บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำให้แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (plant regeneration) อาจเกิดได้โดยวิธีใดวิธีหนึ่งคือ somatic embryogenesis หรือ organogenesis หรือในบางพืชอาจพบว่าสามารถพัฒนาได้ทั้ง 2 แบบ สำหรับข้าว (*Oryza sativa* L.)ได้มีผู้ศึกษาการพัฒนาของต้นข้าวจากแคลลัสพบว่า กระบวนการในการพัฒนาเป็นแบบ organogenesis สำหรับข้าวไทยซึ่งเป็นกลุ่ม indica พบว่าการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์จากแคลลัสยังมีปัญหามากในบางสายพันธุ์ เช่น กข.23 กข.25 เป็นต้น (Vajrabhaya et al., 1984a ; Vajrabhaya et al., 1985) สำหรับสายพันธุ์ กข.23 ซึ่ง Vajrabhaya และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับอัตราการพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์จากแคลลัสนั้นมีเพียง 30 % เท่านั้น ซึ่ง สิริพร ชาตะปัทมะ (2529) สุภาพร วัฒนวีรเดช (2531) และ ลัดดา แสงเดือน (2531) ได้พยายามปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์จากแคลลัส ตามลำดับ พบว่าอัตราการพัฒนาเพิ่มขึ้นมากแต่ยังได้ค่าเฉลี่ยในราว 30 %

การเกิดต้นสมบูรณ์จากแคลลัสของข้าว กข.23 ที่ผ่านมาต้องใช้สูตรอาหาร 3 สูตรต่อเนื่องกันคือ greenspot formation medium ตามด้วย shoot formation medium และ root formation medium เป็นลำดับสุดท้าย จะเห็นว่าการเกิดต้นสมบูรณ์จากการเลี้ยงแคลลัสข้าวนี้ ต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายในการเตรียมอาหารและการย้ายเนื้อเยื่อมากและผลที่ได้พบว่าแคลลัสของข้าว กข.23 ยังมีอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ในอัตราที่ต่ำมากคือ ประมาณ 30 % เท่านั้น

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสูตรอาหารเพื่อให้สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญไปเป็น greenspot และหน่อ ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในอาหารเพียงสูตรเดียวเพื่อลดขั้นตอนการทำงานและประหยัดค่าใช้จ่ายด้วย สำหรับการพัฒนาสูตรอาหารและวิธีการเพื่อชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่นั้น Vajrabhayta et al. (1984a)ได้เริ่มจากสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ซึ่งมีธาตุอาหารหลักในปริมาณค่อนข้างต่ำ โดยการดัดแปลงจากสูตรอาหารของ White (1963) ต่อมาในปี 1985 พบว่า เมื่อใช้สูตรที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักของ White (1963) ธาตุอาหารรองของ MS (1962) โดยเติม IAA 1.0 และ kinetin 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำมะพร้าวอ่อน

100 มิลลิลิตรต่อลิตร และวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสของข้าว กข.23 สามารถพัฒนาไปเป็นหน่อเพียง 5 % เท่านั้น ต่อมา สิริพร ชาตะปัทมะ (2529) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักซึ่ง Vajrabhaya และคณะ ได้ศึกษาไปแล้วพบว่า การมีไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม ความเข้มข้น 3.2 มิลลิโมลาร์ ในสูตรใดๆ ให้ผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่ออย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นหน่อใหม่ได้ถึง 20.8 % ต่อมา สุภาพร วัฒนวีรเดช (2531) ได้ศึกษาถึงผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ พบว่า เมื่อใช้ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรดัดแปลงของ White ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตรต่อลิตร และวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสที่เจริญให้หน่อเพิ่มขึ้นเป็น 30 % ต่อมา ลัดดา แสงเดือน (2531) ได้ศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นได้ดีขึ้นโดยเปลี่ยนมาใช้สูตรของ N_6 (Chu et al., 1975) และใช้วุ้นผง 12 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงแคลลัสในสูตรดังกล่าวที่เติม NAA 0.1 และ BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ก่อน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรที่สองที่ปรับระดับของ NAA เป็น 0.5 และ BAP เป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร หรือน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สูตรใหม่ทั้งสองนี้สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เจริญให้หน่อสูงขึ้นเป็น 35.7-37.4 %

Vajrabhaya and Vajrabhaya (1990) ได้ศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญในสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสว่าจะมีผลต่อเนื่องไปยังสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่อย่างไร โดยใช้สูตร N_6Y_1 (Chung,1988) เป็นหลักและเติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรชักนำแคลลัส พบว่าสูตรนี้จะได้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่และพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ง่าย โดยย้ายเลี้ยงในสูตรของ N_6Y_1 ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และส่วนสำคัญคือวุ้นผงที่เพิ่มจาก 8 เป็น 16 กรัมต่อลิตรซึ่งช่วยให้แคลลัสที่ได้มีการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ดีขึ้นเป็น 35.7 %

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เน้นการใช้สารอินทรีย์เสริมต่างๆ เติมในอาหารสูตรชักนำแคลลัสและสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ตลอดจนการใช้ออกซินและไซโตไคนินในอัตราส่วนต่าง ๆ เปรียบเทียบกัน พบว่าเมื่อเลี้ยงเอมบริโอข้าวในอาหารชักนำแคลลัส สูตร A ซึ่งใช้ 2,4-D 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้ายแคลลัสนั้นมาเลี้ยงต่อในอาหารชักนำ

50

แคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ปรับความเข้มข้นของ NAA คือ 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP คือ 0.8, 1.6 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP ทั้ง 9 สูตรให้ผลไม่ต่างกัน (ตารางที่ 4) เมื่อมาศึกษาผลของสารอินทรีย์เสริมชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำสกัดมันฝรั่ง เนื้อกล้วยหอมทอง เนื้อมะละกอ เนื้อมะเขือเทศ และปุ๋ยปลา (ตารางที่ 6) ที่เติมในสูตร B ที่ใช้ NAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร A พบว่าน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อได้ 14.3 % และ 16.7 % ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาถึงผลของน้ำสกัดมันฝรั่งในตารางที่ 4 ซึ่งทำการทดลองแบบเดียวกัน เมื่อพิจารณาสัดส่วนของ NAA กับ BAP คือ 0.4:1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับได้เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เกิดหน่อเพียง 6.0 % เท่านั้น ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าสารอินทรีย์เสริมที่ใช้แต่ละครั้งอาจมีคุณค่าขององค์ประกอบของสารอาหารที่ได้แตกต่างกันทั้งๆที่เป็นพันธุ์เดียวกัน จึงทำให้มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของแคลลัสแตกต่างได้เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลของสารอินทรีย์เสริมชนิดต่างๆ และความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่าการใช้สารอินทรีย์เสริมคือ น้ำสกัดมันฝรั่งหรือเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสพัฒนาเป็นหน่อได้ดี โดยผลในตารางนี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อใช้มันฝรั่งเป็นสารเสริมน้ำหนัก 150 กรัมต่อลิตรในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ควรใช้น้ำสกัดมันฝรั่งดีกว่าเนื้อมันฝรั่งทั้งหมด จะเห็นว่าเมื่อใช้ NAA กับ BAP อัตราส่วน 0.4 : 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อในสูตรที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่งสูงถึง 31.1 % แต่เมื่อใช้เนื้อมันฝรั่งแทน พบว่าเปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อจะลดต่ำมาก เหลือเพียง 11.5 % เท่านั้น การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้วุ้นอาหารค่อนข้างแข็งคือ 16 กรัมต่อลิตร และในเนื้อมันฝรั่งมีแป้งที่ละลายน้ำได้อยู่มาก อาจมีผลต่อค่าของ osmotic potential ในอาหารทำให้การดูดอาหารของแคลลัสเกิดได้ยากการเจริญและพัฒนาจึงลดลง สำหรับการใช้เนื้อมะเขือเทศนั้น พบว่าเมื่อใช้ 150 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ให้ผลดีกว่าการใช้ 500 กรัมต่อลิตร และควรใช้ NAA กับ BAP ในอัตราส่วน 0.8 : 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อสูงสุดถึง 35.7 % ภายในเวลา 3 สัปดาห์

เมื่อศึกษาถึงการใช้สารอินทรีย์เสริมในอาหารสูตรชักนำแคลลัสว่าจะมีผลช่วยให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อเพิ่มขึ้นได้หรือไม่ โดยใช้น้ำสกัดมันฝรั่งหรือเนื้อมันฝรั่งหรือ

เนื้อมะเขือเทศ หรือทั้งสองอย่างรวมกัน (ตารางที่ 10) ทั้งนี้ใช้ 2,4-D 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารชักนำแคลลัส สูตร A และ NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B จะเห็นว่าสูตรที่ให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีที่สุดคือ สูตรชักนำแคลลัสที่เติมเนื้อมันฝรั่ง 100 หรือ 150 กรัมต่อลิตร และสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร คือ มีแคลลัสที่เกิดหน่อได้ถึง 11.9 % การเกิดเป็นหน่อจากแคลลัสไม่ดีเท่าที่ควร อาจเป็นไปได้ในแง่ที่ว่าสัดส่วนของ NAA และ BAP ที่ใช้ยังไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ จึงได้ทำการศึกษาใหม่โดยเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น คือ ใช้ NAA 0.8, 3.2 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6, 6.4 และ 25.6 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 อัตราส่วนในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราส่วนของ NAA กับ BAP ที่เหมาะสมคือ 0.8 : 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร คือได้จำนวนแคลลัสที่ให้หน่อสูงถึง 33.3 % เมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 3 สัปดาห์

เมื่อได้อัตราส่วนของ NAA กับ BAP ที่ช่วยให้แคลลัสสามารถพัฒนาให้หน่อได้มากแล้ว ได้ย้อนกลับมาศึกษาถึงสารอินทรีย์เสริมที่เติมในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ทั้งนี้เลือกใช้น้ำสกัดมันฝรั่งหรือเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร โดยการเติมปุ๋ยปลา 2.0 หรือ 4.0 มิลลิลิตรต่อลิตร รวมลงไปในอาหารสูตร B ที่ใช้ NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลดีมาแล้วจากการทดลองก่อน ผลการทดลองนี้เห็นได้ชัดเจนในตารางที่ 14 คือเมื่อเติมปุ๋ยปลาลงไปด้วยทำให้แคลลัสเกิดหน่อดีขึ้น ทั้งในสูตรที่มีน้ำสกัดมันฝรั่ง หรือเนื้อมะเขือเทศ หรือมีทั้งสองอย่างรวมกันอย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ผลในตารางที่ 14 นี้เห็นได้ว่า จำนวนแคลลัสที่สามารถเกิดหน่อได้ดี คือ สูตร B ที่ใช้ NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร ร่วมกับปุ๋ยปลา 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยให้จำนวนแคลลัสสูงสุด 42.9 % เมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนสูตรที่ไม่เติมปุ๋ยปลาก็ยังได้แคลลัสที่เกิดหน่อสูงถึง 38.1 %

จากการทดลองนี้เห็นได้ชัดว่า การเลือกใช้อัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมมีผลเป็นอย่างมากต่อการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัส ส่วนการใช้สารอินทรีย์เสริมบางชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสมมีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสเช่นกัน ความเข้มข้นและชนิดของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัส ไม่มีสูตรใดที่สามารถจะเป็นสูตร

มาตรฐานได้ เนื่องจากพืชแต่ละชนิด หรือแม้แต่ชนิดเดียวกันแต่สภาวะของชิ้นส่วนของพืชต่างกัน ก็ตอบสนองต่อออกซินและไซโตไคนินต่างกัน

<u>ผลของสารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่</u>

การใช้เนื้อมันผรั่ง 100 หรือ 150 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารอินทรีย์เสริมชนิดอื่น (ตารางที่ 10) เนื่องจากในเนื้อมันผรั่งต้มมีปริมาณของโปรตีนสูงประมาณ 1,900 และ 2,850 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักมันผรั่งต้ม 100 และ 150 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ก) ซึ่งเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูงอาจเกิดสารประกอบที่ไม่ทราบองค์ประกอบแน่นอนเพิ่มมากขึ้นจากเนื้อของมันผรั่งนั้น ในขณะที่ในน้ำสกัดมันผรั่งมีเฉพาะน้ำที่สกัดจากมันผรั่งเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติมเนื้อมันผรั่งหรือน้ำสกัดมันผรั่งร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน ก็ยิ่งทำให้แคลลัสมีการเจริญที่สมบูรณ์พร้อมที่จะเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากในน้ำมะพร้าวนั้นประกอบด้วยไซโตไคนินสูงและกรดอะมิโนหลายชนิด (Steward, Mapes, and Ammirato, 1969) น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสปริมาณรวมกันประมาณ 2 กรัมต่อน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร (Mosihuzzaman, Paul, and Nahar, 1993) วิตามิน B ต่างๆ ได้แก่ nicotinic acid pantothenic acid, biotin, riboflavin และ folic acid (Child, 1964) และสารประกอบเกลืออนินทรีย์ (Chavalittamarong, Pidatcha, and Thavisri, 1982) ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำมะพร้าวนี้ช่วยส่งเสริมการเจริญของแคลลัส เช่นเดียวกับ Zapata and Torrizo (1985) รายงานว่าการเติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสจากอับละอองเรณูของข้าวกลุ่ม indica ช่วยเพิ่มจำนวนแคลลัสมากกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวถึง 1.4 เท่า ดังนั้นเมื่อเติมเนื้อมันผรั่ง 100 หรือ 150 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร ก็ยิ่งเพิ่มจำนวนแคลลัสและพัฒนาให้แคลลัสเจริญสมบูรณ์พร้อมที่จะเจริญและเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ได้ แต่สำหรับการเติมเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันผรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันผรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot และจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อต่ำ และไม่เหมาะที่จะนำมาเติมร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน ในสูตรอาหาร

ชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งนี้เนื่องจากเนื้อมะเขือเทศสุกมี pH ต่ำมากและเมื่อรวมกันแล้วมีน้ำตาลมาก อาจทำให้เกิดสารพิษ เช่น phenolics ระหว่างนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร (Schenk, Hsiao, and Bornman, 1991) ซึ่งมีผลต่อการเจริญของแคลลัสได้ (Ball, Zhou, and Kozak, 1992)

ดังนั้นสารอินทรีย์เสริมที่เหมาะต่อการเติมในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส คือ เนื้อมันฝรั่ง 100 หรือ 150 กรัมต่อลิตร แต่เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย จึงเลือกใช้เนื้อมันฝรั่ง 100 แทน 150 กรัมต่อลิตรโดยเติมร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตรต่อลิตร

<u>ผลของสารอินทรีย์เสริมที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่</u>

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 ใช้สารอินทรีย์เสริม 5 ชนิด คือ น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร เนื้อกล้วยหอมทอง เนื้อมะละกอ และเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร และปุ๋ยปลา 3.0 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่า การใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง หรือเนื้อมะเขือเทศ ให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีที่สุด สำหรับการใช้เนื้อกล้วยหอมและปุ๋ยปลา ให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อต่ำ และเนื้อมะละกอไม่ให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อเลย การใช้เนื้อกล้วยหอมนอกจากไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดหน่อแล้ว สิวลัย สุเภากิจ (2536) ยังรายงานว่าไม่เหมาะต่อการเลี้ยงต้นอ่อนขนาด 7-10 มิลลิเมตรของกล้วยไม้สกุล <u>Dendrobium</u> เช่นกัน สำหรับการใช้เนื้อกล้วยพันธุ์อื่นๆ Zapata and Torrizo (1985) ก็รายงานว่าเนื้อกล้วยสุกยับยั้งการเจริญของแคลลัสข้าวกลุ่ม indica การใช้เนื้อมะละกอในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น Salazar (1988) รายงานว่าการใช้เนื้อมะละกอสุกพันธุ์ Carica1 100 หรือ 200 กรัมต่อลิตร ทำให้เมล็ดกล้วยไม้สกุล <u>Phalaenopsis amabilis</u> สามารถงอกและเจริญได้รวดเร็ว แต่สำหรับการใช้ในสูตรอาหารเพื่อชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่กลับพบว่าให้ผลไม่ดีเลย อาจเป็นเพราะในเนื้อมะละกอสุกมีปริมาณน้ำตาลสูง ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 48.3 % กลูโคส 29.0 % และฟรุกโตส 21.0 % โดยน้ำหนัก (Salunke and Desai, 1984b) โดยเฉพาะการมีน้ำตาลฟรุกโตสอาจทำให้อาหารเป็นพิษเนื่องจากเป็นน้ำตาลที่มีความเสถียรน้อยที่สุด เมื่อได้รับความร้อนจากการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งมีการสลายตัวเป็นสารพิษได้มากกว่าน้ำตาลซูโครสถึง 40 เท่า (Hsiao and Bornman, 1991) สำหรับการใช้ปุ๋ยปลาในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น Chang (1953) ได้พบว่าการใช้ปุ๋ยปลา $1^1/2$ ช้อนชา (6 มิลลิลิตร) กับ peptone 1 ช้อนชา (1.61 กรัม) และน้ำตาล $5^1/2$ ช้อนชา (15.42 กรัม) ในวุ้นอาหาร

1 ลิตร ทำให้เมล็ดกล้วยไม้สกุล Dendrobium, Vanda และ Cattleya สามารถงอกและเจริญดีกว่าสูตรอาหารที่มีธาตุอาหารอนินทรีย์ครบ อย่างไรก็ตามการใช้ปุ๋ยปลาอย่างเดียวไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ เนื่องจากให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อต่ำ เนื่องจากการใช้สารอินทรีย์เสริมเฉพาะปุ๋ยปลาอย่างเดียวอาจมีผลเสีย เนื่องจาก pH ต่ำ ไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ แต่เมื่อใช้ปุ๋ยปลาความเข้มข้น 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตรร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร แล้วพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อได้สูงสุด 42.9 % เมื่อสังเกตผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 14) อย่างไรก็ตามการเติมหรือไม่เติมปุ๋ยปลาร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อไม่แตกต่างกัน แต่การเติมปุ๋ยปลา ความเข้มข้น 2.0-4.0 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้เพิ่มจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อและจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมดมากขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงจาก 3 สัปดาห์เป็น 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 14) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในปุ๋ยปลามีปริมาณโปรตีนสูงเหมาะที่จะส่งเสริมการเจริญของหน่อได้เร็วยิ่งขึ้น (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ก)

การเติมน้ำสกัดมันฝรั่ง ส่งเสริมการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้นั้น Kaur-Sawhney et al. (1980)(อ้างถึงในวิวัฒน์ วุฒิพันธไชย, 2529) รายงานว่าในมันฝรั่งมีสารประกอบชนิดหนึ่งคือ โพลีเอมีน (Polyamine) ตัวอย่างของสารโพลีเอมีน เช่น putresine, spermidine และ sparmine เป็นต้น สารนี้สามารถทำให้มันฝรั่งในระยะพักตัวเกิดหัวใหม่ได้ดี นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อการเพิ่มกรดนิวคลีอิก ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสในเนื้อเยื่อพืชมากขึ้น และยังช่วยหน่วงการสลายตัวของคลอโรพลาสต์ และโปรตีน RNA ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การเติมน้ำสกัดมันฝรั่งมีผลต่อการเกิด greenspot มากที่สุด และมีผลต่อการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นหน่อฮีกด้วย โดยพบว่า การใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ที่ให้ผลดีต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ จากผลการทดลองในตารางที่ 6 เมื่อเปลี่ยนโดยใช้เป็น 150 แทน 100 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่าทำให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากมีปริมาณของสารประกอบโพลีเอมีนเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักที่ใช้ (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ก) และช่วยส่งเสริมการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เนื้อมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร ไม่เหมาะต่อการเติมในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ เนื่องจากการทดลองนี้ได้ใช้วุ้นผงที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้วุ้นอาหารแข็งตัวมากอยู่แล้วและเมื่อเติมเนื้อมันฝรั่งก็ยิ่งทำให้อาหารแข็ง

มากขึ้น การดูดน้ำได้น้อยลงอาจไปยับยั้งการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่ง Brown, Leung, and Thorpe (1979) รายงานว่าการเพิ่มความแข็งของอาหารชักนำแคลลัสยาสูบให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยเพิ่ม Bacto agar ทำให้เซลล์พืชไม่สามารถนำกรดอะมิโนมาใช้ได้ สำหรับการใช้เนื้อมะเขือเทศในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น Meyer (1945) ได้ศึกษาการสร้างสูตรอาหารอย่างง่ายเพื่อเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยใช้น้ำมะเขือเทศสุก 250 มิลลิลิตรกับน้ำกล้วย 250 มิลลิลิตร ในวุ้นอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล พบว่าสามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุล Laelia, Cattleya, Oncidium, Epidendrum, Encyclia และ Rodrigunesia ได้ดีกว่าในอาหารสูตร Knudson B การที่น้ำมะเขือเทศกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 และเติมวุ้นเพื่อให้แข็งเท่านั้น สามารถทำให้เมล็ดกล้วยไม้งอกและเจริญเป็นต้นได้ดีกว่าของสูตร Knudson B ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก N P K Mg Ca S และ Fe จากสารประกอบอนินทรีย์ และน้ำตาลเท่านั้น น่าจะเป็นผลของกรดอะมิโนโดยเฉพาะ glutamine และ asparagine (Salunkhe and Desai, 1984a) วิตามิน B_1 (Meyer, 1945) และธาตุอาหารรองต่างๆที่ได้จากดินที่ปลูกด้วย Gamborg (1991) พบว่า วิตามิน B1 และ glutamine มีส่วนที่ทำให้เกิดการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเป็นต้นใหม่ได้ดีขึ้น โดยเฉพาะวิตามิน B_1 มีความสำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์พืชมาก (Kenneth, 1989) แต่สำหรับการใช้เนื้อมะเขือเทศในสูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดต้นใหม่นั้น พบว่าการใช้ในปริมาณมากขึ้นกว่าเดิมคือ 150 เป็น 500 กรัมต่อลิตร เท่ากับของ Meyer (1945) ที่ใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ ไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดต้นใหม่ (ตารางที่ 7) เนื่องจากอาจมีสารบางชนิดมากเกินไป ทำให้ยับยั้งการเจริญของแคลลัสข้าวได้ ดังนั้นปริมาณการใช้เนื้อมะเขือเทศที่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวคือ 150 กรัมต่อลิตร

การใช้น้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ พบว่า เมื่อใช้ร่วมกันอย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีกว่าการใช้ร่วมกันอย่างละ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งการใช้ในปริมาณที่มากนี้ อาจมีผลยับยั้งการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากการใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีอยู่แล้ว เมื่อใช้น้ำสกัดมันฝรั่ร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัม ซึ่งมากกว่าปริมาณที่พอเหมาะจึงอาจยับยั้งการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อได้ แต่สำหรับการใช้น้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร เมื่อรวมกันจะมีปริมาณสารอินทรีย์เสริมทั้งหมด 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงปริมาณที่พอเหมาะ ในการชักนำแคลลัสข้าวได้

ดังนั้นสารอินทรีย์เสริมที่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าว กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่คือ น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร ร่วมกับปุ๋ยปลา 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตร

<u>ผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่</u>

งานวิจัยนี้ได้อิงผลการทดลองของสุภาพร วัฒนวีรเดช (2531) ที่รายงานว่า ชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมกับการชักนำแคลลัสข้าวสายพันธุ์ กข.23 ให้เกิดต้นใหม่ คือ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารอนินทรีย์ดัดแปลงของ White (1963) ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และธาตุอาหารรองของ MS (1962) โดยให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อสูงถึง 30 % อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยนี้พบว่า NAA ที่ความเข้มข้น 0.4-1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ที่ความเข้มข้น 0.8-3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกันในสูตรอาหาร MN_6 ที่ใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร โดยให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสสูงเพียง 8.4 % เท่านั้น (ตารางที่ 4) ทั้งนี้อาจเนื่องจากองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ของสูตรอาหารพื้นฐานต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ 2,4-D ไม่ว่าความเข้มข้นใดๆ ตั้งแต่ 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.6-3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) ไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ เนื่องจากให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่อีก จึงอาจมีผลทำให้เนื้อเยื่อมีปริมาณของ 2,4-D มากยิ่งขึ้น และมีผลต่อเนื่องในการยับยั้งการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่จากแคลลัสได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Shane, HuaPing and Calvin (1993) ที่รายงานว่าการเติม 2,4-D มีผลทำให้การชักนำแคลลัสจากอับละอองเรณูของข้าวสาลีให้เกิดเป็นต้นใหม่ลดลง

ดังนั้นออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ คือ NAA และ BAP

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 ที่ศึกษาความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ

BAP พบว่าให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อไม่มากนักคือ 8.4 % และเชื่อว่าความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP ที่เหมาะสมเป็นองค์ประกอบสำคัญในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ จึงศึกษาอัตราส่วนระหว่าง NAA กับ BAP คือ 0.4 : 0.8, 0.8 : 0.8, 0.4 : 1.6 และ 0.8 : 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับการใช้สารอินทรีย์เสริม ดังผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารที่ใช้น้ำสกัดมันฝรั่งหรือเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร ให้เบอร์เซนต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อเพิ่มขึ้นเป็น 28.6 % และ 35.7 % ตามลำดับ ต่อมามีความสนใจว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP เป็น 4 เท่าคือ NAA 0.8, 3.2 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6, 6.4 และ 25.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อเพิ่มขึ้นตามหรือไม่ จากผลการทดลองในตารางที่ 11, 12 และ 13 ที่ใช้สารอินทรีย์เสริมต่างกันคือ น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร เนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อดีที่สุดในสูตรอาหารที่มี NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองเดิม จึงทำการทดลองใหม่โดยใช้ NAA และ BAP ที่ความเข้มข้นเดิมคือ 0.8 และ 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ร่วมกับสารอินทรีย์เสริมเดิมคือ น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบร่วมกับการเติมปุ๋ยปลา 2.0 และ 4.0 มิลลิลิตรต่อลิตร จากผลการทดลองในตารางที่ 14 พบว่าจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อสูงถึง 26.2-35.7 % และ 26.2-38.1 % เมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 3 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยเฉพาะในสูตรอาหารที่ใช้เนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร ร่วมกับปุ๋ยปลา 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตร ให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อสูงสุด 42.9 % เมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองในตารางที่ 7 และ 14 ให้ผลสอดคล้องกับ Vajrabhaya and Vajrabhaya (1990) ที่รายงานว่า NAA ความเข้มข้น 0.5 -1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อของข้าว กข.23 ดีที่สุด Chowdhury et al., (1992) ที่รายงานว่าการใช้ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารพื้นฐานสูตร LS เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าวกลุ่ม indica พันธุ์ CSRI, Basmathi 370 และ IR 36 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ และ Su, Marjorie, and Hodges (1992) ที่รายงานการทดลองการชักนำแคลลัสข้าวจากโปรโต-พลาสต์ของข้าว japonica พันธุ์ Nortai-7 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้มากที่สุด เมื่อใช้ NAA 0.5

มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าว กข.23 คือ NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6-6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP ที่มีต่อการชักนำแคลลัสที่มี greenspot ให้เกิดหน่อในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 2

จากผลการศึกษาการชักนำแคลลัสที่มี greenspot จากสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 1 คือ สูตร B ที่เติม NAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ให้เกิดเป็นต้นใหม่ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 2 คือ สูตร B ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ที่มี NAA และ BAP ความเข้มข้นต่างกัน พบว่า NAA ความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีที่สุดโดยให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อเพียง 14.3 % (ตารางที่ 9) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้สูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 1 เพียงสูตรเดียวเมื่อเปรียบเทียบจากผลการทดลองในตารางที่ 4

ดังนั้นเพื่อเป็นการลดขั้นตอนการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ จึงใช้สูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ เพื่อพัฒนาแคลลัสให้เกิด greenspot และหน่อในอาหารเพียงสูตรเดียวเท่านั้น

ผลของภาชนะที่เลี้ยงแคลลัสต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ

จากการทดลองเปรียบเทียบการใช้ภาชนะที่เลี้ยงแคลลัสระหว่างขวดแก้วกลมขนาด 40 x 75 มิลลิเมตร พร้อมผาพลาสติกสีขาวแบบเกลียวปิดไม่แน่น กับ Petri dish ที่ปิดด้วย parafilm ด้วยความหนา 3 ชั้น พบว่า การใช้ Petri dish ที่ปิดด้วย Parafilm เลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่งหรือเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อไม่แตกต่างกัน แม้ว่าการใช้ Petri dish ทำให้มีจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot มากกว่าก็ตาม (ตารางที่ 8) การใช้ Petri dish เลี้ยงแคลลัสข้าวนั้น Adkins, Shiraishi, and McComb (1990) พบว่าในขณะที่แคลลัสใช้ก๊าซ

ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเอทธีลีน ซึ่งถ้ามีปริมาณก๊าซเอทธีลีนสูง จะมีผลทำให้แคลลัสข้าวมีการเจริญช้าและกลายเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ซึ่งการใช้ขวดแก้วกลมมีปริมาตรของอากาศภายในมากกว่า Petri dish ผลของอันตรายเนื่องจากก๊าซเอทธีลีนน่าจะน้อยกว่า แต่จากผลการทดลองพบว่า การใช้ Petri dish หรือขวดแก้วกลม ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสไม่แตกต่างกัน

ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือกใช้ Petri dish เนื่องจาก ประหยัดเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อและทำความสะอาดภาชนะ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ Petri dish ที่ปิดด้วย parafilm ช่วยลดปัญหาเรื่องตัวไรที่ไต่เข้าไปตามผาเกลียวของขวดแก้วกลม ซึ่งพาเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปทำให้เกิดการบนเปื้อนได้ง่ายกว่ามากและยังคงรักษาความชื้นในภาชนะได้สูง ทำให้ความดันออสโมติกในวุ้นอาหารคงที่ด้วย (Chu and Hill, 1988)

<u>ผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างสารทำให้อาหารแข็งตัวกับน้ำตาลซูโครสที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่</u>

ตลอดงานวิจัยนี้ใช้วุ้นผง 16 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 16 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ซึ่งอิงผลการทดลองของ Vajrabhaya and Vajrabhaya (1990) พบว่าให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อสูงสุดถึง 42.9 % (ตารางที่ 14) ซึ่งการใช้วุ้นผง ความเข้มข้น 16.0 กรัมต่อลิตร นี้ทำให้วุ้นอาหารแข็งมาก มีผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีที่สุด นอกจากนี้ Kavi kishor (1987) รายงานว่าการใช้วุ้นผงความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้วุ้นอาหารแข็งเกินไปมีผลยับยั้งการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ แม้ว่า Bornman and Vogelmann (1984) รายงานว่าการใช้วุ้นผงที่ความเข้มข้น 2.5-10 กรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการชักนำตายอดของ *Picca abies* (สนนอร์เวย์) และ Ghashghaie, Brenckmann, and Saugier (1991) รายงานว่าการใช้วุ้นผงความเข้มข้นปานกลาง คือ 7.5 กรัมต่อลิตร เหมาะต่อการชักนำตายอดของกุหลาบก็ตาม สำหรับการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดต้นใหม่นั้นต้องการวุ้นผงที่ความเข้มข้นสูงคือ 16 กรัมต่อลิตร ซึ่ง Lai and Liu (1988) พบว่าความสามารถของเซลล์หรือแคลลัสข้าวในการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ขึ้นอยู่กับสภาวะของน้ำในวุ้นอาหาร ซึ่งสามารถชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ TN5 ได้เพิ่มขึ้นเมื่อใช้วุ้นผงความเข้มข้น 12-16 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการใช้วุ้นผงที่ความเข้มข้นนี้ ทำให้อาหารแข็งเซลล์อาจถูกจำกัดการดูดน้ำไปใช้ทำให้ลักษณะของแคลลัส

แห้งและมีการเกาะกันแน่น และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ดียิ่งขึ้น สำหรับการใช้น้ำตาลซูโครสร่วมกับวุ้นผง จากงานวิจัยนี้พบว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 16 กรัมต่อลิตร เหมาะต่อการใช้ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ของข้าว สำหรับการศึกษาความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง gelrite แทนวุ้นผงกับน้ำตาลซูโครสพบว่า gelrite ที่ความเข้มข้น 5.6 กรัมต่อลิตร เท่านั้นที่ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีที่สุด (ตารางที่ 15) โดยปกติ gelrite ใช้ประมาณ 1/4 เท่าของวุ้นผง (Bornman and Vogelmann, 1984) ซึ่ง gelrite 5.6 กรัมต่อลิตร นี้เมื่อเทียบกับวุ้นผง 16 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการทำให้อาหารแข็งตัวใกล้เคียงกัน คือใช้ประมาณ 1/3 ซึ่งเป็นผลสนับสนุนให้เห็นว่า แคลลัสข้าวต้องการสภาพแวดล้อมที่ถูกจำกัดในการใช้น้ำ เพื่อให้เกิดภาวะเครียดขึ้น แต่จากผลการทดลองนี้การใช้ gelrite ให้ผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อดีเช่นกัน แม้ว่า Koetje et al. (1989) จะรายงานว่าการใช้ gelrite ในสูตรอาหาร N_6 จะให้ผลต่อการชักนำแคลลัสข้าวจากเอมบริโอที่ยังไม่เจริญเติมที่ของข้าวพันธุ์ IR54 ดีกว่าการใช้วุ้นผงในสูตรอาหารเดียวกัน แต่สำหรับการชักนำแคลลัสข้าว กข.23 นั้นพบว่า สามารถใช้ได้ทั้งวุ้นผงและ gelrite แต่เป็นที่น่าสนใจว่า gelrite นี้อัตราการใช้น้อยกว่าวุ้นผง ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายต่อลิตร นอกจากนี้ Williams and Taji (1991) ยังรายงานว่า การใช้ gelrite ที่มีความเข้มข้นสูง ช่วยลดปัญหาขององค์ประกอบภายในเซลล์ที่ผิดปกติ เช่น tissue hypertrophy intercellular space เพิ่มขึ้น การสังเคราะห์ลิกนินลดลง และปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลง เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นของ BAP สูงเพื่อการชักนำให้เกิดต้นของ *Olearia microdisca* สำหรับการใช้น้ำตาลซูโครสร่วมกับ gelrite จากผลการทดลองพบว่า การใช้น้ำตาล 16 กรัมต่อลิตรเหมาะต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้เช่นเดียวกับการใช้ร่วมกับวุ้นผง เมื่อในอาหารนั้นเติมเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร การใช้แป้งข้าวโพด Henderson and Kinnersley (1988) รายงานว่าการใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารทำให้อาหารแข็งตัว ทำให้น้ำหนักแห้งของแคลลัสยาสูบและแครอทป่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้แทนวุ้นผง แต่สิวลัย สุเภากิจ (2536) รายงานว่าแป้งข้าวโพดไม่เหมาะต่อการเลี้ยงต้นอ่อนขนาด 7-10 มิลลิเมตร ของกล้วยไม้สกุล Dendrobium เมื่อใช้แป้งข้าวโพดในการชักนำแคลลัสข้าว กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่พบว่า นอกจากจะทำให้จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อต่ำแล้ว ยังมีวิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยากเสียเวลามากและมีโอกาสเกิดการบนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายอีกด้วย จึงไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการทำให้อาหารแข็งตัว เพื่อชักนำแคลลัสข้าว กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่

ดังนั้นสารทำให้อาหารแข็งตัวที่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสข้าว กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่คือ วุ้นผง 16 กรัมต่อลิตร หรือ gelrite 5.6 กรัมต่อลิตร ใช้ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 16 กรัมต่อลิตร