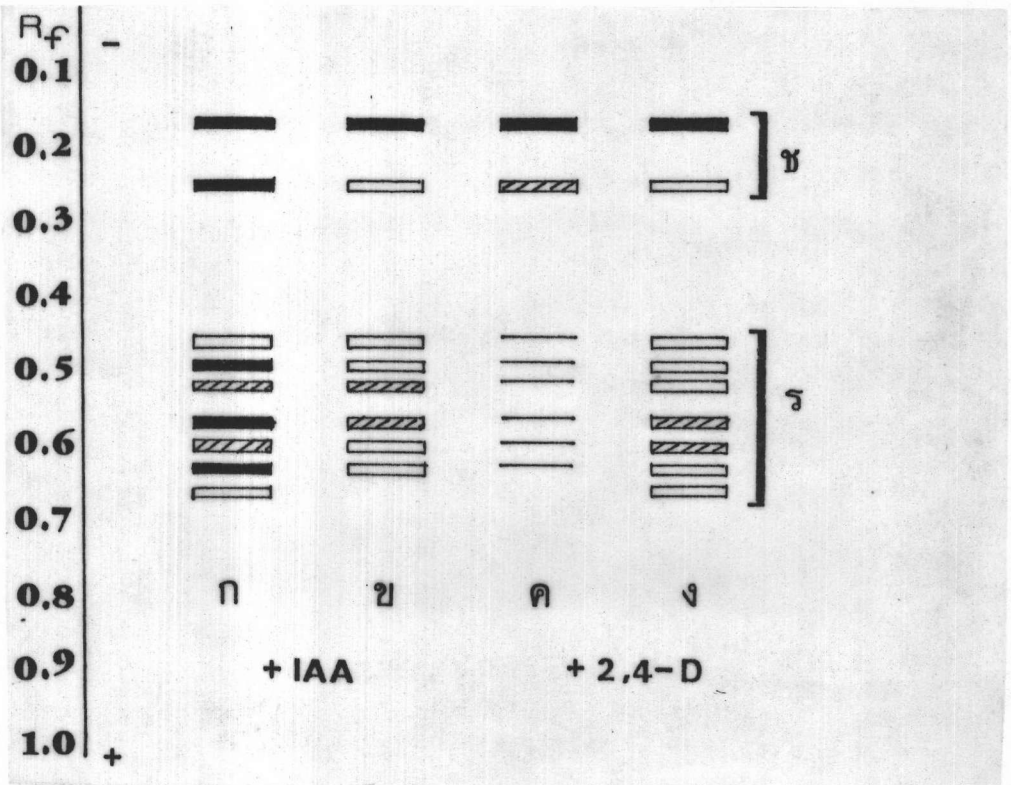
แคลลัสของยาสูบ N. tabacum ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. สามารถจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็น 2 กลุ่มดังกล่าวแล้ว เมื่อนำแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มมาเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่าแคลลัสทั้ง 2 กลุ่ม ให้แถบไอโซไซม์ที่มีการเคลื่อนที่แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.15-0.23 มีจำนวน 2 แถบ และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.44-0.64 มีจำนวนแถบ 6-7 แถบ ดังแสดงในแผนภาพที่ 7 จะเห็นว่าแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มนี้ ให้ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่ช้าไม่แตกต่างกันนัก แต่ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว จะเห็นความแตกต่างกันค่อนข้างชัด โดยที่แคลลัสกลุ่มที่ 1 ให้แถบของไอโซไซม์ที่มีความเข้มสูงกว่ารวมทั้งมีจำนวนแถบมากกว่าคือ 7 แถบ ขณะที่ในแคลลัสกลุ่มที่ 2 มีความเข้มต่ำกว่าและมีจำนวนแถบ 6 แถบ โดยตรวจไม่พบแถบที่ Rf 0.64 และแคลลัสในกลุ่มที่ 1 เมื่อเลี้ยงต่อไปจะมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่าแคลลัสกลุ่มที่ 2 ด้วย ดังนั้นความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์น่าจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant

ส่วนแคลลัสของ N. tabacum ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D แทน IAA สามารถจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็น 2 กลุ่มเช่นกัน เมื่อนำแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มนี้มาเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่าสามารถจัดแบ่งไอโซไซม์ได้เป็น 2 กลุ่ม มีค่า Rf ในตำแหน่งเดียวกับไอโซไซม์ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA ดังแสดงในแผนภาพที่ 7 และพบความแตกต่างในความเข้มและจำนวนแถบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วของแคลลัสทั้ง 2 กลุ่ม โดย

ที่แคลลัสกลุ่มที่ 1 มีความเข้มของแถบไอโซไซม์ต่ำมาก และมีจำนวนแถบน้อยประมาณ 6 แถบ ขณะที่กลุ่มที่ 2 มีความเข้มของแถบสูงกว่าและมีจำนวนแถบมากกว่า

ในอาหารที่เติม IAA กับที่เติม 2,4-D แทน IAA จะให้แคลลัสที่มีความแตกต่างทั้งในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและในรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ เมื่อนำแคลลัสต่าง ๆ เหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ต่อไป พบว่าแคลลัสในกลุ่มที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มสูง และจำนวนแถบมากนั้นเป็นแคลลัสที่มีลักษณะการเกาะกลุ่มแน่นสีค่อนข้างเขียว โดยแคลลัสในกลุ่มนี้จะพัฒนาให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่า (เช่น แคลลัสในกลุ่มที่ 1 ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA และแคลลัสกลุ่มที่2 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D) แคลลัสในกลุ่มที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มต่ำ จำนวนแถบน้อย ซึ่งเป็นแคลลัสมีลักษณะการเกาะกลุ่มหลวมฟู ชุ่มน้ำ แคลลัสออกสีเหลืองน้ำตาล และแคลลัสกลุ่มนี้จะพัฒนาให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ต่ำ (เช่น แคลลัสกลุ่มที่ 2 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA และแคลลัสกลุ่มที่ 1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D)

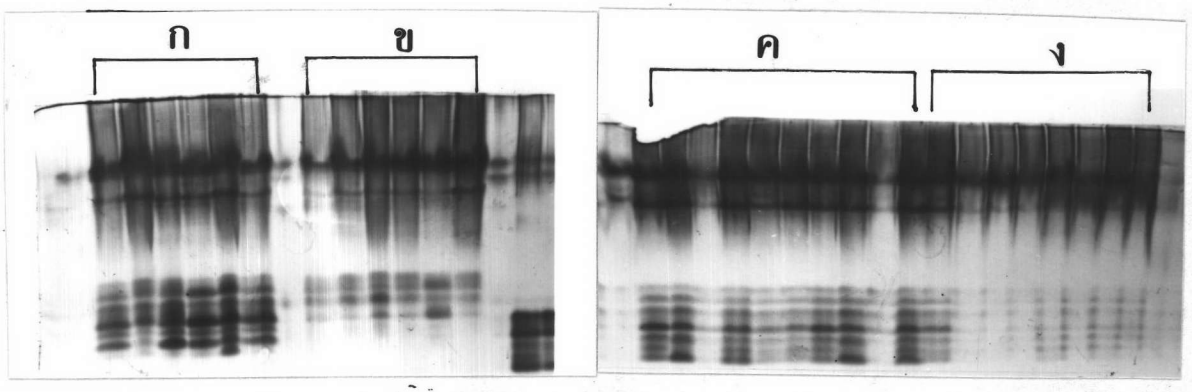
เมื่อเปรียบเทียบแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA กับที่เติม 2,4-D แทน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิด ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีระยะการเคลื่อนที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกัน แต่ความเข้มและจำนวนแถบในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วจะแตกต่างกันโดยที่แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IAA จะมีความเข้มของแถบสูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม 2,4-D นอกจากนี้แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA ยังให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ดังกล่าวแล้วในผลการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ (ตารางที่ 11)



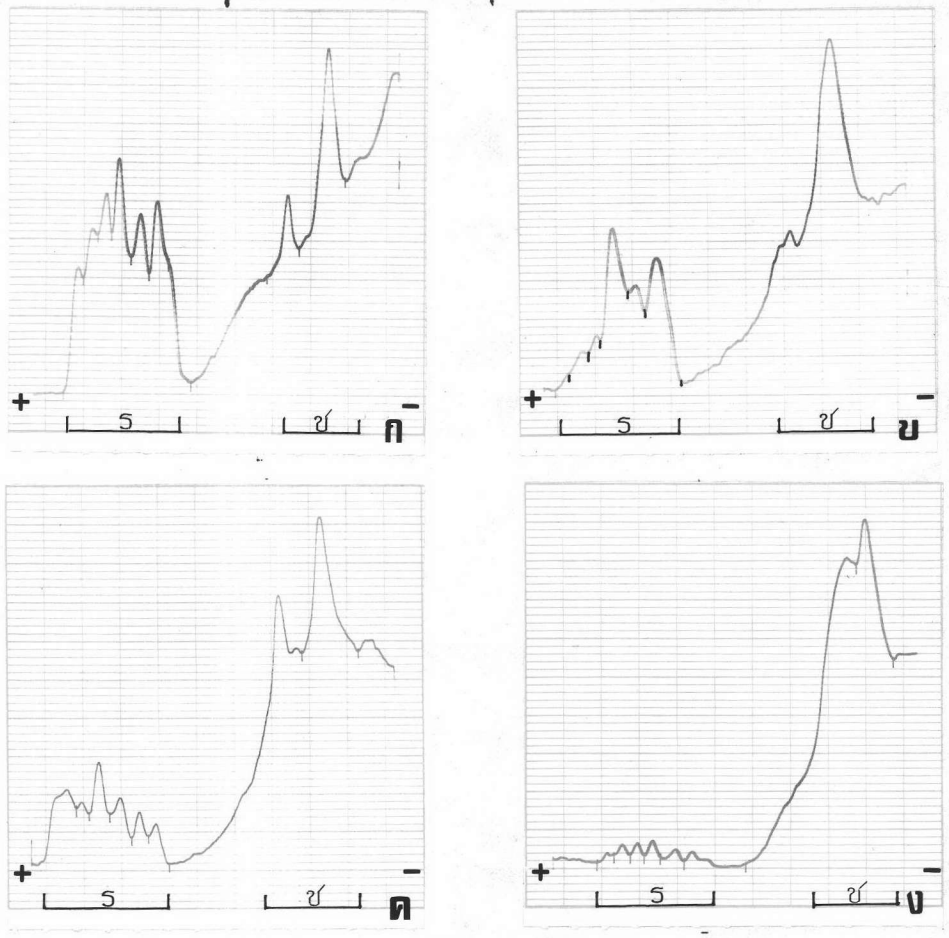
แผนภาพที่ 7 Zymogram เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มต่าง ๆ ของ N. tabacum เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม IAA กับในอาหารที่เติม 2,4-D เมื่อแคลลัสอายุ 10 วัน รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช) และเร็ว (ร)

ก และ ข รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ชักนำในอาหารที่เติม IAA ตามลำดับ

ค และ ง รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ชักนำในอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ตามลำดับ ไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วของแคลลัสที่ชักนำในอาหารที่เติม IAA (โดยเฉพาะกลุ่มที่ 1) จะมีความเข้มสูงกว่าไอโซไซม์ของแคลลัสที่ชักนำในอาหารที่เติม2,4-D



รูปที่ 12 เซอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส N. tabacum
ก และ ข รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่รักษาในอาหารเติม IAA ตามลำดับ
ค และ ง รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 2 และ 1 ที่รักษาในอาหารเติม 2,4-D ตามลำดับ



กราฟที่ 2 ความเข้มและจำนวนแถบของเซอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มต่างๆ ของ N. tabacum ที่รักษาในอาหารที่เติม IAA กับอาหารที่เติม 2,4-D รูปแบบไอโซไซม์สามารถแยกความแตกต่างในระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช) และ เร็ว (ร)
ก-ข ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่รักษาในอาหารที่เติม IAA ตามลำดับ
ค-ง ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มที่ 2 และ 1 ที่รักษาในอาหารที่เติม 2,4-D ตามลำดับ

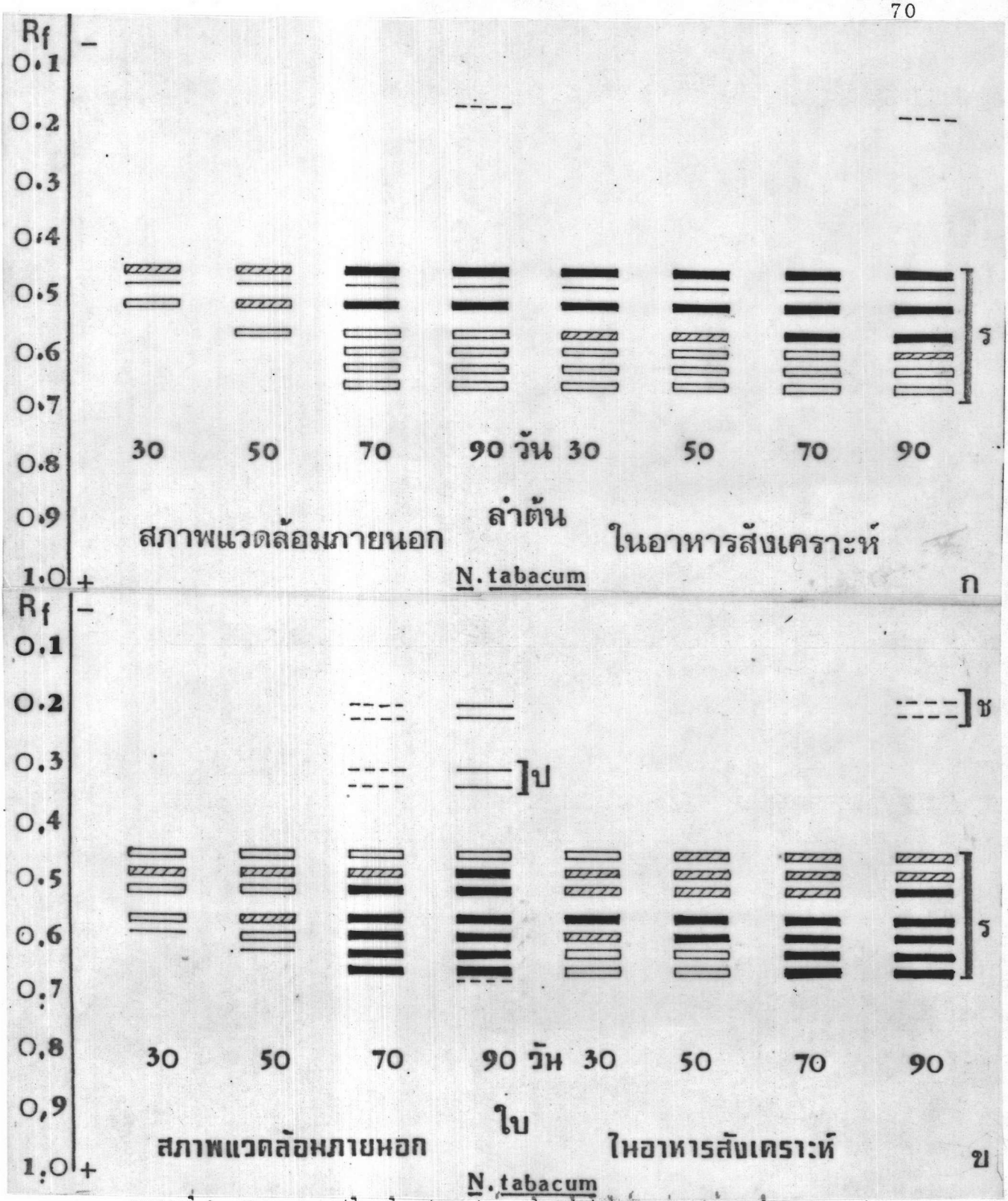
2.1.3 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกกับยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมเมื่อยาสูบมีอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน

2.1.3.1 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นของยาสูบ

นำส่วนลำต้นของยาสูบ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยไม่มีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น แสง, อุณหภูมิหรือความชื้น แต่รดน้ำและให้ปุ๋ยสม่ำเสมอ และที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ MS. (1962) ไม่เติมฮอร์โมน และมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมขณะเลี้ยงให้คงที่คืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณแสง 1200 ลักซ์ โดยมีช่วงมืดต่อช่วงสว่าง 8:16 ชม. จนยาสูบมีอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน มาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนลำต้นของยาสูบจากสภาพแวดล้อมทั้ง 2 นั้น มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.44-0.64 เช่นเดียวกัน และเมื่อยาสูบอายุ 90 วัน พบแถบที่ Rf 0.15 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ ลำต้นของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่ออายุน้อย (30, 50 วัน) มีจำนวนแถบไม่คงที่และความเข้มต่ำไม่ค่อยชัดเจน เมื่อยาสูบมีอายุมากขึ้น (70, 90 วัน) ความเข้มของแถบจะสูงขึ้นรวมทั้งจำนวนแถบจะเริ่มคงที่ขึ้น ขณะที่รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์จะให้จำนวนไอโซไซม์ที่คงที่ตั้งแต่ยาสูบอายุน้อย และคงที่ต่อไปจนยาสูบมีอายุเพิ่มมากขึ้น ดังแผนภาพที่ 8

2.1.3.2 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนใบของยาสูบ

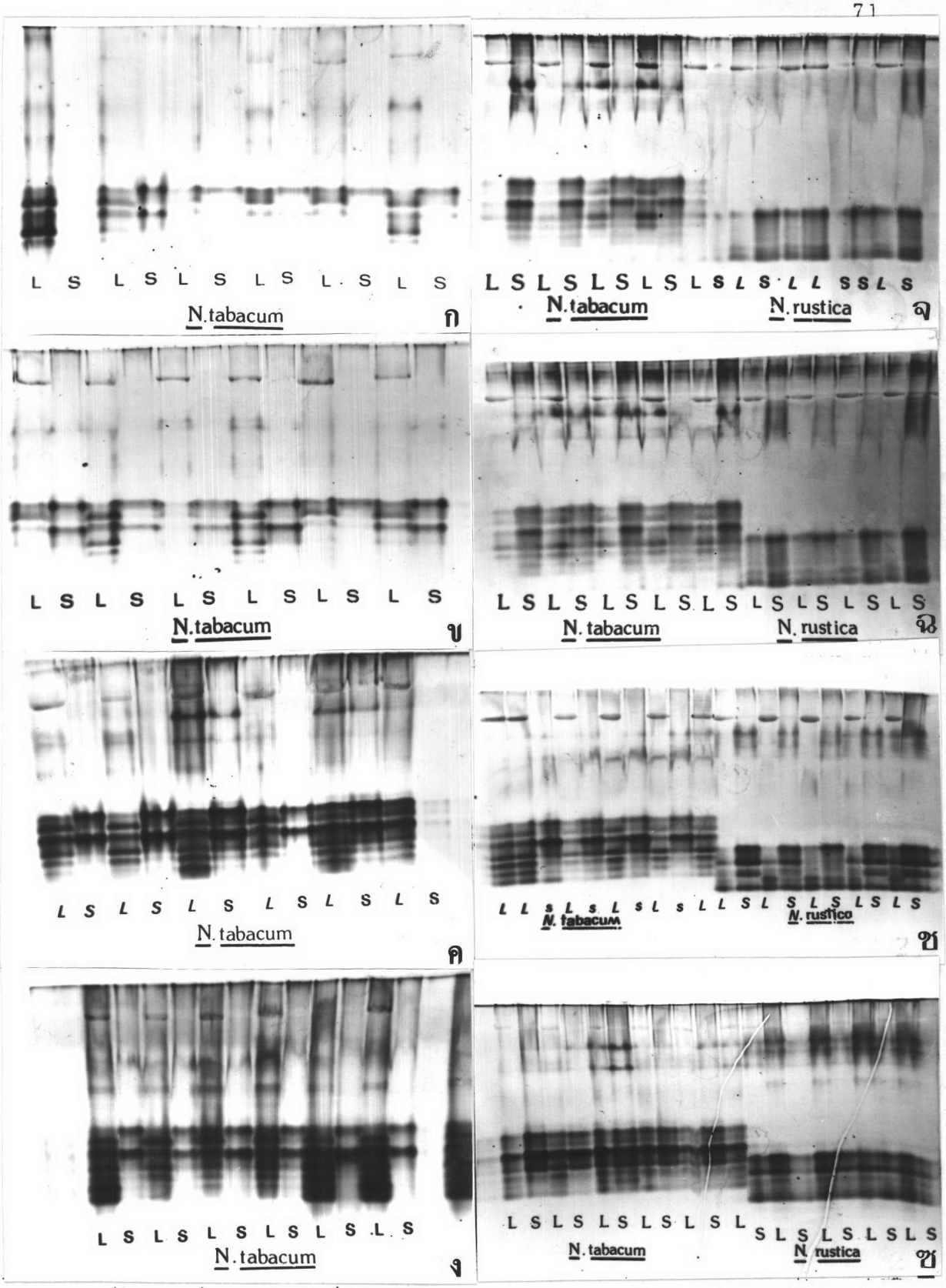
นำส่วนใบของยาสูบ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมทั้ง 2 ดังกล่าวในข้อ 2.1.3.1 มาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์เมื่อยาสูบอายุได้ 30, 50, 70 และ 90 วัน พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนใบของ



แผนภาพที่ 8 Zymogram เปรียบเทียบรูปแบบเปอรออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบของ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก และพี่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อมเมื่ออายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน

ก. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนลำต้น แบ่งได้เป็น 1 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว (ร) เมื่ออายุ 90 วันพบแถบที่ Rf 0.15 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ

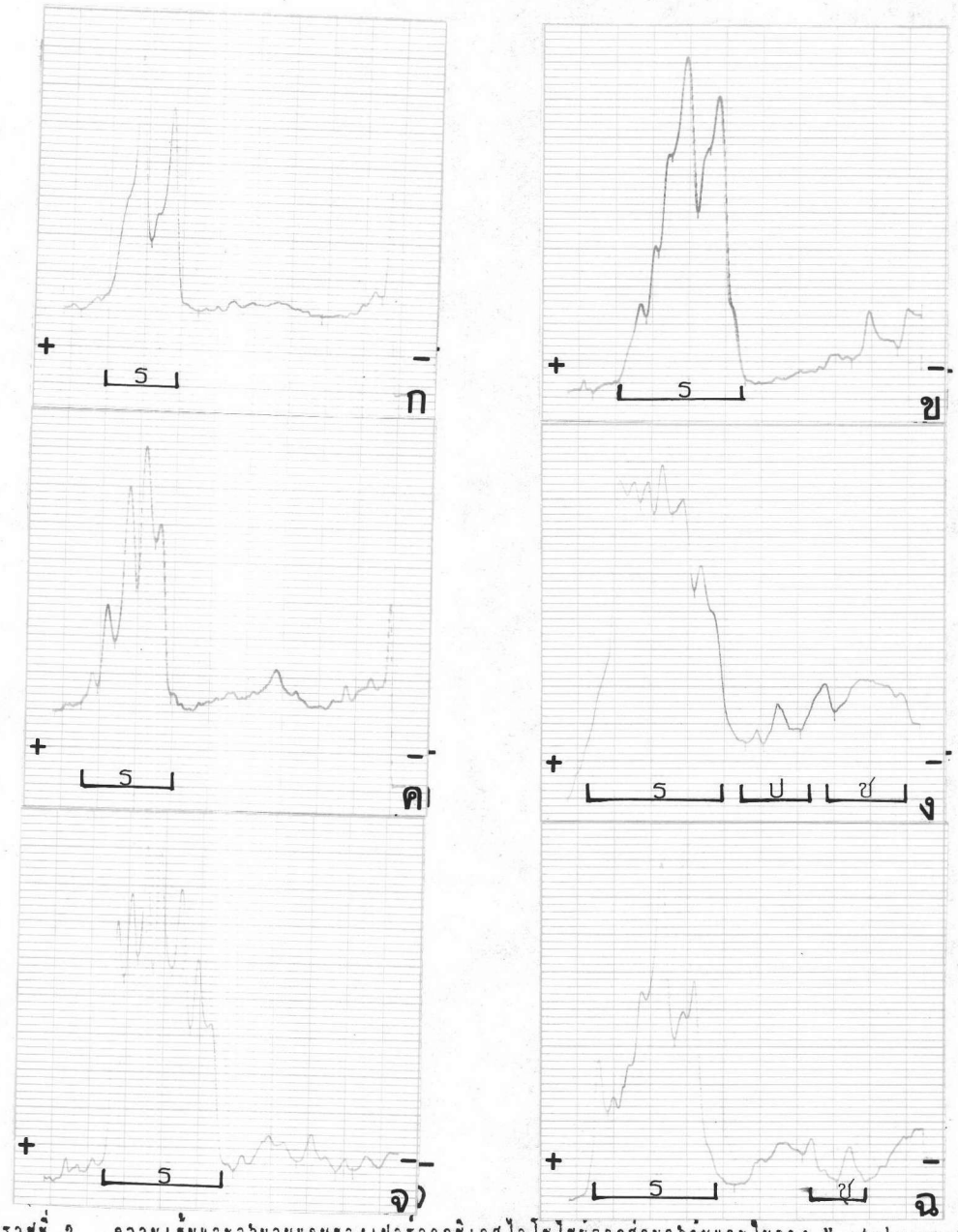
ข. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามค่า Rf คือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และเร็ว (ร.)



รูปที่ 13 เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ N. tabacum

ก-ง รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบ (L) และลำต้น (S) ของยาสูบที่ปลูกในสภาพนาควบคุมภายนอกเมื่อยาสูบอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ

จ-ซ รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบ (L) และลำต้น (S) ของยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ เมื่อยาสูบอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ



กราฟที่ 3 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบของ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกพื้อายุ 30 และ 90 วัน กับยาสูบพี่เพาะในอาหารสังเคราะห์อายุ 90 วัน

ก และ ข ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบอายุ 30 และ 90 วัน ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะทางการเคลื่อนที่ได้เป็นกลุ่มเดียว คือ กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว (ร.)

ค และ ง ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนใบของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบ 30 และ 90 วัน ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะทางการเคลื่อนที่ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และเร็ว (ร.)

จ และ ฉ ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์เมื่อยาสูบอายุ 90 วัน (เนื่องจากรูปแบบไอโซไซม์ไม่แตกต่างกันในยาสูบอายุ 30-90 วัน จึงนำเสนอเพียงรูปแบบไอโซไซม์ของยาสูบพี่อายุ 90 วันเท่านั้น)

ยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก สามารถจัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีค่า Rf 0.15-0.20 มีจำนวนแถบ 2 แถบ กลุ่มเคลื่อนที่ปานกลางมีค่า Rf 0.30-0.34 มีจำนวนแถบ 2 แถบ ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มมีความเข้มต่ำมาก และความเข้มจะค่อย ๆเพิ่มขึ้นจากใบของต้นที่มีอายุมาก และกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีค่า Rf 0.44-0.64 มีจำนวนแถบ 5-8 แถบ โดยเมื่อยาสูบมีอายุน้อย ส่วนใบของยาสูบนั้นจะให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่คงที่ มีจำนวนแถบน้อย ความเข้มต่ำ เมื่อยาสูบมีอายุมากขึ้น จำนวนแถบและความเข้มจะสูงขึ้นด้วย ส่วนยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อม เมื่อนำส่วนใบมาตรวจสอบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่าในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มและจำนวนแถบสม่ำเสมอตั้งแต่ยาสูบอายุน้อย ๆ แต่จะพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าในความเข้มที่ต่ำมากเมื่อยาสูบมีอายุมาก ดังแสดงในแผนภาพที่ 8

2.1.4 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของลำต้นและใบจากส่วนยอดไปยังส่วนโคนต้นภายในต้นเดียวกันของ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อต้นเจริญเต็มที่

นำต้นยาสูบ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกและมีสภาพสมบูรณ์มาทำการศึกษารูปแบบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ โดยทำการศึกษาเป็นส่วน ๆ ดังนี้ คือ ส่วนลำต้นและส่วนใบ ในส่วนของลำต้นศึกษาจากโคนต้นไปยังปลายยอด ส่วนของใบศึกษาตั้งแต่ใบตรงโคนต้นไปยังใบที่ปลายยอด ผลการศึกษามีดังต่อไปนี้

2.1.4.1 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนลำต้นของยาสูบ

ลำต้นบริเวณส่วนยอดจะเป็นลำต้นอ่อนและค่อย ๆ แข็งขึ้นจนมีเนื้อไม้บริเวณโคนต้น ซึ่งจะให้รูปแบบของไอโซไซม์ดังแผนภาพที่ 9 จากแผนภาพนี้ พบว่ารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนลำต้น มีการเคลื่อนที่แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามค่า Rf คือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf 0.15-0.23 มีจำนวนแถบ 2 แถบ และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf 0.44-0.64 มีจำนวนแถบ 3-7 แถบ จะเห็นว่า จำนวน

แถบและความเข้มของไอโซไซม์จะมากขึ้น เมื่อเนื้อเยื่อมีความแก่หรือพัฒนาเต็มที่แล้ว ดังจะเห็นจากบริเวณยอดจะมีจำนวนแถบน้อยกว่าและมีความเข้มของแถบต่ำ โดยจำนวนแถบจะเพิ่มขึ้นจนคงที่และมีความเข้มของแถบสูงขึ้น เมื่อลำต้นมีการพัฒนาเต็มที่หรือแก่ขึ้น

2.1.4.2 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนใบของยาสูบ

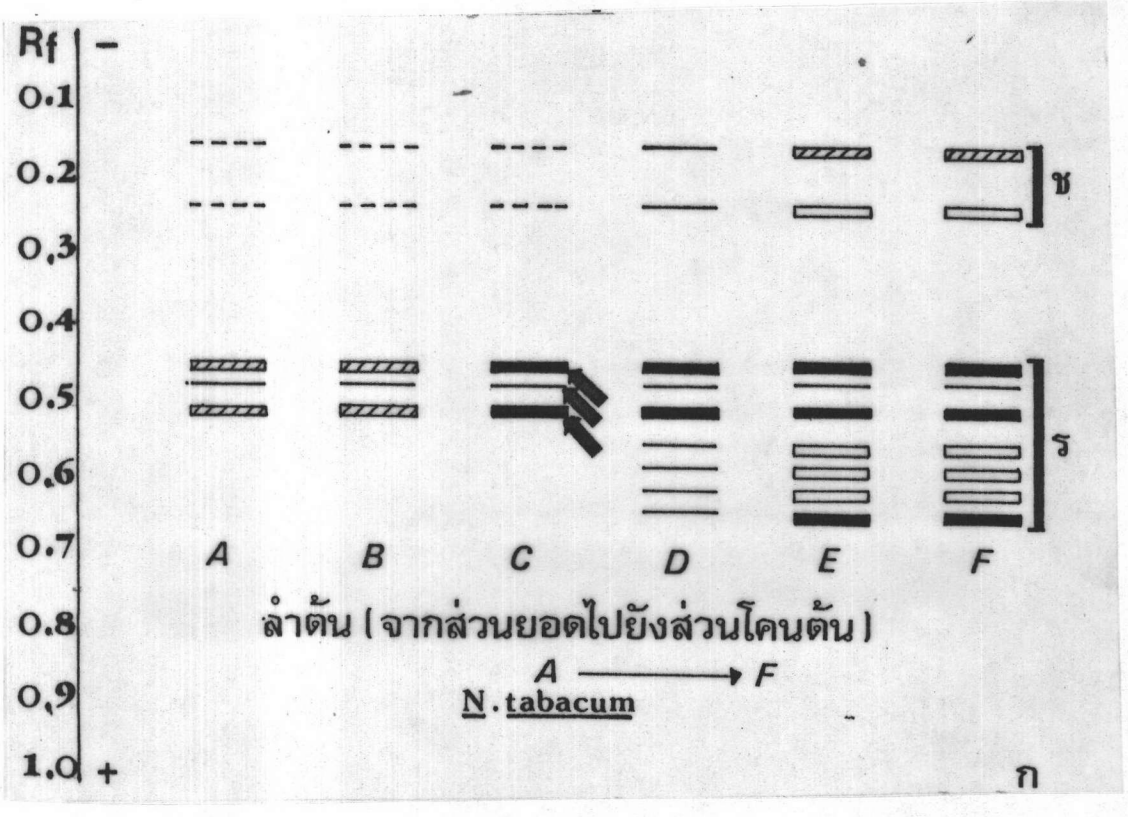
ใบจากบริเวณยอดจะเป็นใบอ่อนและจะค่อยๆ แก่ลง ในบริเวณโคนต้นซึ่งจะให้รูปแบบไอโซไซม์ดังแผนภาพที่ 9 จากแผนภาพนี้พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนใบมีการเคลื่อนที่แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามค่า Rf คือกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีค่า Rf 0.15-0.23 มีจำนวนแถบ 3 แถบ มีความเข้มต่ำ กลุ่มเคลื่อนที่ปานกลาง มีค่า Rf 0.30-0.34 มีจำนวน 2 แถบ และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf 0.44-0.66 มีจำนวนแถบ 3-8 แถบ จะเห็นว่าในใบบริเวณยอดซึ่งเป็นใบอ่อนมีจำนวนแถบของไอโซไซม์น้อยกว่าและจางกว่าแถบในใบแก่ และรูปแบบไอโซไซม์จะค่อนข้างคงที่ในใบที่ค่อนข้างแก่หรือมีการพัฒนาเต็มที่แล้ว

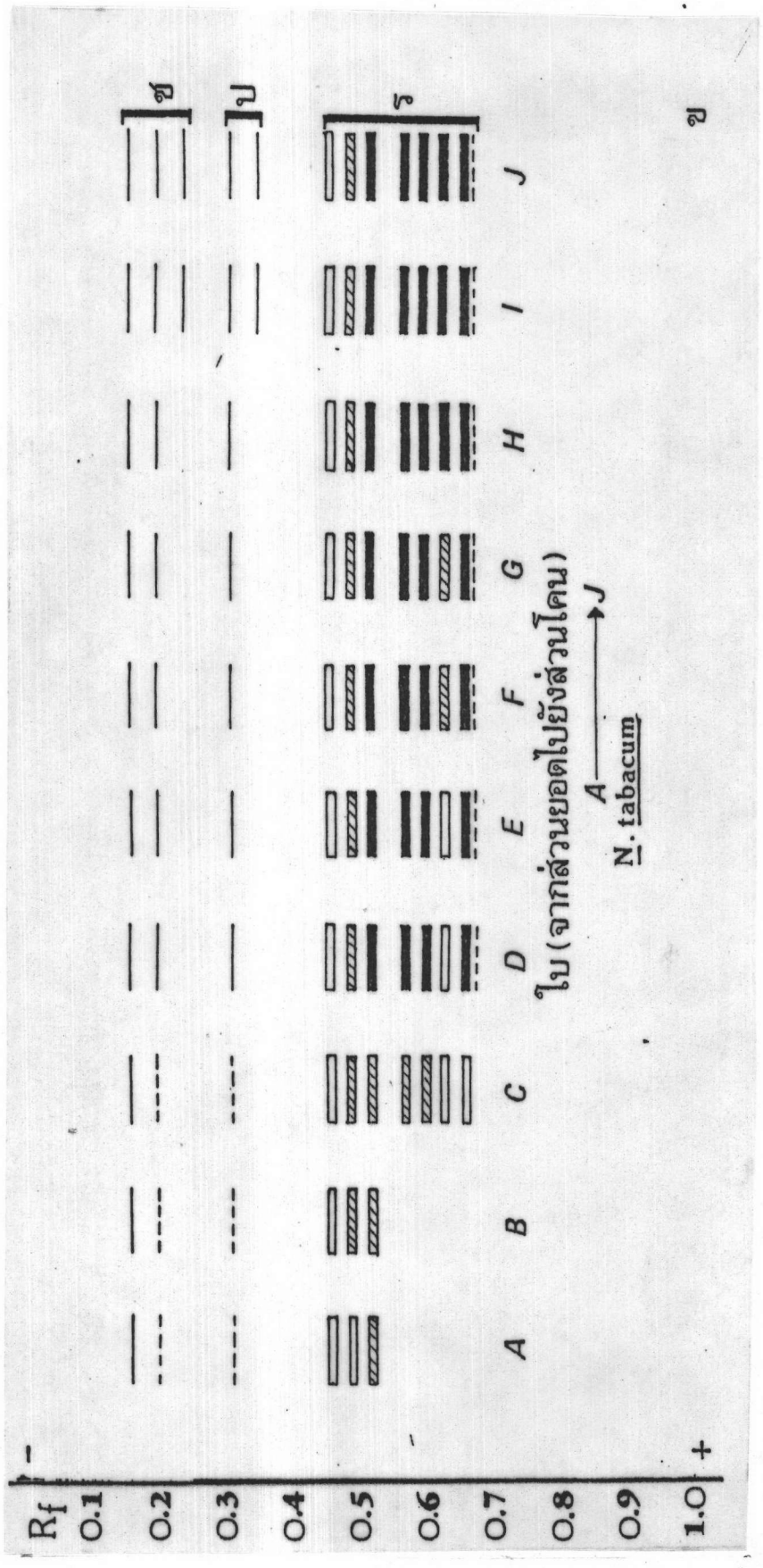
รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ มีความจำเพาะในส่วนลำต้นและส่วนใบ โดยแถบที่ Rf 0.44, 0.47 และ 0.50 (ลูกศรชี้ในแผนภาพที่ 9) เป็นแถบที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไอโซไซม์ส่วนลำต้นและในส่วนใบ ส่วนลำต้นจะมีความเข้มของแถบที่ Rf 0.44 และ 0.50 สูงเด่นกว่าแถบอื่น และแถบที่ Rf 0.47 มีความเข้มต่ำ ขณะที่ส่วนใบความเข้มของแถบทั้ง 3 นั้นใกล้เคียงกัน และพบไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ปานกลางด้วย ซึ่งตรวจไม่พบในส่วนลำต้น และจะสังเกตเห็นว่าแถบของไอโซไซม์บางแถบปรากฏในทั้งลำต้นและใบ เช่น แถบที่ Rf 0.15, 0.23, 0.44, 0.47, 0.50, 0.58, 0.61 และ 0.64 ดังแสดงในแผนภาพที่ 9 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่บริเวณดังกล่าวควบคุมกิจกรรมเดียวกันทั้งในส่วนลำต้นและใบ ส่วนแถบที่ Rf 0.20, 0.30, 0.34 และ 0.66 พบเฉพาะในส่วนใบ ซึ่งไอโซไซม์ในแถบดังกล่าวอาจเป็นไอโซไซม์ที่มีหน้าที่เฉพาะในอวัยวะแต่ละส่วนก็ได้ จำนวนแถบและความเข้มที่เพิ่มขึ้นทั้งส่วนลำต้นและส่วนใบจากบริเวณยอดไปยังบริเวณโคนต้น แสดงถึงการพัฒนาของรูปแบบไอโซไซม์ตามสภาวะการเจริญของต้นยาสูบ

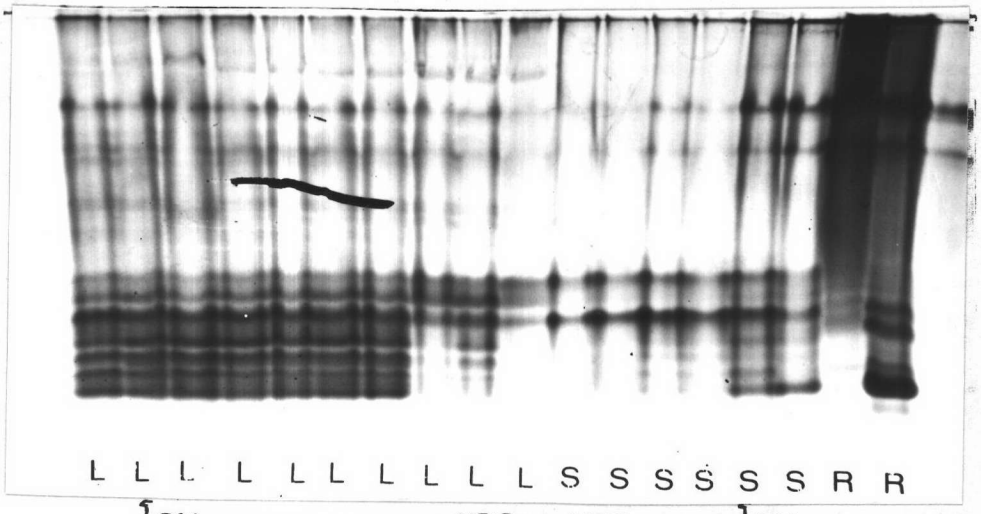
แผนภาพที่ 9 Zymogram ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและส่วนใบบริเวณยอดไปยังโคนต้นยาสูบในต้นเดียวกันของ N. tabacum ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบเจริญเต็มที่

ก. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นยาสูบ ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

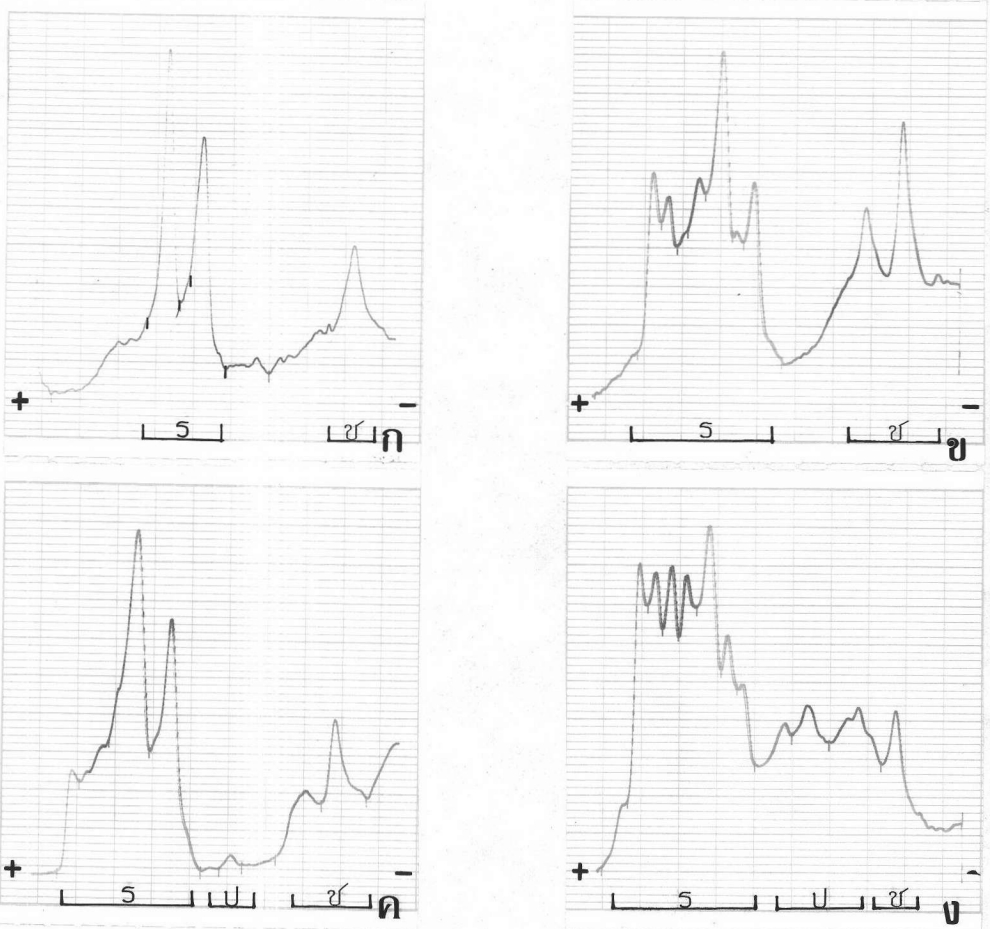
ข. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบยาสูบ ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และเร็ว (ร.) สังเกตแถบที่ Rf 0.44, 0.47 และ 0.50 (ศรี) ซึ่งเป็นแถบที่แสดงความแตกต่างของไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบ โดยที่ในส่วนลำต้นแถบที่ Rf 0.44 และ 0.50 มีความเข้มสูงเด่นแต่แถบที่ Rf 0.47 มีความเข้มต่ำ แต่ส่วนใบมีความเข้มของแถบทั้ง 3 ไม่แตกต่างกันนักและยังพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ปานกลางด้วย ซึ่งในส่วนลำต้นไม่พบแถบสีในกลุ่มนี้




Rf
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
-
+
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
ช
ป
ร
ใบ (จากส่วนยอดไปยังส่วนโคน)
A → J
N. tabacum
ช



รูปที่ 14 เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนยอดไปยังส่วนโคนของลำต้น (S) และจากส่วนโคนไปยังส่วนยอดของใบ (L) N. tabacum พันธุ์ลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่ออายุเจริญเต็มที่



กราฟที่ 4 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบส่วนอ่อนและแก่ของ N. tabacum ในต้นเดียวกันที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เมื่ออายุเจริญเต็มที่

ก และ ข ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นอ่อนและแก่ ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

ค และ ง ความเข้มและแถบจำนวนของไอโซไซม์จากส่วนใบอ่อนและใบแก่ ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะทางการเคลื่อนที่ได้ เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และเร็ว (ร.)

2.2 การแปรของรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ใน *Nicotiana rustica*

2.2.1 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นกับส่วนใบ ที่เลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 30, 50, 70 และ 90 วัน

2.2.1.1 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส

แคลลัสที่ชักนำจากจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ *N. rustica* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. เลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน เมื่อนำแคลลัสที่อายุดังกล่าวมาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสในกลุ่มเดียวกันที่ชักนำจากส่วนลำต้นกับส่วนใบ มีรูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ แยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีการเคลื่อนที่ (Rf) อยู่ระหว่าง 0.14-0.19 มีจำนวนแถบ 2 แถบ มีความเข้มสูง และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.55-0.70 มีจำนวนแถบ 6 แถบ ดังแสดงในแผนภาพที่ 10 จากการทดลองนี้ พบว่าแคลลัสของ *N. runtica* แต่ละกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน จะพบการแปรในจำนวนและความเข้มของแถบสีมากกว่าที่พบใน *N. tabacum* โดยเฉพาะไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ในบางซ้ำพบจำนวนแถบสีน้อยหรือมีความเข้มต่ำมาก หรือในบางซ้ำพบแถบสีที่ Rf 0.72 เพิ่มขึ้นมาในแคลลัสที่ชักนำจากใบที่เลี้ยงนาน 90 วัน แต่มีความเข้มต่ำมาก (ลูกศรชี้ในแผนภาพที่ 10)

2.2.1.2 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ regenerated plant

เมื่อนำ regenerated plant ของแคลลัสในข้อ 2.2.1.1 มาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่า รูปแบบไอโซไซม์ของ regenerated plant ของแคลลัสในกลุ่มเดียวกันที่ชักนำจากส่วนลำต้นกับส่วนใบ มีรูปแบบ

ไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของแถบแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.14-0.24 มีจำนวนแถบ 3 แถบ มีความเข้มต่ำ และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.55-0.72 มีจำนวนแถบ 7 แถบ โดยจะสังเกตเห็นแถบจาง ๆ ที่ Rf 0.72 (ลูกศรชี้ในแผนภาพที่ 10) ซึ่งแถบนี้มีความเข้มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยง regenerated plant ในอาหารนานขึ้น ดังแสดงในแผนภาพที่ 10 จากแผนภาพนี้พบว่า regenerated plant ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน จะให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่แตกต่างกันมากนักแต่ก็ยังพบการแปรไปในความเข้มและจำนวนแถบในบางช้ำมากกว่าที่พบใน N. tabacum ซึ่งค่อนข้างมีความคงที่

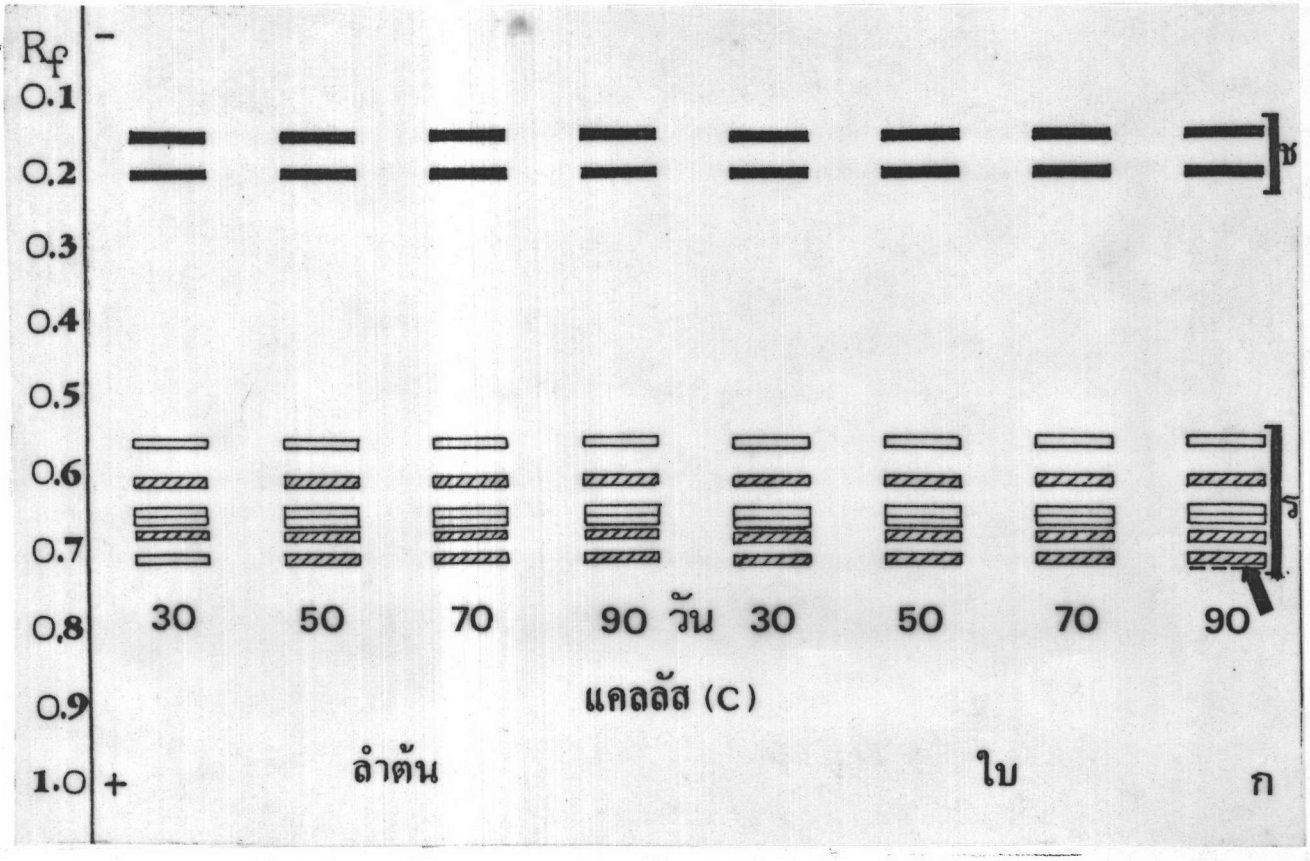
2.2.1.3 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ subcultured ของแคลลัส

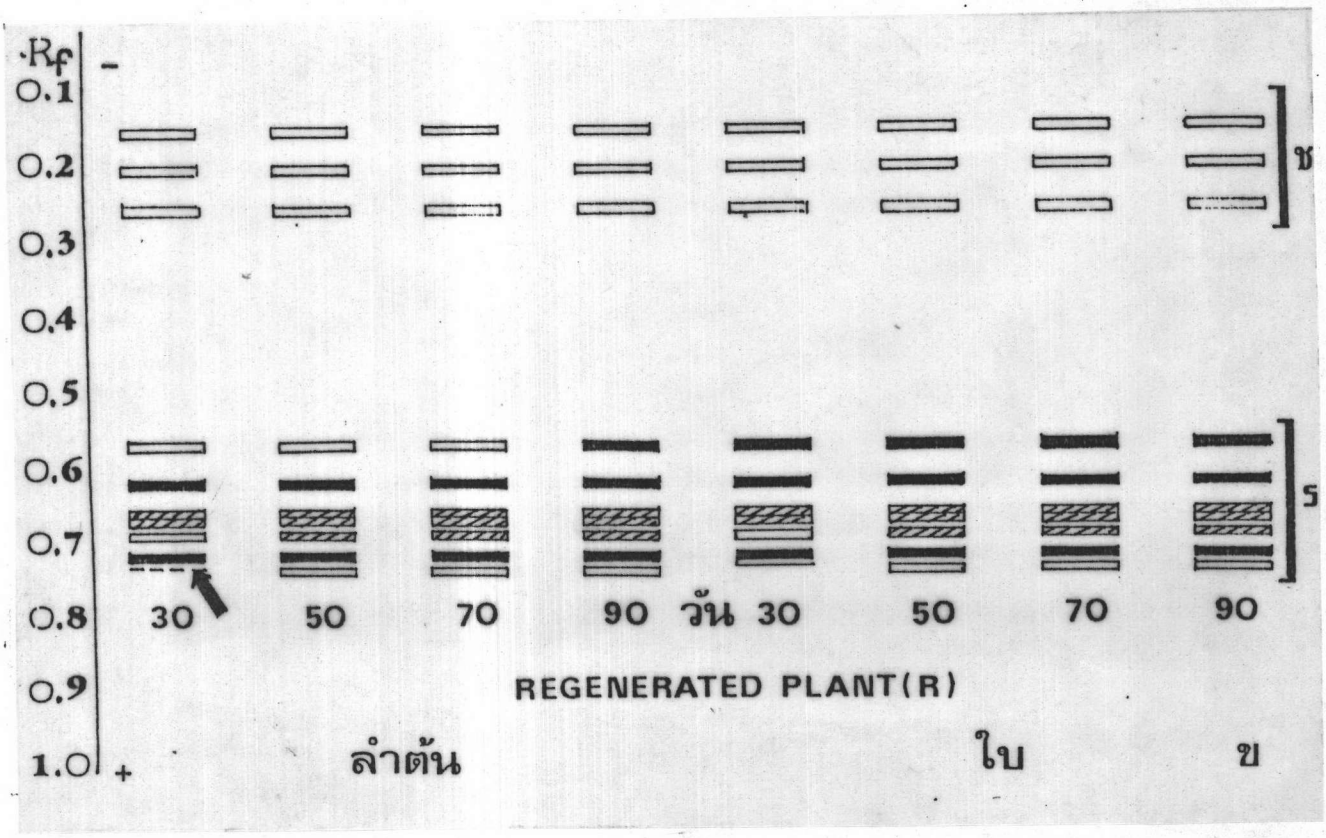
subcultured ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบที่เลี้ยงในอาหารเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างและความคงที่ของรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการ subcultured ในข้อ 2.2.1.1 กับแคลลัสที่ผ่านการ subcultured ก่อนย้ายลงอาหาร เมื่อนำ subcultured ของแคลลัสที่อายุดังกล่าวมาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่า subcultured ของแคลลัสในกลุ่มเดียวกันที่ชักนำจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบจะให้รูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม และอยู่ในตำแหน่งเดียวกับรูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสในข้อ 2.2.1.1 ดังแสดงในแผนภาพที่ 10 จากแผนภาพนี้พบว่า subcultured ของแคลลัสที่เลี้ยงเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน จะมีการแปรในจำนวนและความเข้มของแถบในบางช้ำเช่นเดียวกับที่พบในแคลลัส

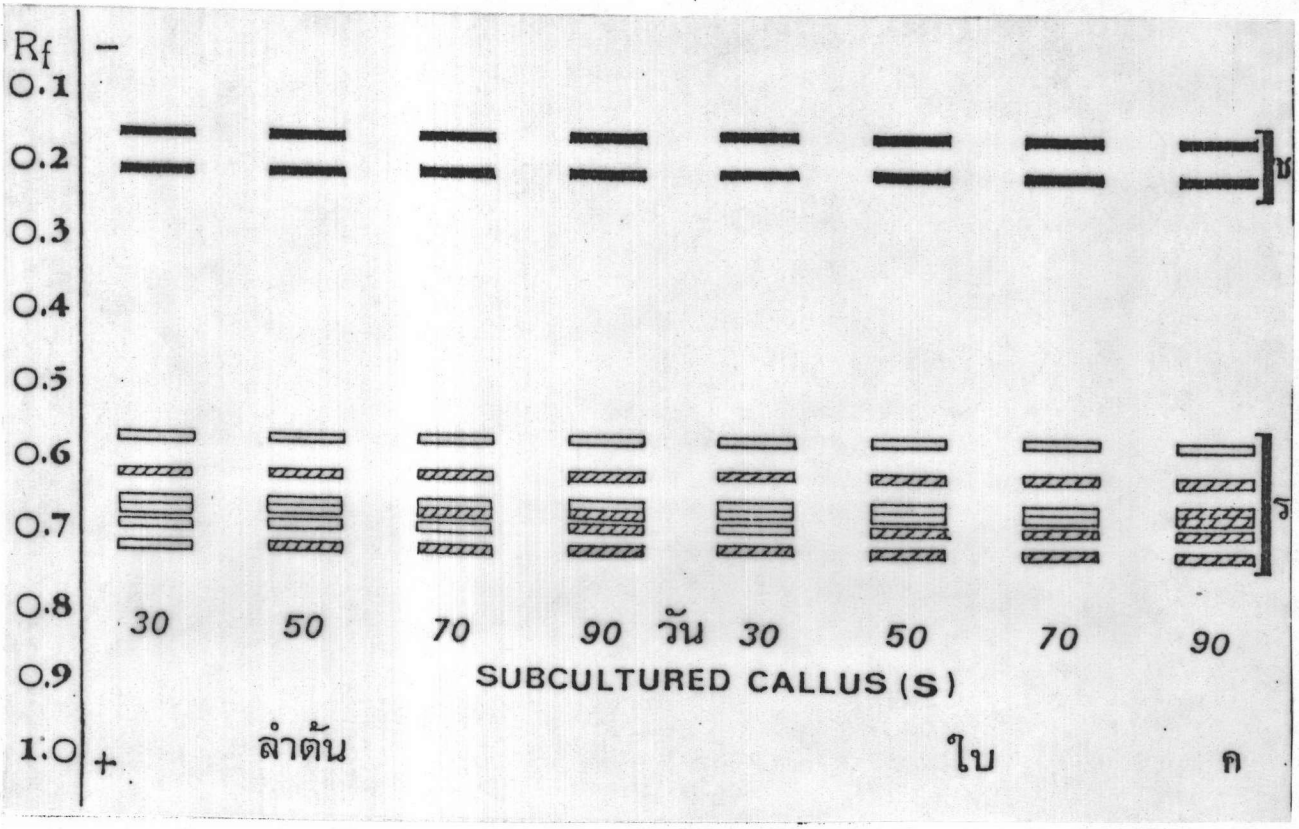
เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัส ดังแสดงในแผนภาพที่ 11 พบว่า รูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากแคลลัส และsubcultured ของแคลลัสให้รูปแบบที่คล้ายคลึงกันมาก โดยอยู่ในช่วง Rf 0.14-0.70 และมีจำนวนแถบเท่ากัน (แต่ในบางช้ำไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วของทั้งแคลลัสและ subcultured callus มีจำนวนแถบไม่

สม่ำเสมอ บางแถบขาดหายไป และเมื่อเกิด regenerated plant แถบที่หายไป ก็จะปรากฏขึ้น และมีความเข้มสูงกว่าแคลลัสด้วย) จะเห็นได้ว่า แคลลัสที่ผ่านการ subcultured ลงในอาหารใหม่กับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการ subcultured ให้รูปแบบไอโซไซม์ไม่แตกต่างกัน และค่อนข้างคงที่ใน subcultured ของแคลลัสแต่ละกลุ่ม แต่รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ regenerated plant จะแตกต่างออกไป กล่าวคือ ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าไอโซไซม์ของ regenerated plant มีค่า Rf 0.14-0.24 มีจำนวน 3 แถบ โดยมีแถบที่ Rf 0.24 เพิ่มขึ้นมา และแถบทั้ง 3 มีความเข้มต่ำ ในขณะที่แคลลัสและ subcultured ของแคลลัส ให้จำนวนแถบ 2 แถบ มีความเข้มของแถบสูง ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf 0.55-0.72 มีจำนวนแถบ 7 แถบ โดยมีแถบที่ Rf0.72 เพิ่มขึ้นมา และความเข้มของไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วของ regenerated plantมีความเข้มสูงกว่าไอโซไซม์จากแคลลัสและ subcultured ของแคลลัส ซึ่งมีจำนวนแถบในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วเพียง 6 แถบ ความเข้มค่อนข้างต่ำ สังเกตความแตกต่างจากแผนภาพที่ 11ในบางซ้ำของแคลลัสและ subcultured ของแคลลัสพบแถบที่ Rf 0.72 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำคล้ายกับที่พบใน regenerated plant ด้วย ซึ่งแคลลัสและ subcultured ของแคลลัสที่มีแถบสีเพิ่มขึ้นมานี้ ต่อมาก็มีการพัฒนาให้ต้นในเวลาอันรวดเร็ว

เมื่อนำอาหารสูตรชักนำแคลลัสของยาสูบ N. rustica ที่เลี้ยงเป็นเวลา 30, 50, 70 และ 90 วัน มาตรวจว่ามีการปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์หรือไม่ ก็พบว่าสามารถตรวจพบไอโซไซม์นี้ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงแคลลัสได้ แต่พบในความเข้มของแถบที่ค่อนข้างต่ำมาก แต่พอจะสังเกตได้ว่ารูปแบบไอโซไซม์ที่พบในอาหารมีรูปแบบคล้ายคลึงกับไอโซไซม์ที่พบในแคลลัส และพบว่าจำนวนแถบและความเข้มของแถบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อแคลลัสมีอายุมากขึ้น ดังแสดงในแผนภาพที่ 12


Rf
-
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
+
ช
ร
30 50 70 90 วัน 30 50 70 90
แคลลัส (C)
ลำต้น
ใบ
ก


Rf
-
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
+
ช
ร
30 50 70 90 วัน 30 50 70 90
REGENERATED PLANT(R)
ลำต้น
ใบ
ข

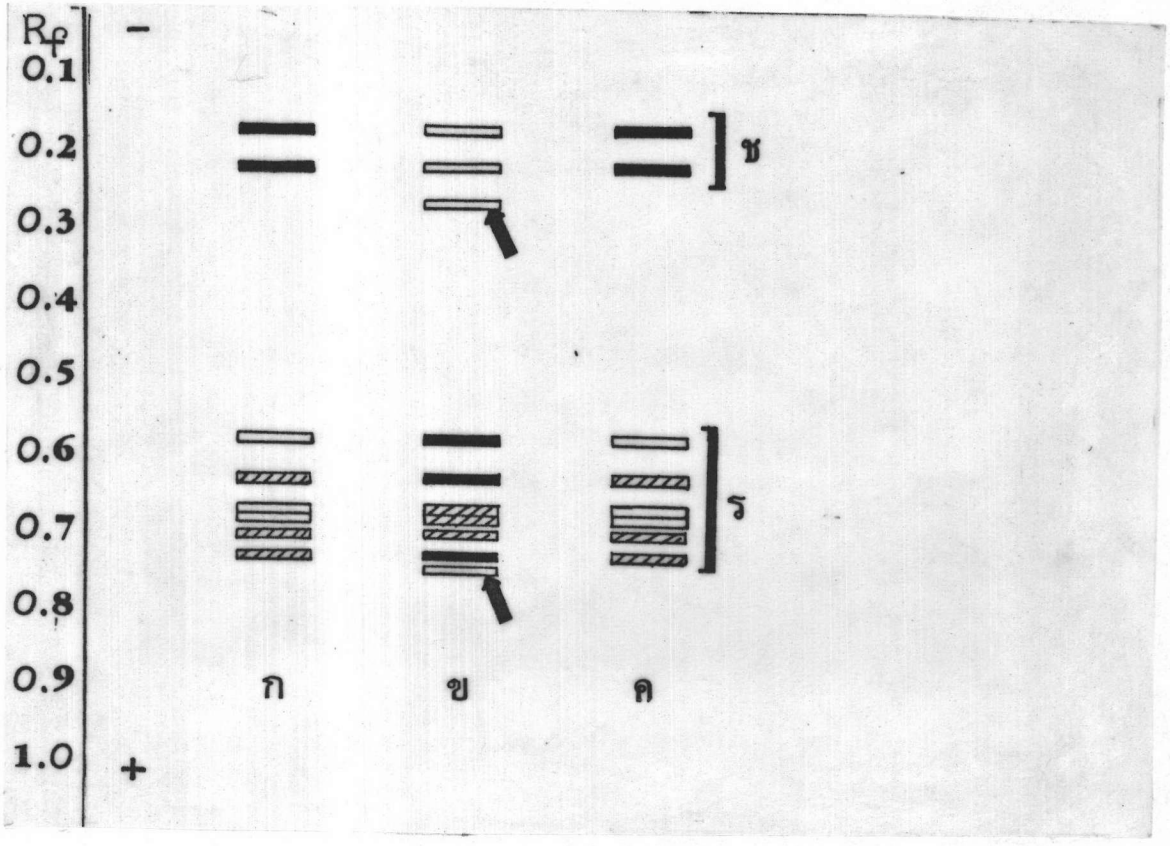


แผนภาพที่ 10 Zymogram ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 30, 50, 70 และ 90 วัน รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

ก. รูปแบบไอโซไซม์ของ C สังเกตแคลลัสจากส่วนใบที่อายุ 90 วัน มีแถบที่ Rf 0.72 เพิ่มขึ้นมา (ลูกศรชี้)

ข. รูปแบบไอโซไซม์ของ R แถบที่ Rf 0.72 (ลูกศรชี้) มีความเข้มเพิ่มขึ้นเมื่อ R อายุมากขึ้น

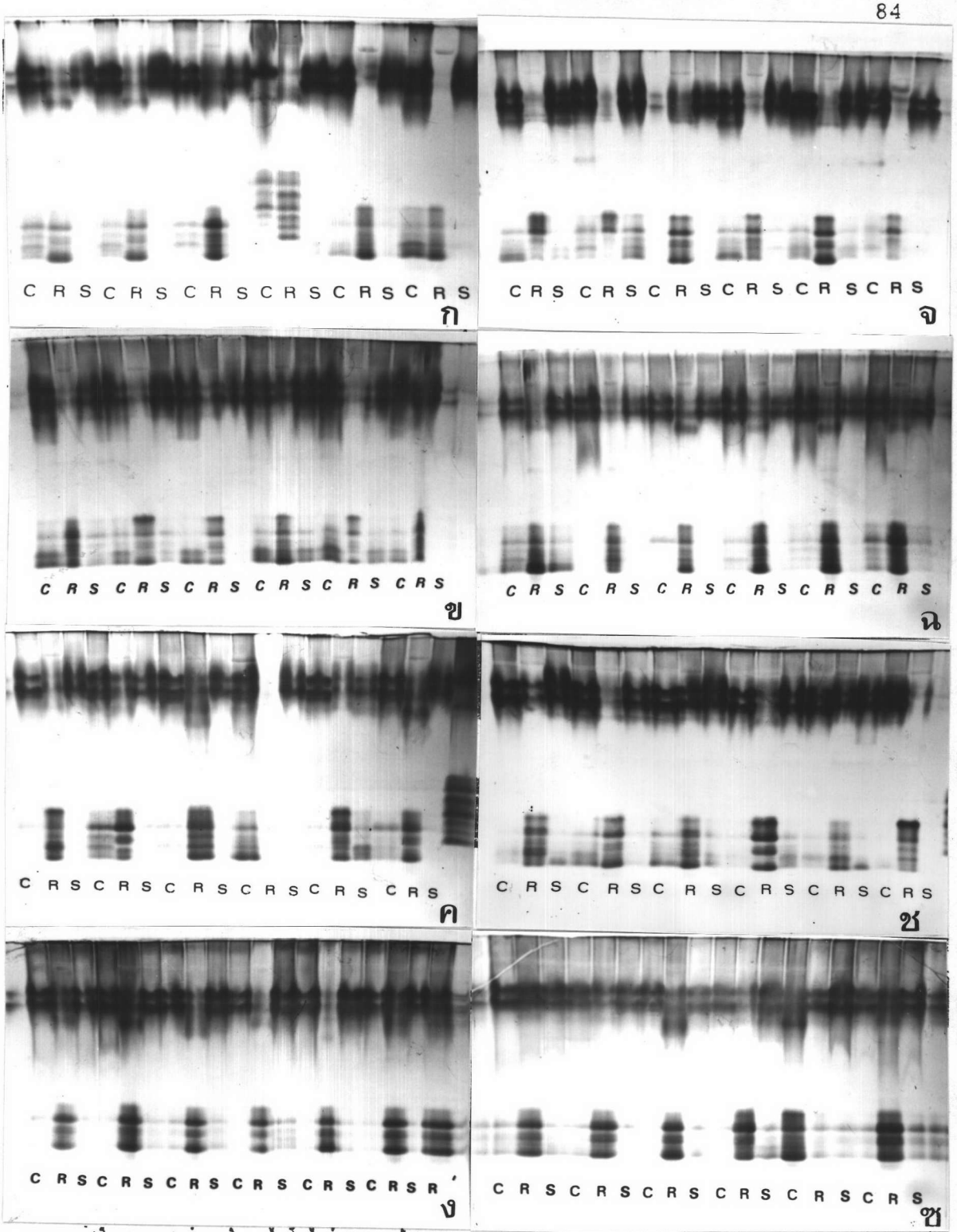
ค. รูปแบบไอโซไซม์ของ S



แผนภาพที่ 11 Zymogram เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัส N. rustica รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

ก. และ ค. รูปแบบไอโซไซม์ของ C และ S ตามลำดับ ไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีความเข้มสูงมีจำนวน 2 แถบ

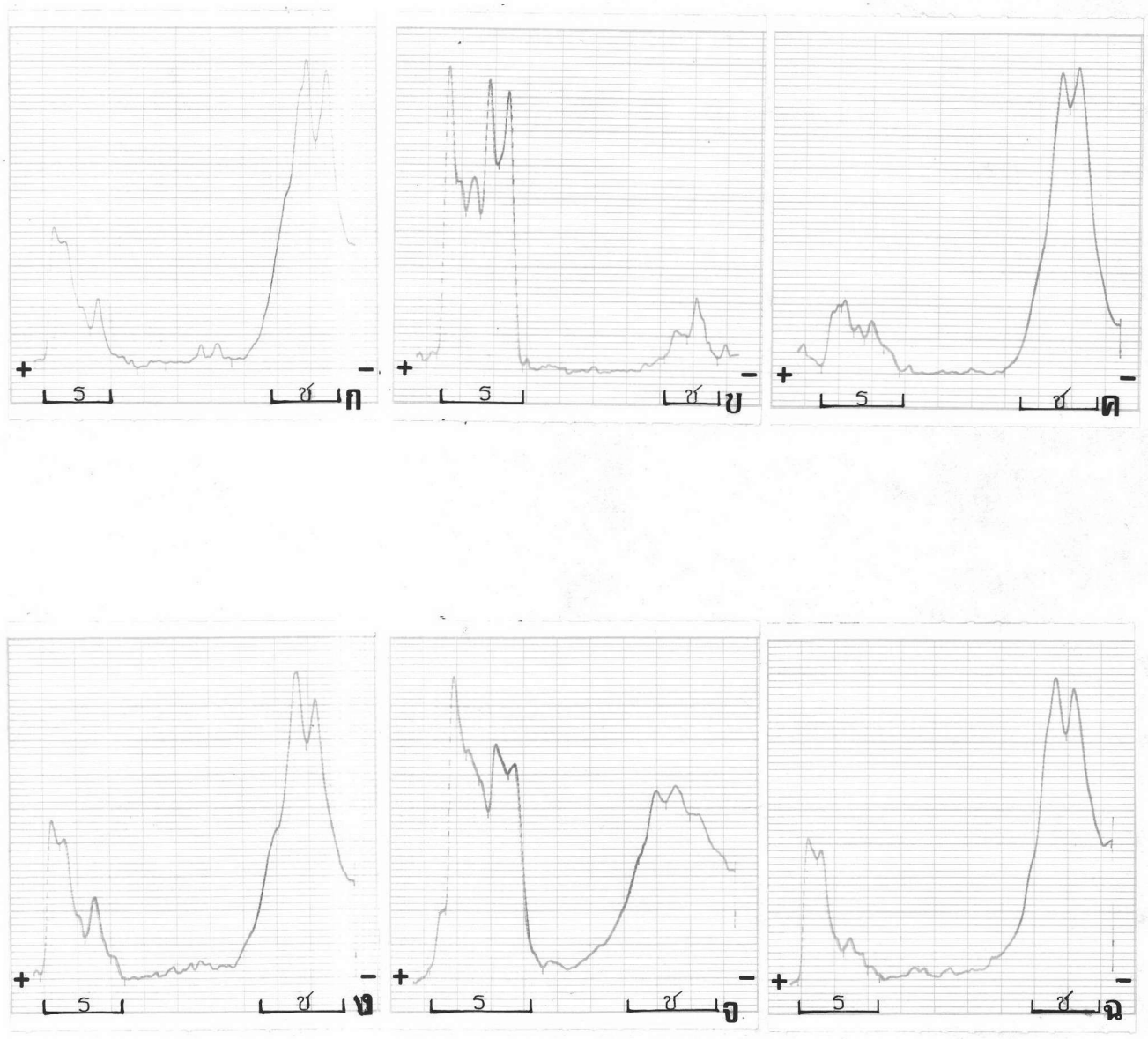
ข. รูปแบบไอโซไซม์ของ R ไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีความเข้มต่ำ มีจำนวน 3 แถบ โดยมีแถบที่ Rf 0.24 เพิ่มขึ้นมา (ลูกศรชี้) และไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มสูง และมีแถบที่ Rf 0.72 เพิ่มขึ้นมา (ลูกศรชี้)



รูปที่ 15 เปรียบเทียบไอโซไซม์ของแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัส N. rustica ที่ชักนำในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล.

ก-ง รูปแบบไอโซไซม์ของ C,R และ S ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารนาน 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ

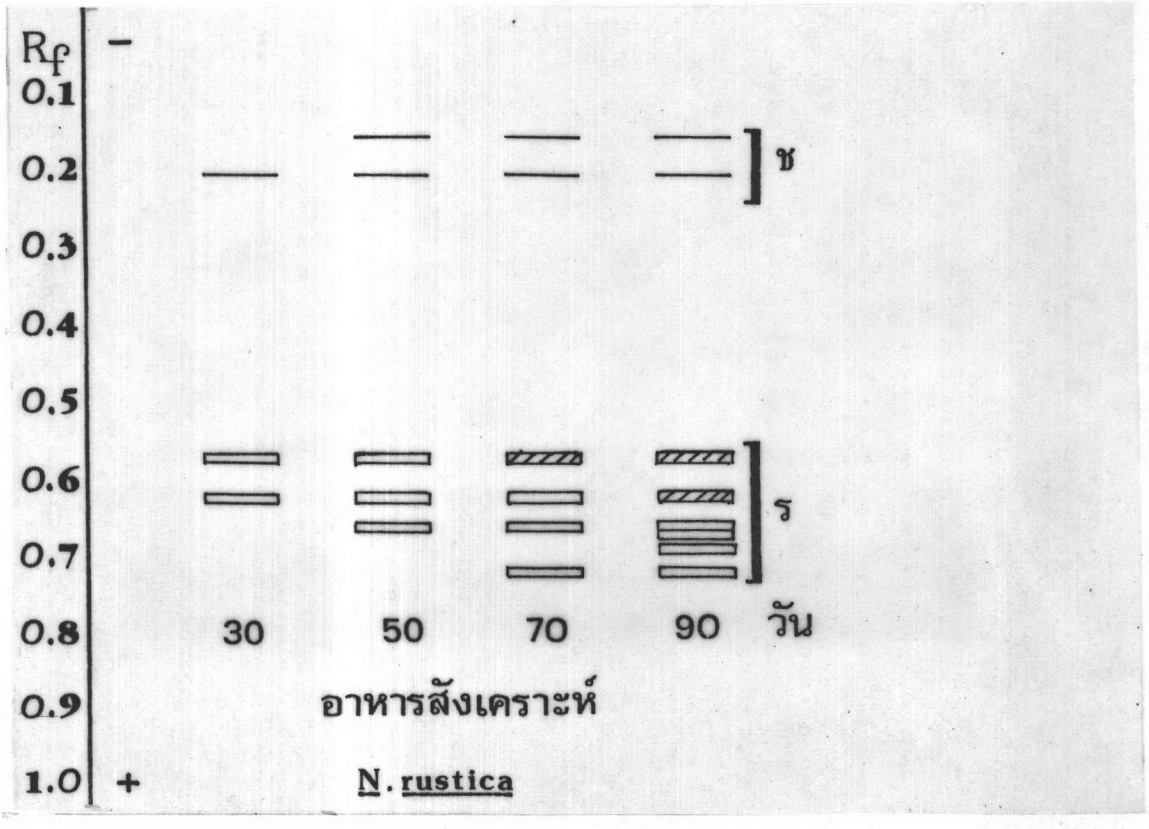
จ-ซ รูปแบบไอโซไซม์ของ C, R และ S ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเมื่อเลี้ยงในอาหารนาน 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ



กราฟที่ 5 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัส (C), regenerated plant (R) และ subcultured (S) ของแคลลัส N. rustica ที่รักษาจากส่วนลำต้นและใบ รูปแบบไอโซไซม์สามารถแยกความแตกต่างในระยะหลังการเคลื่อนที่ของแถบเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ร.) และเคลื่อนที่เร็ว (ช.)

ก-ค ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์ของ C,R และ S ที่รักษาจากส่วนลำต้น ตามลำดับ

ง-จ ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์ของ C, R และ S ที่รักษาจากส่วนใบ ตามลำดับ



แผนภาพที่ 12 Zymogram ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงแคลลัส N. rustica เมื่อเลี้ยงแคลลัสนาน 30, 50, 70 และ 90 วัน รูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว (ร.) สังเกตเห็นว่าความเข้มของแถบไอโซไซม์สูงขึ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสนานขึ้น

2.2.2 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส N. rustica อายุ 10 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. กับรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แทน IAA

แคลลัสของยาสูบ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA 1.9 มก./ล. และไคเนติน 0.5 มก./ล. สามารถจำแนกแคลลัสได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อนำแคลลัสทั้ง 3 กลุ่มนี้มาเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่าสามารถแบ่งไอโซไซม์ตามการเคลื่อนที่ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.14-0.19 มีจำนวน 2 แถบ ความเข้มสูง กลุ่มเคลื่อนที่ปานกลาง มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.30-0.40 มีจำนวน 2 แถบ (พบเฉพาะในแคลลัสกลุ่มที่ 1 มีความเข้มต่ำ) และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.55-0.70 มีจำนวนแถบ 2-6 แถบ ดังแสดงในแผนภาพที่ 13

แคลลัสทั้ง 3 กลุ่มนี้ ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่แตกต่างกันในจำนวนและความเข้มของแถบ กล่าวคือ ในแคลลัสกลุ่มที่ 1 จะพบแถบไอโซไซม์ที่เคลื่อนที่ปานกลางในความเข้มต่ำ ในขณะที่ตรวจไม่พบในแคลลัสกลุ่มที่ 2 และ 3 อีกทั้งความเข้มของไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วของแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 3 จะสูงกว่าความเข้มของไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 2 เมื่อเลี้ยงต่อไป แคลลัสในกลุ่มที่ 1 และ 3 จะมีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่าแคลลัสกลุ่มที่ 2 ด้วย ดังนั้นปริมาณความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์น่าจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ส่วนแคลลัส N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D แทน IAA ก็สามารถจำแนกแคลลัสได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อนำแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มนี้มาศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มไอโซไซม์ตามการเคลื่อนที่ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีค่า Rf 0.14-0.19 มีจำนวน 2 แถบ มีความเข้มสูงมาก และกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีค่า Rf

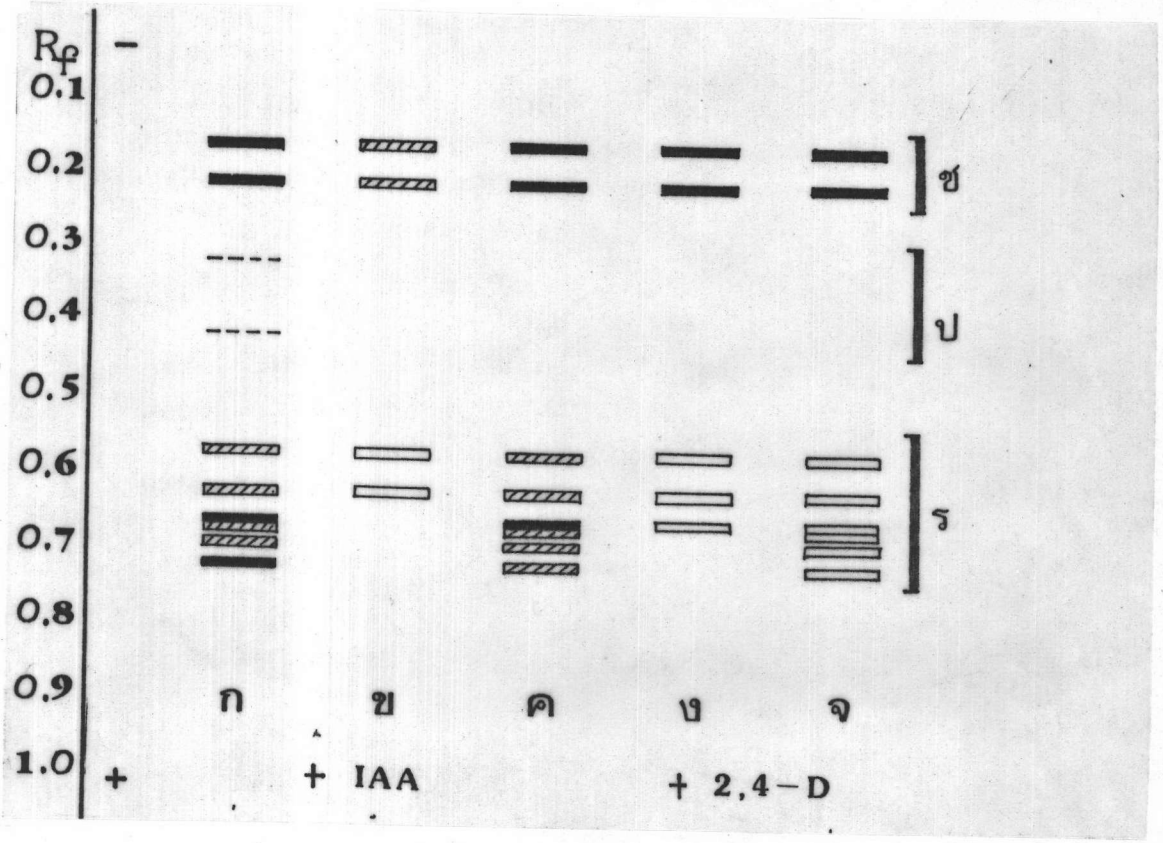
0.55-0.70 มีจำนวน 3-6 แถบ โดยมีความแตกต่างของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วในแคลลัสทั้ง 2 กลุ่มนี้ คือ แคลลัสกลุ่มที่ 1 มีจำนวนแถบน้อยกว่าแคลลัสกลุ่มที่ 2

เมื่อนำแคลลัสจากอาหารที่เติม IAA กับที่เติม 2,4-D แทน IAA นำมาเลี้ยงต่อไปพบว่าให้ผลไปในทำนองเดียวกัน คือ แคลลัสในกลุ่มที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีความเข้มสูงและจำนวนแถบมาก จะมีการพัฒนาให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่า (เช่น แคลลัสในกลุ่มที่ 1 และ 3 ในอาหารที่เติม IAA และแคลลัสกลุ่มที่ 2 ของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D) แคลลัสในกลุ่มที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ความเข้มต่ำและมีจำนวนแถบน้อยกว่า ดังแสดงในผลการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 13 และ 15) เมื่อเปรียบเทียบแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารชักนำที่เติม IAA กับที่เติม 2,4-D แทน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิดให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ปรากฏในตำแหน่งเดียวกัน แต่ความเข้มของแถบในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วจะแตกต่างกัน โดยที่แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA จะมีความเข้มและจำนวนแถบสูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D และแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA ให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plantสูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ดังกล่าวแล้วในผลการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ (ตารางที่ 16)

2.2.3 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกกับยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมเมื่อยาสูบมีอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน

2.2.3.1 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นของยาสูบ

นำส่วนลำต้นของยาสูบ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยไม่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม แต่รดน้ำและให้ปุ๋ยสม่ำเสมอและต้นยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ MS. (1962) ที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมขณะเลี้ยงให้

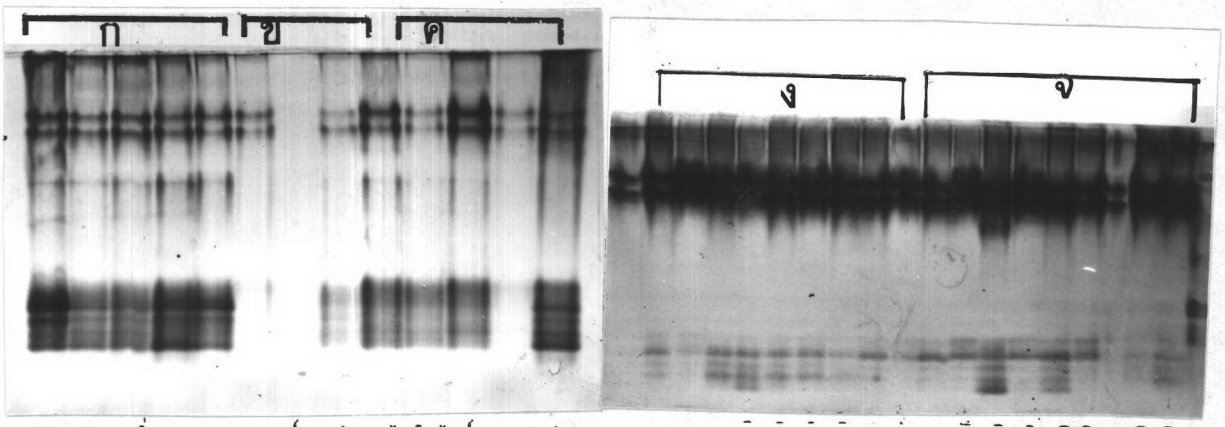


แผนภาพที่ 13 Zymogram เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มต่าง ๆ ของ N. rustica เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม IAA กับในอาหารที่เติม 2,4-D เมื่อแคลลัสอายุ 10 วัน

ก, ข และ ค รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ที่ชักนำในอาหารที่เติม IAA ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์ สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.), ปานกลาง (ป. ซึ่งพบเฉพาะกลุ่มที่ 1) และเร็ว (ร.)

ง และ จ รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ชักนำในอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

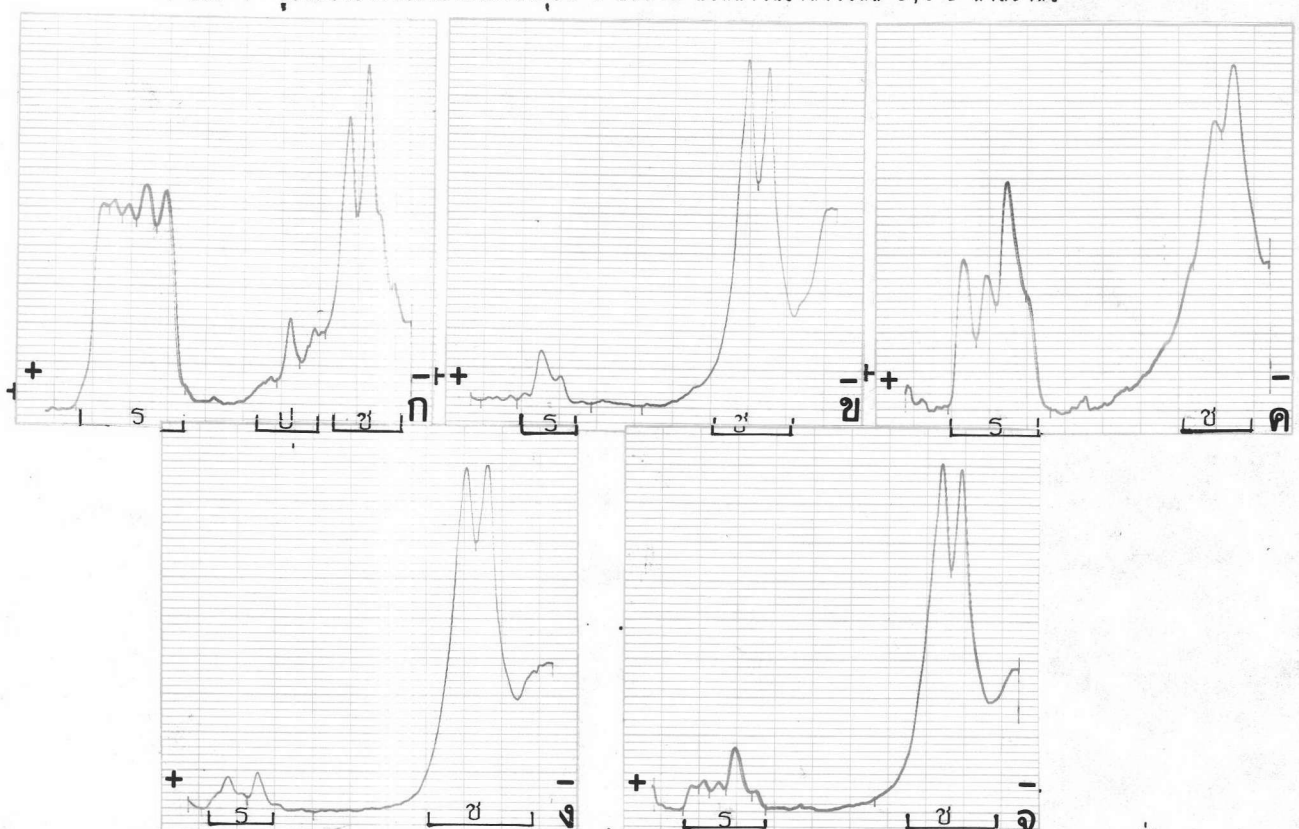
ความเข้มของไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วของแคลลัสที่ชักนำในอาหารที่เติม IAA (โดยเฉพาะกลุ่มที่ 1 และ 3) จะมีความเข้มสูงกว่าแคลลัสที่ชักนำในอาหารที่เติม2,4-D



รูปที่ 16 เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส N. rustica

ก ข และ ค รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ที่ชักนำในอาหารเติม IAA ตามลำดับ

ง และ จ รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ชักนำในอาหารเติม 2,4-D ตามลำดับ



กราฟที่ 6 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มต่างๆ ของ N. rustica ที่ชักนำในอาหารที่เติม IAA กับอาหารที่เติม 2,4-D

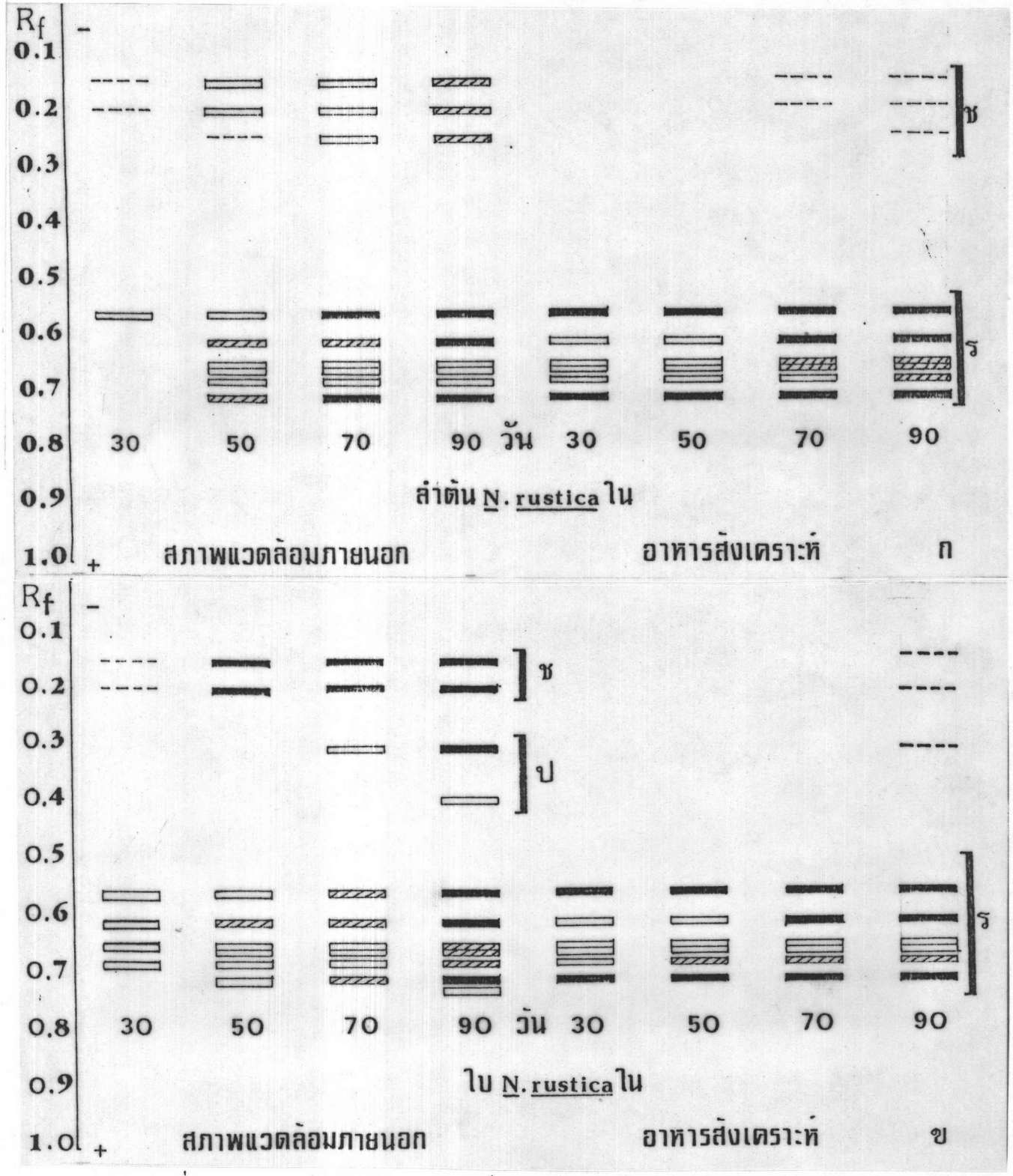
ก-ค ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มที่ 1,2 และ 3 ที่ชักนำในอาหารที่เติม IAA ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์สามารถแยกความแตกต่างในระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป. พบเฉพาะกลุ่มที่ 1) และเร็ว (ร.)

ง-จ ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์จากแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ชักนำในอาหารที่เติม 2,4-D ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แยกความแตกต่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

คงที่ เช่นเดียวกับยาสูบ N. tabacum ในข้อ 2.1.3.1 มาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของลำต้นยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก เมื่อยาสูบอายุน้อย (30, 50 วัน) จะให้จำนวนแถบน้อยไม่คงที่และไม่ชัดเจน เมื่อยาสูบอายุมากขึ้น จำนวนแถบจะคงที่ขึ้น และมีความเข้มสูงขึ้นเห็นได้ชัดเจน และพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าปรากฏในความเข้มที่ค่อนข้างสูง ขณะที่รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อม จะให้จำนวนไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว คงที่ตั้งแต่ยาสูบอายุยังน้อย พบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าปรากฏในความเข้มที่ต่ำมาก และตรวจสอบได้ เฉพาะในลำต้นยาสูบที่มีอายุมาก (70 และ 90 วัน) ดังแสดงในแผนภาพที่ 14

2.2.3.2 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนใบของยาสูบ

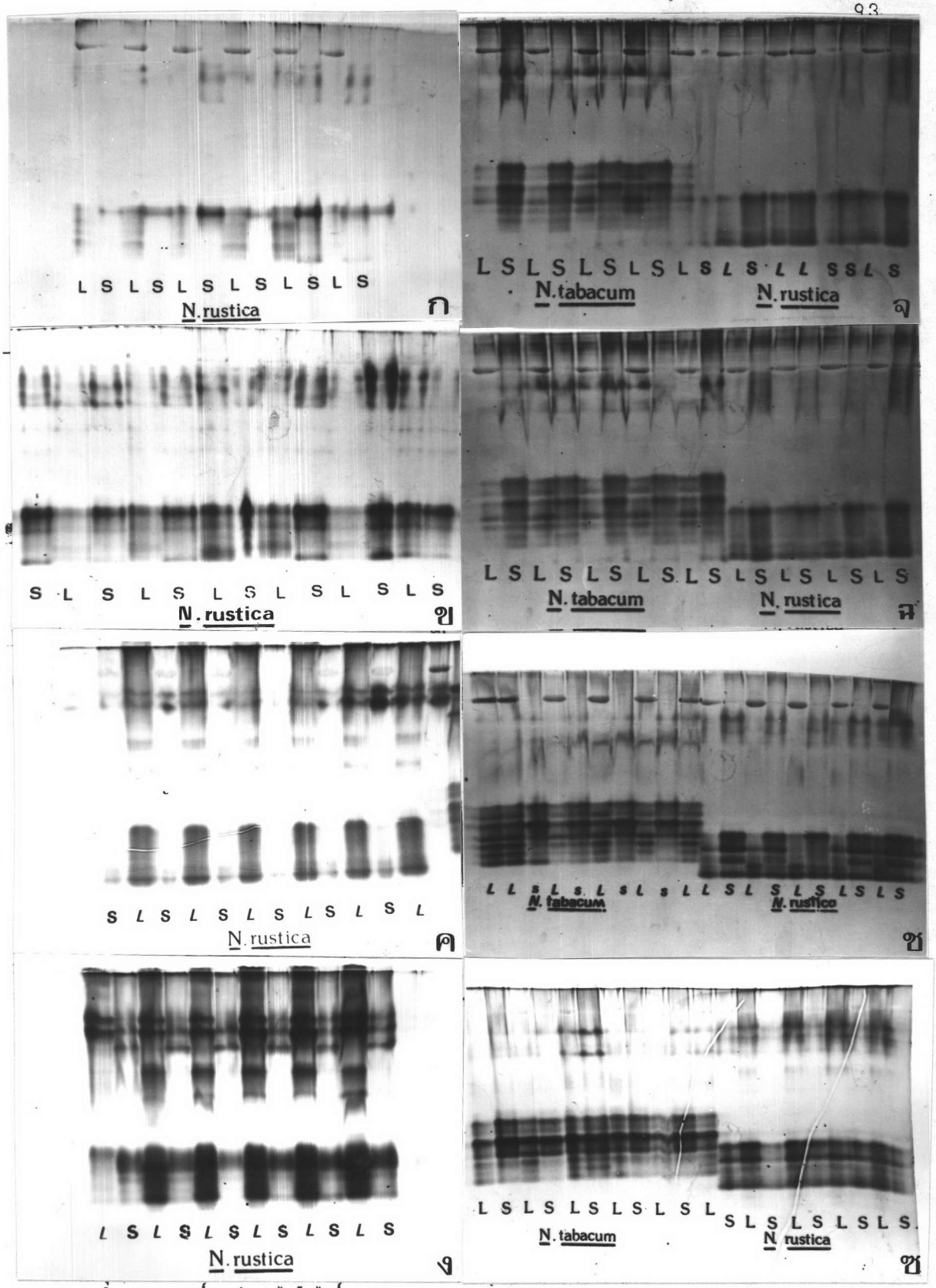
นำส่วนใบของยาสูบ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมทั้ง 2 ดังกล่าวในข้อ 2.1.3.1 มาศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ เมื่อยาสูบอายุได้ 30, 50, 70 และ 90 วัน พบว่ารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์แตกต่างกัน โดยที่รูปแบบไอโซไซม์ของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก ในใบของต้นที่มีอายุน้อย (30 วัน) จะให้แถบที่มีสีจาง และมีจำนวนแถบน้อยกว่าใบของต้นที่มีอายุมากขึ้น (ตั้งแต่ 50 วันขึ้นไป) ซึ่งจะให้แถบที่เข้มกว่า โดยจะมีจำนวนแถบมากที่สุดในใบของต้นที่มีอายุ 90 วัน (ซึ่งพบแถบสีที่ Rf 0.72 เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ) และจะพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีความเข้มสูงมาก ขณะที่ยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ มีรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ค่อนข้างคงที่ และมีจำนวนแถบเท่า ๆ กัน และพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีความเข้มต่ำและพบในยาสูบที่มีอายุมากเท่านั้น ดังแสดงในแผนภาพที่ 14



แผนภาพที่ 14 Zymogram เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและส่วนใบของ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก และที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อมเมื่ออายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน

ก. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนลำต้น แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

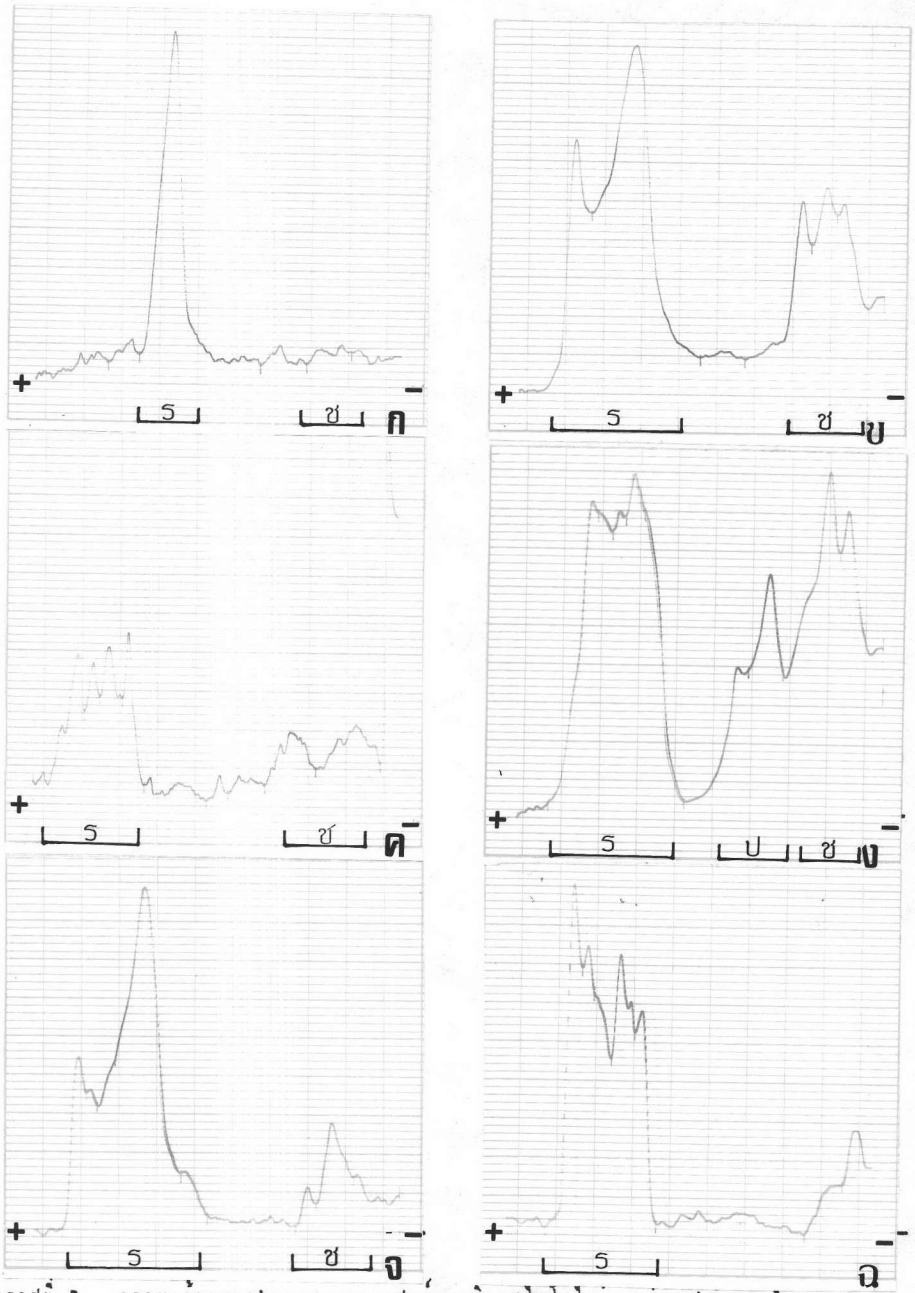
ข. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และ เร็ว (ร.)



รูปที่ 17 เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ N. rustica

ก-ง รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบ (L) และลำต้น (S) ของยาสูบที่ปลูกในสภาพนาดล้อมภายนอก เมื่อยาสูบอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ

จ-ซ รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบ (L) และลำต้น (S) ของยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ เมื่อยาสูบอายุ 30, 50, 70 และ 90 วัน ตามลำดับ



กราฟที่ 7 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบของ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกที่อายุ 30 และ 90 วัน กับยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์อายุ 90 วัน

ก และ ข ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบอายุ 30 และ 90 วัน ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะห่างการเคลื่อนที่ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

ค และ ง ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนใบของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบ 30 และ 90 วัน ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะห่างการเคลื่อนที่ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และเร็ว (ร.)

จ และ ฉ ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์เมื่อยาสูบอายุ 90 วัน (เนื่องจากรูปแบบไอโซไซม์ไม่แตกต่างกันในยาสูบอายุ 30-90 วัน จึงนำเสนอเพียงรูปแบบไอโซไซม์ของยาสูบที่อายุ 90 วันเท่านั้น)

2.2.4 เปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของลำต้นและใบจากส่วนยอดไปยังส่วนโคนต้นภายในต้นเดียวกันของ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อต้นเจริญเต็มที่

นำต้นยาสูบ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกและมีสภาพสมบูรณ์มาทำการศึกษารูปแบบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ โดยทำการศึกษาเป็นส่วน ๆ ดังนี้ คือ ส่วนลำต้นและส่วนใบ ในส่วนของลำต้นศึกษาจากโคนต้นไปยังปลายยอด ส่วนของใบศึกษาตั้งแต่ใบตรงโคนต้นไปยังใบที่ปลายยอด ผลการศึกษามีดังต่อไปนี้

2.2.4.1 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนลำต้นของยาสูบ

ลำต้นบริเวณส่วนยอดจะเป็นลำต้นอ่อนและค่อย ๆ แข็งขึ้นจนมีเนื้อไม้บริเวณโคนต้น ซึ่งจะให้รูปแบบของไอโซไซม์ดังแผนภาพที่ 15 จากแผนภาพนี้ พบว่ารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนลำต้น มีการเคลื่อนที่แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามค่า Rf คือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีค่า Rf 0.14-0.24 มีจำนวนแถบ 3 แถบ และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf 0.55-0.70 มีจำนวนแถบ 6 แถบ จะเห็นว่า จำนวนแถบและความเข้มของไอโซไซม์จะมากขึ้น เมื่อเนื้อเยื่อมีความแก่หรือพัฒนาเต็มที่แล้ว ดังจะเห็นจากบริเวณยอดจะมีจำนวนแถบน้อยกว่าและมีความเข้มของแถบต่ำ โดยจำนวนแถบจะเพิ่มขึ้นจนคงที่และมีความเข้มของแถบสูงขึ้น เมื่อลำต้นมีการพัฒนาเต็มที่หรือแก่ขึ้น

2.2.4.2 รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนใบของยาสูบ

ใบจากบริเวณยอดจะเป็นใบอ่อนและจะค่อยๆ แก่ในบริเวณโคนต้น ซึ่งจะให้รูปแบบไอโซไซม์ดังแผนภาพที่ 15 จากแผนภาพนี้พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากส่วนใบมีการเคลื่อนที่แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามค่า Rf คือกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีค่า Rf 0.14-0.19 มีจำนวน 2 แถบ ความเข้มสูง กลุ่มเคลื่อนที่ปานกลาง มีค่า Rf 0.30-0.39 มีจำนวน 2 แถบ ความเข้มต่ำ และกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีค่า Rf 0.55-0.70

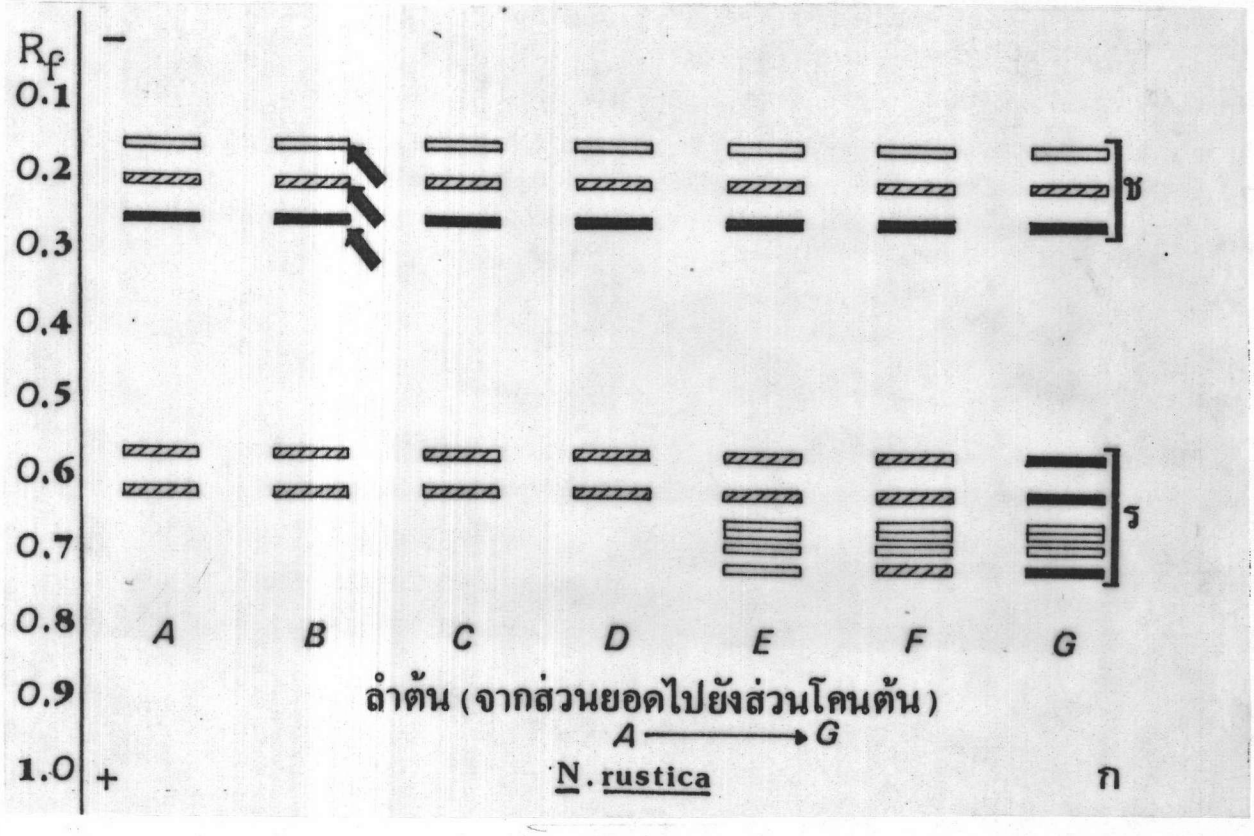
มีจำนวน 6 แถบ และในใบส่วนโคน ซึ่งเป็นใบแก่ที่สุด พบแถบที่ Rf 0.71 เพิ่มขึ้นมา ทำให้มีจำนวน 7 แถบ จะเห็นว่ารูปแบบไอโซไซม์ของใบบริเวณยอด ซึ่งเป็นใบอ่อน มีจำนวนแถบของไอโซไซม์น้อยกว่าและจางกว่าแถบในใบแก่ และรูปแบบไอโซไซม์จะค่อนข้างคงที่ในใบที่ค่อนข้างแก่หรือมีการพัฒนาเต็มที่

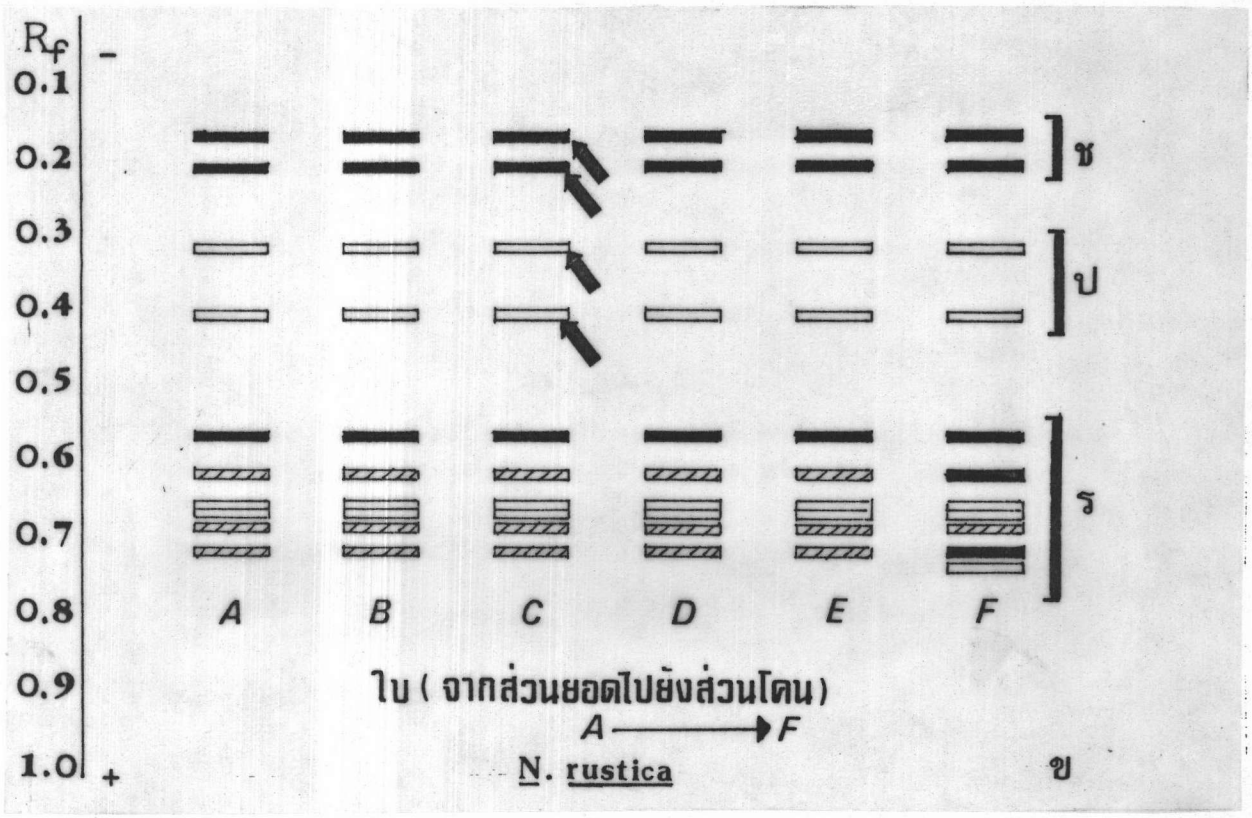
รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ มีความจำเพาะในส่วนลำต้นและส่วนใบ โดยมีความแตกต่างกันในไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่ช้า ในส่วนลำต้นพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า 3 แถบ ขณะที่ในส่วนใบมีแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า 2 แถบ และกลุ่มเคลื่อนที่ปานกลาง 2 แถบ แต่แถบบางแถบพบได้ในส่วนทั้ง 2 เหมือนกัน เช่น แถบที่ Rf 0.14, 0.19, 0.55, 0.60, 0.64, 0.65, 0.67 และ 0.70 ดังแสดงในแผนภาพที่ 15 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่บริเวณดังกล่าวควบคุมกิจกรรมเดียวกันทั้งในส่วนลำต้นและใบ ส่วนแถบที่ Rf 0.24 พบเฉพาะในส่วนลำต้น และแถบที่ Rf 0.30, 0.39 และ 0.71 พบเฉพาะในส่วนใบ ไอโซไซม์ในแถบดังกล่าวอาจเป็นไอโซไซม์ที่มีหน้าที่เฉพาะในอวัยวะแต่ละส่วนก็ได้ จำนวนแถบและความเข้มที่เพิ่มขึ้นทั้งส่วนลำต้นและส่วนใบจากบริเวณยอดไปยังบริเวณโคนต้น แสดงถึงการพัฒนาของรูปแบบไอโซไซม์ตามสภาวะการเจริญของต้นยาสูบ

แผนภาพที่ 15 Zymogram ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและส่วนใบบริเวณยอดไปยังโคนต้นยาสูบในต้นเดียวกันของ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบเจริญเต็มที่

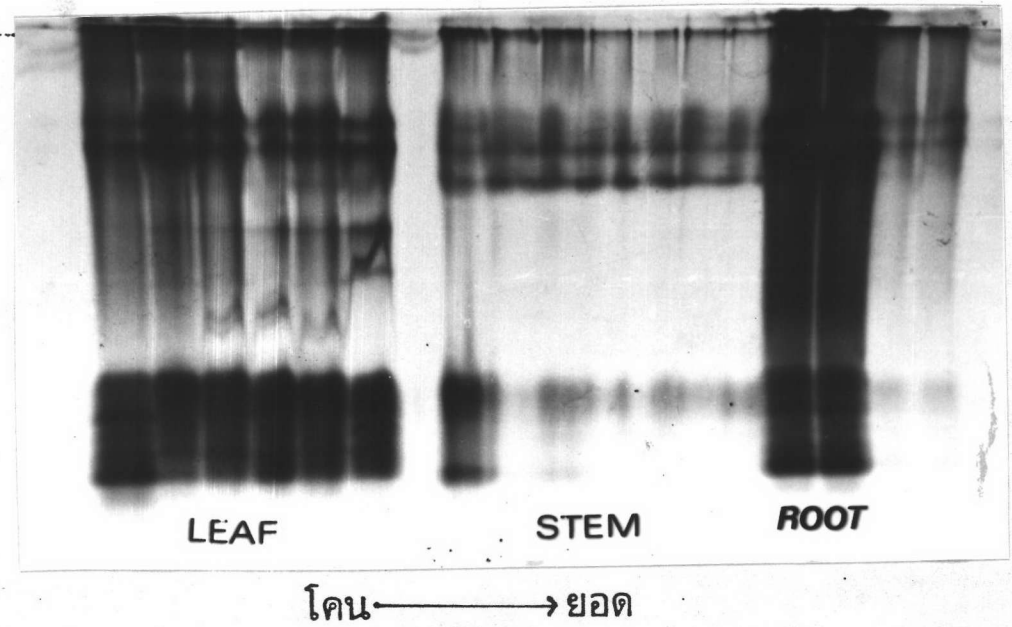
ก. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นยาสูบจากยอด (A) ไปยังโคน (G) ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

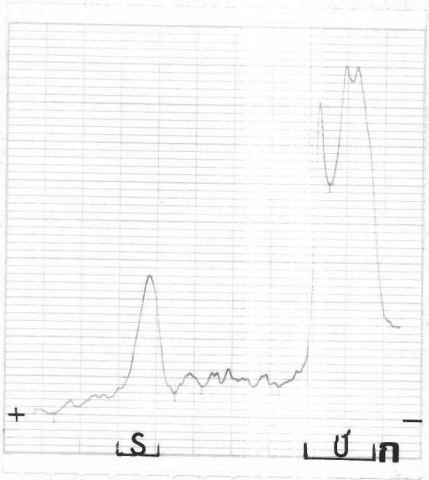
ข. รูปแบบไอโซไซม์จากส่วนใบยาสูบ จากยอด (A) ไปยังโคน (F) ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์สามารถแบ่งตามค่า Rf ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.) และเร็ว (ร.) สังเกตความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของส่วนลำต้นและใบในไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่ช้าและปานกลาง ในส่วนลำต้นพบแถบในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า 3 แถบ (ลูกศรชี้) ไม่พบแถบในกลุ่มเคลื่อนที่ปานกลาง ในส่วนใบพบแถบในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า 2 แถบ และกลุ่มเคลื่อนที่ปานกลาง 2 แถบ (ลูกศรชี้)

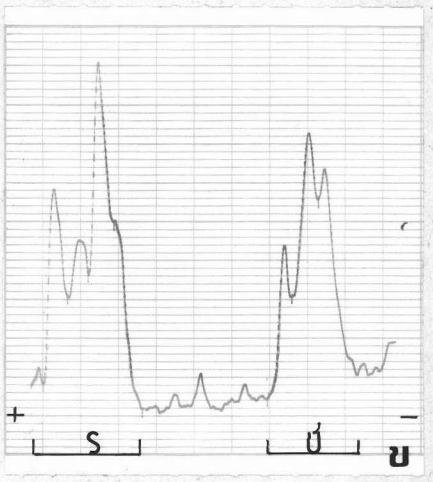


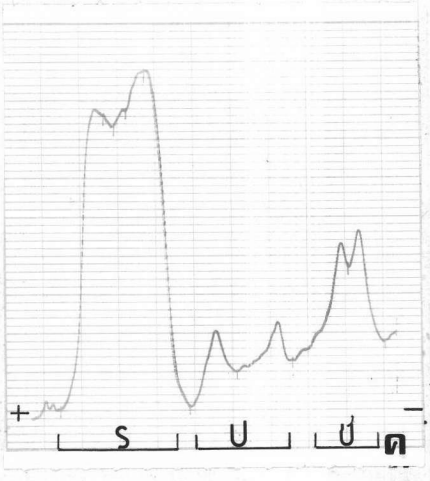


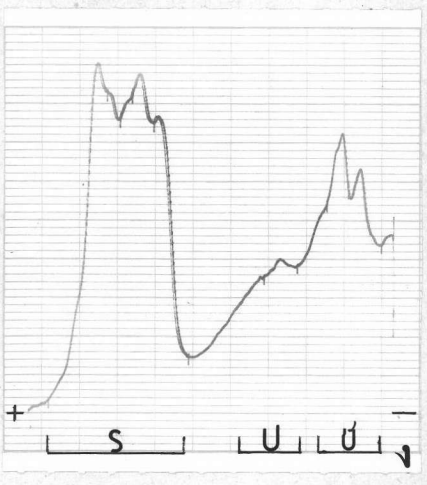
รูปที่ 18 เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนโคนไปยังส่วนยอดของลำต้น (S) และ ใบ (L) ของ N. rustica ที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบเจริญเต็มที่











กราฟที่ 8 ความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบส่วนอ่อนและแก่ของ N. rustica ในต้นเดียวกันที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกเมื่อยาสูบเจริญเต็มที่

ก และ ข ความเข้มและจำนวนแถบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นอ่อนและแก่ ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) และเร็ว (ร.)

ค และ ง ความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์จากส่วนใบอ่อนและใบแก่ ตามลำดับ รูปแบบไอโซไซม์แบ่งตามระยะทางการเคลื่อนที่ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้า (ช.) ปานกลาง (ป.)-และเร็ว (ร.)