บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS เพื่อชักนำให้คำฝอยเกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

3.1.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร EMS เพื่อชักนำให้คำฝอยเกิดการกลายพันธุ์

3.1.1.1 การใช้สารละลาย EMS ในช่วงความเข้มข้น 1.0-5.0%

จากการนำใบเลี้ยงคำฝอยมาให้สาร EMS ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0% ซึ่งเตรียมอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร EMS ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่ได้รับสาร EMS มีแนวโน้มเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อมากขึ้น เกิดแคลลัสลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร EMS สูงขึ้น และแคลลัสไม่พัฒนาไปเป็นยอด การใช้สาร EMS ความเข้มข้น 4.0% และ 5.0% ไม่ทำให้เกิดแคลลัส โดยใบเลี้ยงคำฝอยที่ไม่ให้สาร EMS (control) ไม่เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อและเกิดแคลลัสสูงที่สุด คือ 84.0% โดยแคลลัสเริ่มมีการพัฒนาไปเป็นยอดภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 14 วัน มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 11.90% ดังแสดงในตารางที่ 3.1 การเกิดแคลลัสเริ่มปรากฏภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-7 วัน โดยเกิดตรงบริเวณรอยตัดและขอบใบเลี้ยง เมื่อเลี้ยงในสภาพที่ไม่ให้แสงแคลลัสมีสีเหลืองจาง มีลักษณะเซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) ต่อมาหลังจากย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงแคลลัสมีสีเขียวเข้มขึ้น นอกจากนั้นพบว่า แคลลัสที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อที่มีความเสียหายตั้งแต่ระดับ 3 เป็นต้นไป คือ เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 40% ของพื้นที่ใบเลี้ยงจะมีขนาดเล็กลง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานแคลลัสไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดและตายในที่สุด

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ ร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ภายหลังการให้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 1.0-5.0% ซึ่งเตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่เติม DMSO 4.0% เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

ร้อยละความเข้มข้นของสาร EMS[1] (%)	ค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ[2]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
control (ไม่ใช้สาร EMS)	0.00 a[3]	84.00	11.90
1.0	1.22 b	72.00	0.00
2.0	1.30 b	56.00	0.00
3.0	1.70 c	12.00	0.00
4.0	4.78 d	0.00	0.00
5.0	4.96 d	0.00	0.00

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 50 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อคิดเป็นร้อยละการเกิดสีน้ำตาลของพื้นที่ใบเลี้ยง

ระดับ 0 ไม่เกิดสีน้ำตาลบนใบเลี้ยง

ระดับ 1 เกิดสีน้ำตาลไม่เกิน 20% ของพื้นที่ใบเลี้ยง

ระดับ 2 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 20% แต่ไม่เกิน 40% ของพื้นที่ใบเลี้ยง

ระดับ 3 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 40% แต่ไม่เกิน 60% ของพื้นที่ใบเลี้ยง

ระดับ 4 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 60% แต่ไม่เกิน 80% ของพื้นที่ใบเลี้ยง

ระดับ 5 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 80% ของพื้นที่ใบเลี้ยง

[3] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.1.1.2 การใช้สารละลาย EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0%

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.1.1.1 แสดงให้เห็นว่า การใช้สาร EMS ความเข้มข้นระหว่าง 1.0-5.0% ก่อให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อค่อนข้างสูง และทำให้แคลลัสไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ จึงทำการลดระดับความเข้มข้นของสาร EMS ลงมาอยู่ในช่วง 0.2-1.0% เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร EMS ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้การเตรียมสารละลาย EMS ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และการเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียมสารละลาย EMS ที่เหมาะสม พบว่าค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการให้สาร EMS ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อมากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของสาร EMS สูงขึ้น การเตรียมสารละลาย EMS ในอาหารเหลวเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงกว่าการเตรียมสารละลาย EMS ในบัฟเฟอร์ เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน การใช้สาร EMS ความเข้มข้น 1.0% ซึ่งเตรียมในอาหารเหลวเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงที่สุด คือ มีค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อเท่ากับ 2.40 โดยใบเลี้ยงที่ไม่ได้รับสาร EMS (control) ของทั้งสองวิธีการไม่เกิดความเสียหาย ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ต่อมาเมื่อเนื้อเยื่อที่เกิดความเสียหายเจริญไปเป็นแคลลัส พบว่า การใช้สารละลาย EMS ทุกระดับความเข้มข้นที่เตรียมในอาหารเหลวเกิดแคลลัสได้มาก คือ มีร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 94.0-100% ส่วนการเตรียมสารละลาย EMS ในบัฟเฟอร์มีร้อยละการเกิดแคลลัสน้อยกว่า คือ 70.0-86.0% โดยมีแนวโน้มเกิดแคลลัสลดลงตามระดับความเข้มข้นของสาร EMS ที่สูงขึ้น การพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสให้ผลเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการเกิดแคลลัส กล่าวคือ เมื่อใช้สาร EMS ความเข้มข้นสูงขึ้นแคลลัสจะมีการพัฒนาไปเป็นยอดน้อยลง ซึ่งการเตรียมสารละลาย EMS ในอาหารเหลวเกิดยอดสูงกว่าการเตรียมสารละลาย EMS ในบัฟเฟอร์เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (ตารางที่ 3.2) จากผลที่ได้ เลือกใช้วิธีการเตรียมสารละลาย EMS ในอาหารเหลวและใช้สาร EMS ความเข้มข้น 0.8% เนื่องจากเป็นวิธีการและเป็นระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูง คือ มีค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อเท่ากับ 2.04 แต่ยังสามารถเกิดแคลลัสได้มาก และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดใกล้เคียงกับการใช้สาร EMS ที่ 0.4% คือ มีร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสเท่ากับ 98.0% และ 14.30% ตามลำดับ การใช้สาร EMS ความเข้มข้น 1.0% แม้ว่าจะเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงที่สุด แต่ทำให้การพัฒนาไปเป็นยอด

ของแคลลัสลดลงเป็นอย่างมาก คือ 0% และ 4.25% เมื่อเตรียมสารละลาย EMS ในบัฟเฟอร์และอาหารเหลว ตามลำดับ จึงไม่เลือกใช้สาร EMS ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว

ตารางที่ 3.2 แสดงค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ ร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ภายหลังการให้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2-1.0% ซึ่งเตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์และอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม DMSO 4.0% เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

วิธีเตรียมสารละลาย EMS	ร้อยละความเข้มข้นของสาร EMS[1] (%)	ค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ[2]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	control (ไม่ใช้สาร EMS)	0.00 a[3]	86.00	13.95
	0.2	0.40 b	80.00	12.50
	0.4	0.44 b	78.00	10.26
	0.8	0.70 bc	76.00	7.89
	1.0	1.26 d	70.00	0.00
อาหารเหลวสูตร MS	control (ไม่ใช้สาร EMS)	0.00 a	100	20.00
	0.2	0.64 bc	100	16.00
	0.4	0.78 bc	98.00	14.30
	0.8	2.04 e	98.00	14.30
	1.0	2.40 f	94.00	4.25

(ต่อตารางที่ 3.2)

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 50 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อคิดเป็นร้อยละการเกิดสีน้ำตาลของพื้นที่ใบเลี้ยง เช่นเดียวกับตารางที่ 3.1

[3] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.1.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวพา DMSO

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.1.1 เลือกใช้วิธีการเตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เพื่อนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวพา คือ DMSO ในการใช้ร่วมกับสาร EMS โดยใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0% ปฏิบัติตามวิธีการในข้อ 2.5.1.1 พบว่า การใช้สาร DMSO ความเข้มข้นสูงขึ้นมีแนวโน้มเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อมากขึ้น โดยการใช้สาร DMSO ความเข้มข้น 4.0% ร่วมกับสาร EMS ทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงที่สุด คือ มีค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อเท่ากับ 2.12 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากระดับความเข้มข้นอื่น สำหรับการเกิดแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้รับสาร EMS และ DMSO ทุกระดับความเข้มข้นมีร้อยละการเกิดแคลลัสและร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสใกล้เคียงกัน คือ 96.0-98.0% และ 14.29-14.58% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 จากผลที่ได้เลือกใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4.0% ในการใช้ร่วมกับสาร EMS เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงที่สุด แต่ยังเกิดแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นยอดสูงใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ ร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ภายหลังการให้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม DMSO ความเข้มข้น 1.0-4.0% เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

ร้อยละความเข้มข้นของสาร DMSO[1] (%)	ค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ[2]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
control (ไม่ใช้สาร EMS)	0.00 a[3]	100	22.00
1.0	1.56 b	98.00	14.29
2.0	1.68 b	98.00	14.29
3.0	1.70 b	96.00	14.58
4.0	2.12 c	96.00	14.58

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 50 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อคิดเป็นร้อยละการเกิดสีน้ำตาลของพื้นที่ใบเลี้ยง เช่นเดียวกับตารางที่ 3.1

[3] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

I19019795

3.1.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการให้สาร EMS

จากผลที่ได้ในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 เลือกใช้วิธีการเตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และเติมสารตัวพา DMSO ความเข้มข้น 4.0% โดยใช้เวลาให้สาร EMS นาน 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหาระยะเวลาการให้สาร EMS ที่เหมาะสม ปฏิบัติตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อให้สาร EMS เป็นเวลานานมากขึ้นมีแนวโน้มเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงขึ้น ซึ่งการใช้เวลาให้สาร EMS นาน 4 ชั่วโมง เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูงที่สุด คือ มีค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อเท่ากับ 2.64 การเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อที่ได้รับสาร EMS เป็นระยะเวลานานต่าง ๆ กัน พบว่า มีร้อยละการเกิดแคลลัสใกล้เคียงกัน คือ 94.0-100% โดยมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยตามระยะเวลาการให้สาร EMS ที่นานขึ้น สำหรับการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส พบว่า การพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงเมื่อให้สาร EMS เป็นเวลานานขึ้น โดยการให้สาร EMS นาน 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เกิดยอดใกล้เคียงกัน คือ 16.33-20.0% ส่วนการให้สาร EMS เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง มีร้อยละการเกิดยอดน้อยมาก คือ 8.51% ดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากผลที่ได้ เลือกการใช้ระยะเวลาให้สาร EMS นาน 3 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ทำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นยอดได้พอสมควร คือ 16.33% และเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อสูง คือ มีค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อเท่ากับ 2.10

ตารางที่ 3.4 แสดงค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ ร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ภายหลังการให้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม DMSO 4.0% เป็นเวลานาน 1-4 ชั่วโมง

ระยะเวลาการให้สาร EMS[1] (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ[2]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
1	0.72 a[3]	100	20.00
2	1.06 a	100	18.00
3	2.10 b	98.00	16.33
4	2.64 c	94.00	8.51

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 50 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อคิดเป็นร้อยละการเกิดสีน้ำตาลของพื้นที่ใบเลี้ยง เช่นเดียวกับตารางที่ 3.1

[3] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.2 ความแปรปรวนของต้นคำฝอยที่ได้จากการชักนำด้วยสาร EMS ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

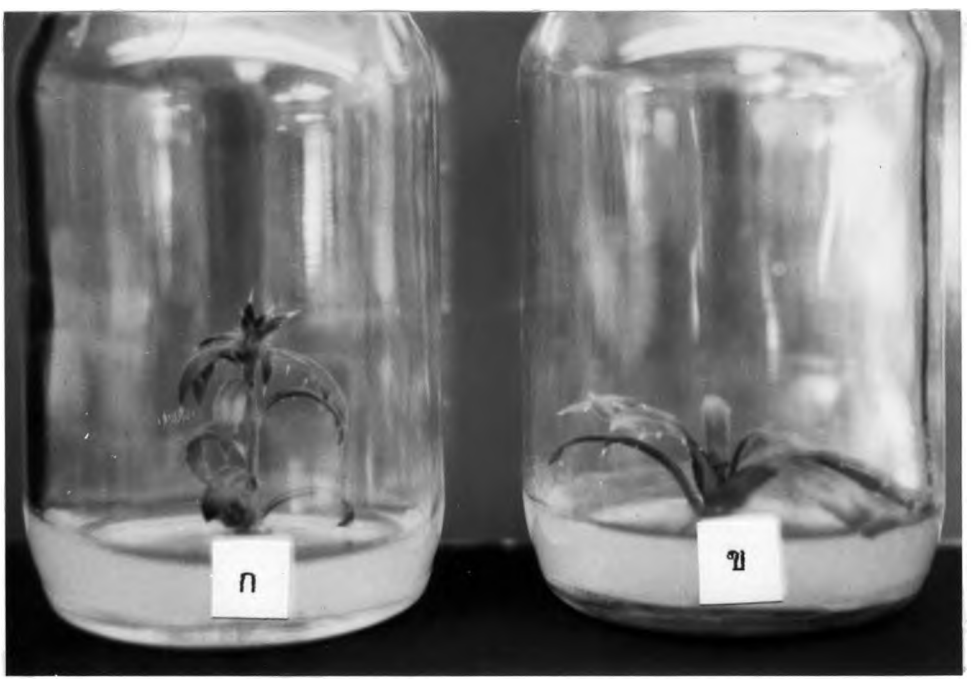
จากผลที่ได้ในข้อ 3.1.1.2 แสดงให้เห็นว่า การให้สาร EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0% ซึ่งเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นช่วงความเข้มข้นที่ยังทำให้ใบเลี้ยงสามารถเกิดแคลลัสได้สูง คือ 98.0-100% และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดได้พอสมควร คือ 4.25–16.0% (ตารางที่ 3.2) จึงนำยอดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่า ยอดที่ได้จากการให้สาร EMS ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวและยอดที่ไม่ผ่านการให้สาร EMS (control) ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ จึงสังเกตลักษณะต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยาของต้นภายใต้สภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังแสดงในตารางที่ 3.5 พบว่าลักษณะความสูงของต้นและอายุออกดอกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนขนาดใบและจำนวนหนามต่อใบไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงลักษณะที่แปรปรวนไปจากต้นปกติซึ่งมีลักษณะ คือ ลำต้นมีปล้องยาว ใบไม่อวบน้ำ รูปร่างใบรี และใบมีหนามยาวปานกลาง จะพบลักษณะที่แตกต่างจากลักษณะดังกล่าวข้างต้น ได้แก่ ลำต้นมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ รูปร่างใบกลมมน ใบมีหนามสั้นหรือหนามยาว (รูปที่ 3.1 และรูปที่ 3.2) โดยพบว่าความแปรปรวนส่วนใหญ่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร EMS ส่วนต้นที่ได้จาก control ซึ่งไม่ได้รับสาร EMS เกิดลักษณะที่แปรปรวนได้เช่นเดียวกัน แต่เกิดได้น้อยกว่าในระยะต่อมาภายหลังจากการนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดรากเป็นเวลาประมาณ 40-42 วัน ต้นคำฝอยจะเริ่มทยอยออกดอก ในระยะแรกดอกอ่อนมีสีเหลือง เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีแดงส้ม (รูปที่ 3.3)

ตารางที่ 3.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่พัฒนามาจากแคลลัสของใบเลี้ยงที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0.2-1.0%

ร้อยละความเข้มข้นสาร EMS[1] (%)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย													
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)								
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม		
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม
control (ไม่ใช้สาร EMS)	4.63 a[2]	7.78 a	17.38 a	17.76 a	41.83 a	20.00	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.33	13.33	26.66
0.2	4.18 a	7.56 a	17.56 a	17.17 a	41.63 a	16.67	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.67	8.33	25.00
0.4	4.11 a	7.77 a	17.33 a	16.70 a	41.40 a	33.33	44.44	0.00	0.00	0.00	0.00	22.22	22.22	44.44
0.8	4.19 a	7.67 a	17.41 a	16.85 a	41.60 a	33.33	44.44	11.11	11.11	0.00	22.22	33.33	11.11	44.44
1.0	2.83 b	6.89 a	16.56 a	16.11 a	ทุกต้นไม่ออกดอก	100	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	66.67	66.67

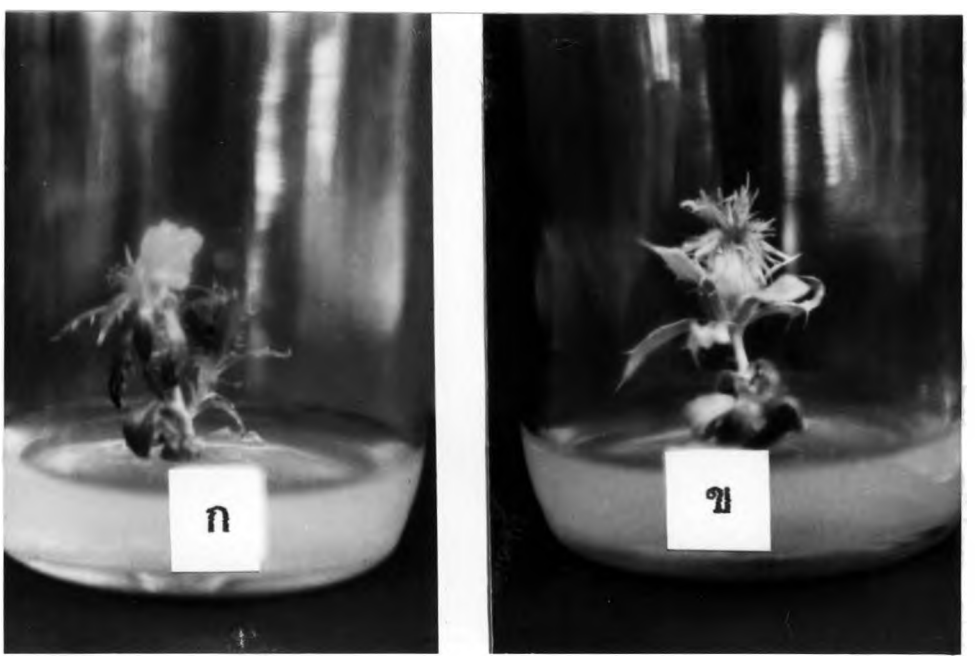
[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 50 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของลำต้นและการอวบน้ำของใบ ต้นปกติมีปล้องยาว ใบไม่อวบน้ำ (ก) และต้นที่เกิดความแปรปรวนมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ (ข)

รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะความยาวของหนามที่ใบ ใบปกติมีความยาวของหนามปานกลาง (ข) ใบที่เกิดความแปรปรวนมีหนามยาว (ก) หรือหนามสั้น (ค)



รูปที่ 3.3 แสดงการออกดอกของคำฝอย ดอกอ่อนมีสีเหลือง (ก) ต่อมาเมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีแดงส้ม (ข)

3.3 ความแปรปรวนของต้นคำฝอยที่ได้จากการศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3.1 ชนิดของชิ้นส่วนพืช

เมื่อใช้ชิ้นส่วนพืชต่างชนิดกันเป็นแหล่งเนื้อเยื่อ คือ ใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสเริ่มเจริญขึ้นมาบนใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยงภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-7 วัน และ 12-14 วัน ตามลำดับ โดยใบเลี้ยงเกิดแคลลัสสูงกว่าลำต้นใต้ใบเลี้ยง (ตารางที่ 3.6) แคลลัสของใบเลี้ยงเกิดขึ้นตรงบริเวณรอยตัดและขอบใบ มีสีเขียวจาง ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.4) ต่อมาภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 10 วัน แคลลัสของใบเลี้ยงเริ่มมีการพัฒนาไปเป็นยอด (รูปที่ 3.5) ส่วนแคลลัสของลำต้นใต้ใบเลี้ยงเกิดตรงบริเวณรอยดัดทั้งสองข้าง มีลักษณะใกล้เคียงกับแคลลัสของใบเลี้ยง แต่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า คือ ประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร และฟูมชื้นมากกว่า (รูปที่ 3.4) ซึ่งพบว่า แคลลัสของใบเลี้ยงมีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดสูง คือ 30.0% ส่วนแคลลัสของลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดน้อยมาก คือ 3.85% ดังแสดงในตารางที่ 3.6 ต่อมาภายหลังจากแยกยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก และลังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แสดงผลไว้ในตารางที่ 3.7 พบว่า ต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสของใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีความแตกต่างกันในด้านความสูง ขนาดใบ จำนวนหนามต่อใบ และอายุออกดอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ลักษณะที่แปรปรวนออกไปจากต้นปกติส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสของลำต้นใต้ใบเลี้ยงซึ่งมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ได้แก่ ลำต้นมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ และใบมีหนามสั้น แต่ไม่มีความแปรปรวนของรูปร่างใบ ส่วนต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสของใบเลี้ยงมีความแปรปรวนของลักษณะดังกล่าวเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 3.6 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชต่างชนิดกันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชิ้นส่วนพืช[1]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
ใบเลี้ยง	100	30.0
ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	86.67	3.85

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

รูปที่ 3.4 แสดงลักษณะแคลลัสของใบเลี้ยงและแคลลัสของลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 3.5 แสดงการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชต่างชนิดกันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชิ้นส่วนพืช[1]	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย														
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)									
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม			
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม	
ใบเลี้ยง	4.65 a[2]	7.55 a	17.39 a	17.42 a	41.88	18.18	18.18	9.09	0.00	0.00	9.09	9.09	9.09	18.18	
ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	1.80 b	4.00 b	12.33 b	9.67 b	ไม่ออกดอก	100	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100	100	

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3.2 อายุของชิ้นส่วนพืช

จากการนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงของต้นกล้าอายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2.7.2 พบว่า ใบเลี้ยงทุกกลุ่มมีร้อยละการเกิดแคลลัสสูง คือ 100% ส่วนการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสจะสูงที่สุดเมื่อใช้ใบเลี้ยงอายุ 2 สัปดาห์ คือ มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 33.33% รองลงมาคือ การใช้ใบเลี้ยงอายุ 1, 3 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งมีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 23.33%, 13.33% และ 10.0% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.8 ต่อมาภายหลังจากแยกยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น แสดงผลไว้ในตารางที่ 3.9 พบว่า ต้นคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุต่าง ๆ มีค่าเฉลี่ยของความสูงและอายุออกดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีค่าเฉลี่ยของขนาดใบและจำนวนหนามต่อใบไม่แตกต่างกัน ในด้านความแปรปรวนของลักษณะต้นที่แตกต่างไปจากต้นปกติ พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามอายุของใบเลี้ยง กล่าวคือ ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุ 4 สัปดาห์ มีความแปรปรวนสูงกว่าต้นกลุ่มอื่น ซึ่งพบลักษณะของต้นที่มีความแปรปรวนไป ได้แก่ ลำต้นมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ รูปร่างใบบิดเบี้ยว ใบมีหนามสั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานจะไม่ออกดอกและตายในที่สุด (รูปที่ 3.6)

ตารางที่ 3.8 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัส และการร้อยละพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุ 1-4 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อายุใบเลี้ยง[1] (สัปดาห์)	ร้อยละ การเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนา ไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
1	100	23.33
2	100	33.33
3	100	13.33
4	100	10.00

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

รูปที่ 3.6 แสดงลักษณะต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งเกิดความแปรปรวน คือ ลำต้นมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ รูปร่างใบบิดเบี้ยว ใบมีหนามสั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานจะไม่ออกดอกและเหลืองตาย

ตารางที่ 3.9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุ 1-4 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อายุใบเลี้ยง[1] (สัปดาห์)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย														
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)									
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม			
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม	
1	4.61 a[2]	7.63 a	17.62 a	17.58 a	42.00 a	12.50	12.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50	12.50	
2	4.63 a	7.75 a	17.55 a	17.50 a	41.89 a	16.67	16.67	0.00	0.00	0.00	0.00	8.33	8.33	16.66	
3	4.50 a	7.22 a	17.56 a	17.56 a	41.50 a	33.33	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	33.33	33.33	
4	2.20 b	7.25 a	17.83 a	17.67 a	ทุกต้นไม่ออกดอก	100	100	25.00	0.00	0.00	25.00	0.00	25.00	25.00	

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ พบว่า ใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 มีร้อยละการเกิดแคลลัสสูงที่สุด คือ 100% รองลงมา คือ สูตร SH และ LS ซึ่งมีร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 90.0% และ 86.67% ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสจะสูงที่สุดเมื่อใช้อาหารสูตร MS คือ มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 33.33% รองลงมา คือ สูตร SH, LS และ B5 ซึ่งมีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 25.93%, 15.38% และ 13.33% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.10 ต่อมาภายหลังจากแยกต้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดราก และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น แสดงผลไว้ดังตารางที่ 3.11 พบว่า ต้นที่พัฒนามากจากการใช้อาหารแต่ละสูตรมีค่าเฉลี่ยของความสูง ขนาดใบ จำนวนหนามต่อใบ และอายุออกดอก ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนทางด้านลักษณะต้นที่มีความแปรปรวนที่แตกต่างไปจากต้นปกติ พบว่า ลักษณะต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ มีความแปรปรวนน้อยและมีค่าใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่

ตารางที่ 3.10 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร[1]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)
MS	100	33.33
LS	86.67	15.38
SH	90.00	25.93
B5	100	13.33

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ตารางที่ 3.11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร[1]	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย														
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)								
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม		
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม
MS	4.61 a[2]	7.51 a	17.56 a	17.36 a	41.78 a	23.08	23.08	7.69	0.00	0.00	7.69	7.70	15.38	23.08
LS	4.60 a	7.27 a	17.53 a	17.66 a	42.00 a	20.00	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	20.00
SH	4.62 a	7.37 a	17.41 a	17.37 a	42.00 a	11.11	22.22	11.11	0.00	0.00	11.11	11.11	22.22	33.33
B5	4.66 a	7.33 a	17.20 a	17.66 a	41.80 a	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	20.00

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3.4 ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต

3.3.4.1 การใช้ BA ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ

จากการทดลองในข้อ 2.7.4.1 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ทำให้เกิดแคลลัสสูงใกล้เคียงกัน คือ มีร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 93.33-100% ซึ่งพบว่าแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดสูงที่สุดเมื่อใช้ BA ร่วมกับ NAA คือ มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 26.67% รองลงมา คือ การใช้ร่วมกับ IAA และ IBA ตามลำดับ มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 21.40% และ 17.24% ตามลำดับ ส่วนการใช้ร่วมกับ 2,4-D ไม่เกิดยอด ดังแสดงในตารางที่ 3.12 ต่อมาภายหลังจากแยกยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย แสดงผลไว้ในตารางที่ 3.13 พบว่า ต้นที่ได้จากการใช้ BA ร่วมกับออกซินแต่ละชนิดมีค่าเฉลี่ยของความสูง ขนาดของใบ จำนวนหนามต่อใบ และอายุออกดอก ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในด้านลักษณะของต้นที่แปรปรวนไปจากต้นปกติ พบว่าการใช้ BA ร่วมกับ IAA เกิดต้นที่มีความแปรปรวนสูงกว่าการใช้ BA ร่วมกับออกซินชนิดอื่น โดยมีลักษณะที่แปรปรวน ได้แก่ ลักษณะลำต้นมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ ใบมีหนามยาวหรือหนามสั้น ยกเว้นรูปร่างใบไม่มีความแปรปรวน

ตารางที่ 3.12 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัส ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส และลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ออกซิน[1]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)	ลักษณะแคลลัส
NAA	100	26.67	ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียว เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
IAA	93.33	21.40	ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียวจาง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
IBA	96.67	17.24	ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียวจาง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
2,4-D	96.67	0.00	ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร มีสีขาวแกมเหลือง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ และแน่นหนาในกลุ่มเดียวกัน

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ตารางที่ 3.13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ออกซิน[1]	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย														
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)								
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม		
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม
NAA	4.65 a[2]	7.33 a	17.51 a	17.27 a	41.75 a	18.18	18.18	0.00	9.09	0.00	9.09	9.09	9.09	18.18
IAA	4.24 a	7.38 a	17.67 a	17.38 a	42.00 a	28.57	42.86	0.00	0.00	0.00	0.00	14.29	28.57	42.86
IBA	4.55 a	7.33 a	17.39 a	17.55 a	42.00 a	16.67	16.67	0.00	16.67	0.00	16.67	0.00	16.67	16.67

หมายเหตุ การใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA ไม่เกิดต้น

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3.4.2 การใช้ Kinetin ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ

จากการปฏิบัติตามวิธีการในข้อ 2.7.4.2 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ Kinetin ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ทำให้เกิดแคลลัสสูงใกล้เคียงกัน คือ มีร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 93.33-100% ซึ่งพบว่าการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสที่ได้จากการใช้ Kinetin ร่วมกับ NAA หรือ IAA สูงใกล้เคียงกัน คือ มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 10.34% และ 10.71% ตามลำดับ รองลงมา คือ การใช้ร่วมกับ IBA มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 6.90% ส่วนการใช้ร่วมกับ 2,4-D ไม่เกิดยอด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.14 ต่อมาหลังจากแยกยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น แสดงผลไว้ดังตารางที่ 3.15 พบว่า ต้นที่ได้จากการใช้ Kinetin ร่วมกับออกซินแต่ละชนิดมีค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นจำนวนหนามต่อใบ ในด้านลักษณะของต้นที่แปรปรวนไปจากต้นปกติ พบว่า ต้นที่ได้จากการใช้ Kinetin ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ มีความแปรปรวนสูง ลักษณะของต้นที่มีความแปรปรวน ได้แก่ ลำต้นมีปล้องสั้น ใบอวบน้ำ ใบมีหนามสั้น รูปร่างใบบิดเบี้ยว

ตารางที่ 3.14 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัส ร้อยละการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัส และลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ออกซิน[1]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)	ลักษณะแคลลัส
NAA	96.67	10.34	ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียวจาง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
IAA	93.33	10.71	ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร มีสีเขียวแกมเหลือง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
IBA	96.67	6.90	ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร มีสีเขียวแกมเหลือง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
2,4-D	100	0.00	ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร มีสีขาวแกมเหลือง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ตารางที่ 3.15 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ออกซิน[1]	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย													
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)								
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม		
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม
NAA	2.70 a[2]	5.75 a	15.50 a	13.84 a	ทุกต้นไม่ออกดอก	100	100	25.00	0.00	0.00	25.00	0.00	100	100
IAA	2.84 a	5.33 a	16.20 a	14.47 a	ทุกต้นไม่ออกดอก	100	100	40.00	0.00	0.00	40.00	0.00	100	100
IBA	2.57 a	6.44 a	17.34 a	18.33 b	ทุกต้นไม่ออกดอก	100	100	33.33	0.00	0.00	33.33	0.00	100	100

หมายเหตุ การใช้ 2,4-D ร่วมกับ Kinetin ไม่เกิดต้น

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3.5 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากการปฏิบัติตามวิธีการในข้อ 2.7.5 โดยเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้น้ำตาลแต่ละชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนเกิดแคลลัสสูงใกล้เคียงกัน คือ มีร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 93.33-100% และพบว่าแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดมากที่สุดเมื่อเจริญบนอาหารที่มีซูโครส คือ มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 26.67% รองลงมา คือ แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่ใส่ฟรุกโทส มีร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดเท่ากับ 14.29% ส่วนการใช้อาหารที่ใส่ซอร์บิทอลไม่พบการเกิดยอด ดังแสดงในตารางที่ 3.16 ต่อมาภายหลังจากแยกยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย แสดงผลไว้ดังตารางที่ 3.17 พบว่าต้นที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสหรือฟรุกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นความสูงและอายุการออกดอก ส่วนในด้านลักษณะที่แปรปรวนไปจากต้นปกติ พบว่าต้นที่ได้จากการใช้ฟรุกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนมีความแปรปรวนสูง ซึ่งส่วนใหญ่มีปล้องสั้นและมีใบอวบน้ำ แต่ไม่มีความแปรปรวนของรูปร่างใบและความยาวหนาม

ตารางที่ 3.16 แสดงร้อยละการเกิดแคลลัส ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส และลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใส่น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน[1]	ร้อยละการเกิดแคลลัส (%)	ร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส (%)	ลักษณะแคลลัส
ซูโครส	100	26.67	ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียว เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
ฟรุกโทส	93.33	14.29	ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียว เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ
ซอร์บิทอล	96.67	0.00	ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร มีสีขาวแกมเหลือง เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ตารางที่ 3.17 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใส่น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน[1]	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคำฝอย														
	ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ขนาดใบเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		จำนวนหนามเฉลี่ยต่อใบ (หนาม)	อายุออกดอกเฉลี่ย (วัน)	ร้อยละความแปรปรวนไปจากต้นปกติ (%)									
		กว้าง	ยาว			ปล้องสั้น	ใบอวบน้ำ	รูปร่างใบ				ลักษณะหนาม			
								บิดเบี้ยว	กลมมน	เว้าแหว่ง	รวม	ยาว	สั้น	รวม	
ซูโครส	4.56 a[2]	7.40 a	17.53 a	17.33 a	41.63	20.00	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00	20.00	
ฟรุกโตส	2.83 b	7.05 a	17.78 a	17.00 a	ทุกต้นไม่ออกดอก	100	83.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

หมายเหตุ การใช้ซอร์บิทอลไม่เกิดต้น

[1] ใช้ตัวอย่างจำนวน 30 ซ้ำต่อกรรมวิธี

[2] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.4 การตรวจสอบและวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตน้ำมันและกรดไขมันในแคลลัสคำฝอย

3.4.1 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยผ่านการชักนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์

จากผลที่ได้ในข้อ 3.1 เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมของการชักนำให้คำฝอยเกิดการกลายพันธุ์ คือ การใช้สาร EMS ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และเติมสารตัวพา คือ DMSO 4.0% โดยแช่ใบเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส แล้วนำใบเลี้ยงที่ได้รับสาร EMS ไปเลี้ยงบนอาหารที่กล่าวไว้ในข้อ 2.8.1 จนเกิดแคลลัส เมื่อแคลลัสมีอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จึงนำมาหาน้ำหนักแห้ง สกัดน้ำมัน และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน ในการทดลองนี้สามารถสกัดน้ำมันได้จากแคลลัสที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อที่มีความเสียหายระดับ 1 และ 2 เท่านั้น ซึ่งไม่พบเนื้อเยื่อที่มีระดับความเสียหายเท่ากับ 0 เมื่อใช้สาร EMS โดยเนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่มีระดับความเสียหายสูงกว่านี้ไม่เกิดแคลลัสหรือเกิดแคลลัสที่มีขนาดเล็กมากไม่สามารถนำมาทดสอบได้ ส่วนเนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่ไม่ผ่านการใช้สาร EMS (control) ไม่เกิดความเสียหาย จากการหาน้ำหนักแห้งของแคลลัสและการสกัดน้ำมัน พบว่า น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำมันมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อและอายุของแคลลัส กล่าวคือ แคลลัสที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อที่มีความเสียหายระดับ 2 และมีอายุ 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำมันสูงที่สุด คือ 0.070 กรัม และ 2.06% ตามลำดับ โดยแคลลัสของเนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการใช้สาร EMS (control) มีน้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำมันต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบ ณ ระดับอายุของแคลลัสที่เท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 3.18 และรูปที่ 3.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอย แสดงผลไว้ในตารางที่ 3.18 พบว่า กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันมี 4 ชนิด คือ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดสเตียริก (C18:0), กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) โดยพบว่า แคลลัสที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ส่วนใหญ่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) สูงกว่า และมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18 0) ต่ำกว่าแคลลัสที่ไม่ผ่านการใช้สาร EMS (control) กรดไขมันที่มีปริมาณสูงที่สุดในน้ำมัน คือ กรดลิโนเลอิก (C18:2) พบมากที่สุดในแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งเจริญมากจากเนื้อเยื่อที่ผ่านการใช้สาร EMS และมีความเสียหายระดับ 1 มีปริมาณเท่ากับ 53.66% (รูปที่ 3.8) กรดไขมันที่พบในอันดับรองลงมา คือ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดสเตียริก (C18:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ตามลำดับ โดยกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18:0)

พบมากที่สุดในแคลลัสอายุ 4 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งเจริญมาจากเนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการใช้สาร EMS (control) คือ มีปริมาณเท่ากับ 19.14% และ 17.83% ตามลำดับ (รูปที่ 3.9 และรูปที่ 3.10 ตามลำดับ) สำหรับกรดโอเลอิก (C18:1) พบมากที่สุดในแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งเจริญมาจากเนื้อเยื่อที่ได้รับสาร EMS และมีความเสียหายระดับ 2 คือ มีปริมาณเท่ากับ 7.12% ส่วนแคลสัสอายุต่าง ๆ ที่ไม่ผ่านการใช้สาร EMS (control) มีปริมาณกรดไขมันชนิดนี้น้อยมาก คือ ไม่เกิน 1% (รูปที่ 3.11)

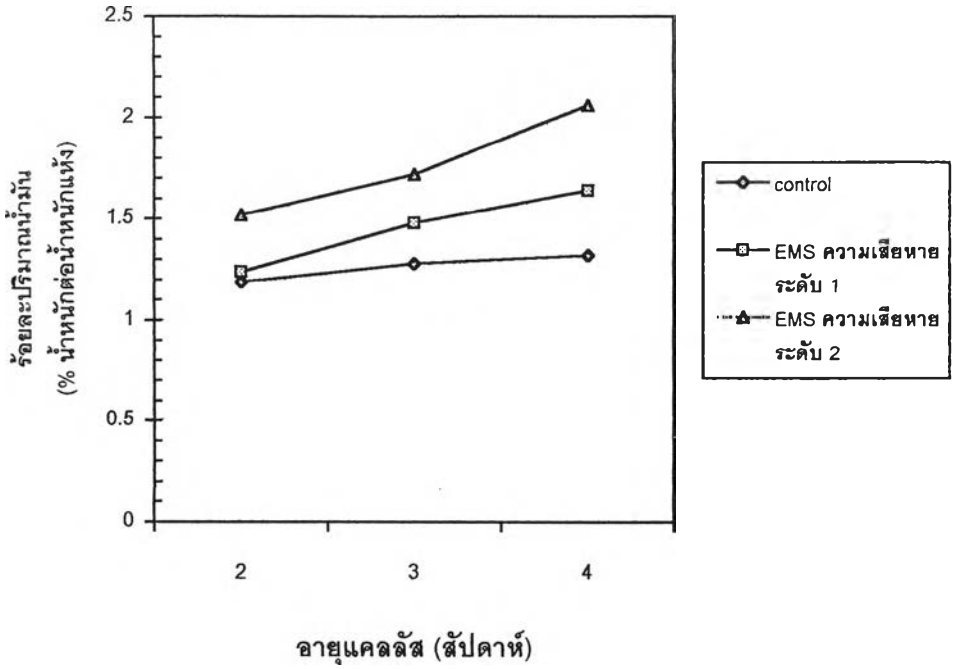
ตารางที่ 3.18 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัส ร้อยละปริมาณน้ำมัน และร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม

การใช้สาร EMS	อายุแคลลัส (สัปดาห์)	น้ำหนักแห้งแคลลัส[1] (กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)	ร้อยละปริมาณน้ำมัน[2] (% น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)	ร้อยละปริมาณกรดไขมัน[2] (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)			
				C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
control	2	0.054±0.003	1.19±0.04	12.00±0.23	12.07±0.26	tr[3]	32.70±0.66
(ไม่ใช้สาร	3	0.056±0.003	1.28±0.04	14.39±0.75	17.83±0.44	tr	36.56±1.40
EMS)	4	0.059+0.001	1.32±0.04	19.14±0.54	13.81±0.75	tr	42.07±1.22
ใช้สาร EMS	2	0.055±0.003	1.24±0.08	16.87±0.32	17.62±0.32	5.41±0.17	53.66±1.25
ความเสียหาย	3	0.059±0.002	1.48±0.04	13.99±0.72	11.24±0.76	4.17±0.44	44.08±1.27
ระดับ1	4	0.063±0.002	1.64±0.05	15.14±0.75	13.70±0.35	3.91±0.22	40.31±0.41
ใช้สาร EMS	2	0.056±0.003	1.52±0.04	12.33±0.45	9.74±0.10	3.42±0.12	36.62±0.67
ความเสียหาย	3	0.063±0.002	1.72±0.04	17.79±0.58	03.49±0.22	5.34±0.17	49.49±1.38
ระดับ 2	4	0.070±0.002	2.06±0.06	13.08±0.42	14.18±0.38	7.12±0.16	50.24±1.47

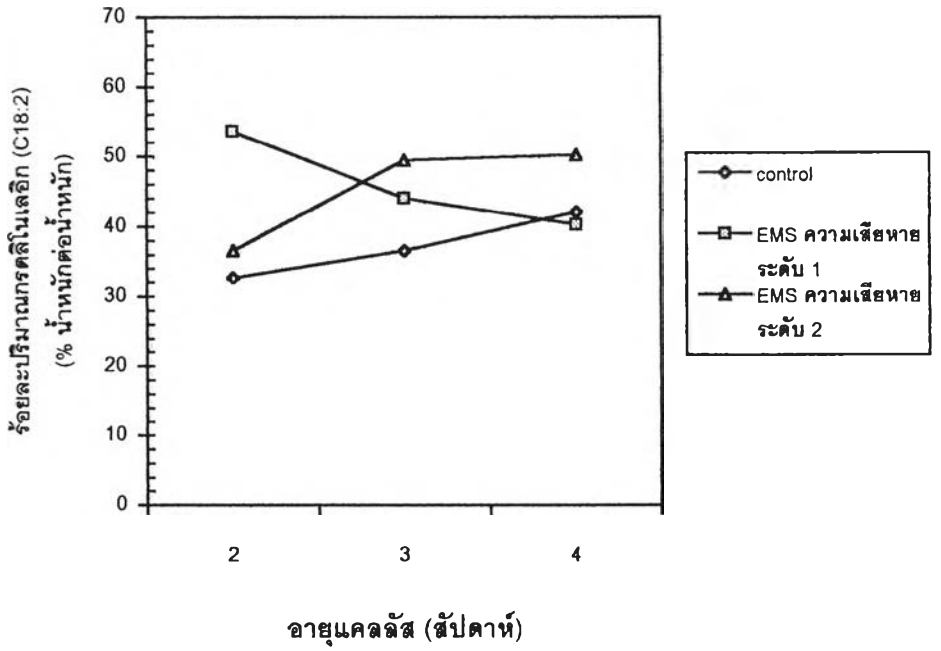
[1] ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SE) จาก 3 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SE) จาก 5 ซ้ำ

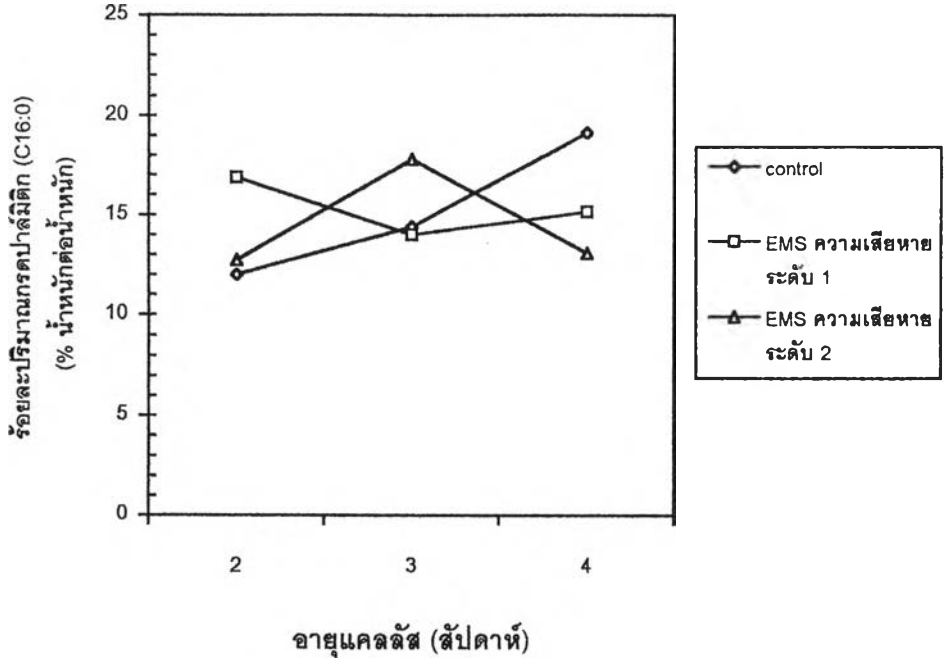
[3] tr หมายถึง trace (มีปริมาณน้อยกว่า 1.0% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)



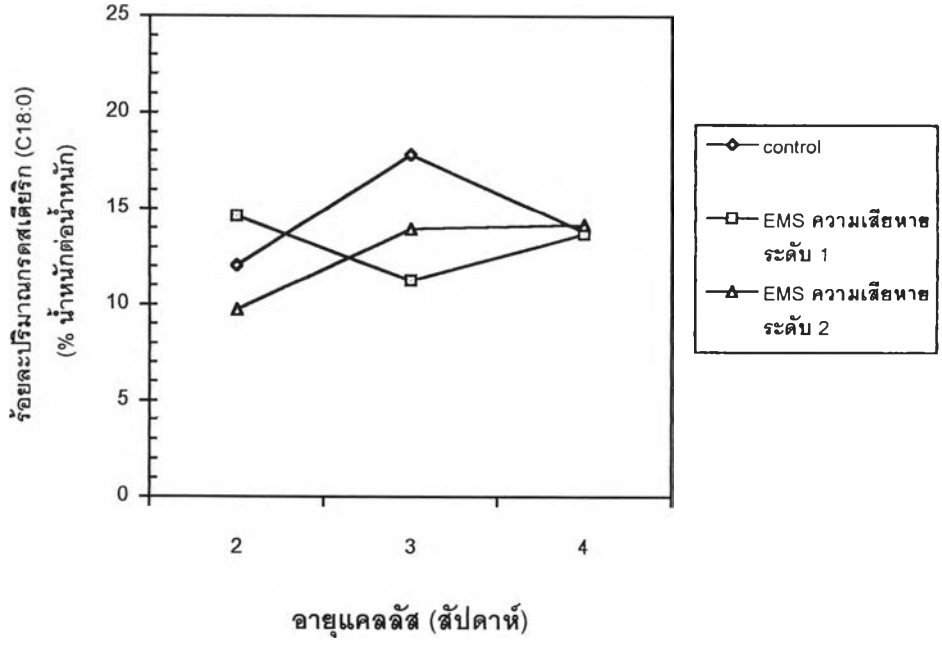
รูปที่ 3.7 แสดงร้อยละปริมาณน้ำมันในแคลลัสคำฝอยอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม



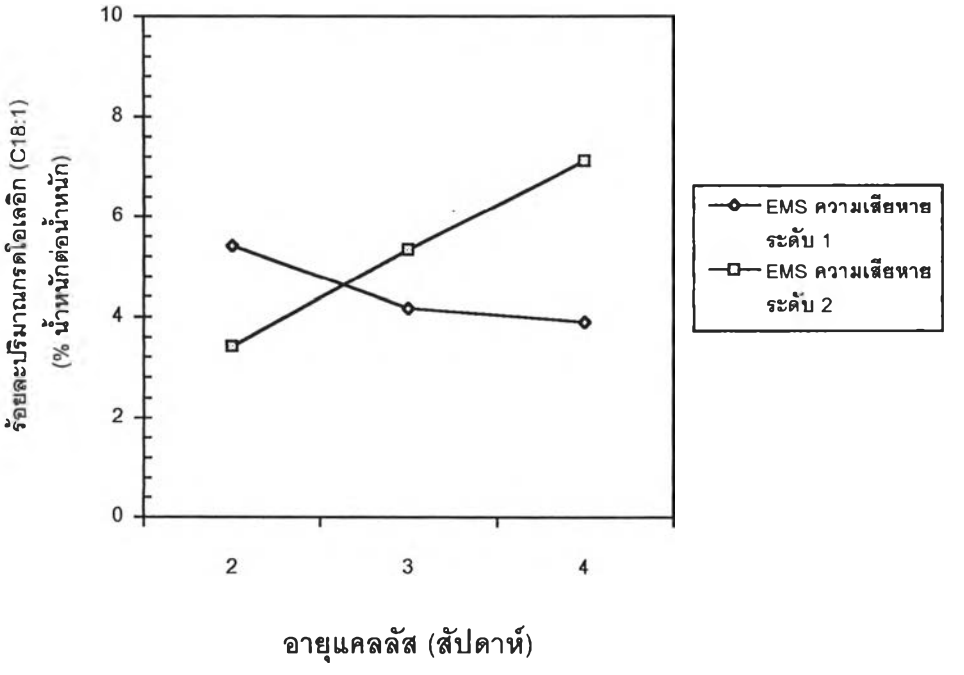
รูปที่ 3.8 แสดงร้อยละปริมาณกรดลิโนเลอิก (C18:2) ในแคลลัสคำฝอยอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ 3.9 แสดงร้อยละปริมาณกรดปาล์มิติก (C16:0) ในแคลลัสคำฝอยอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ 3.10 แสดงร้อยละปริมาณกรดสเตียริก (C18:0) ในแคลลัสคำฝอยอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ 3.11 แสดงร้อยละปริมาณกรดโอเลอิก (C18:1) ในแคลลัสคำฝอยอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม

3.4.2 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามปกติ

3.4.2.1 อายุของชิ้นส่วนพืช

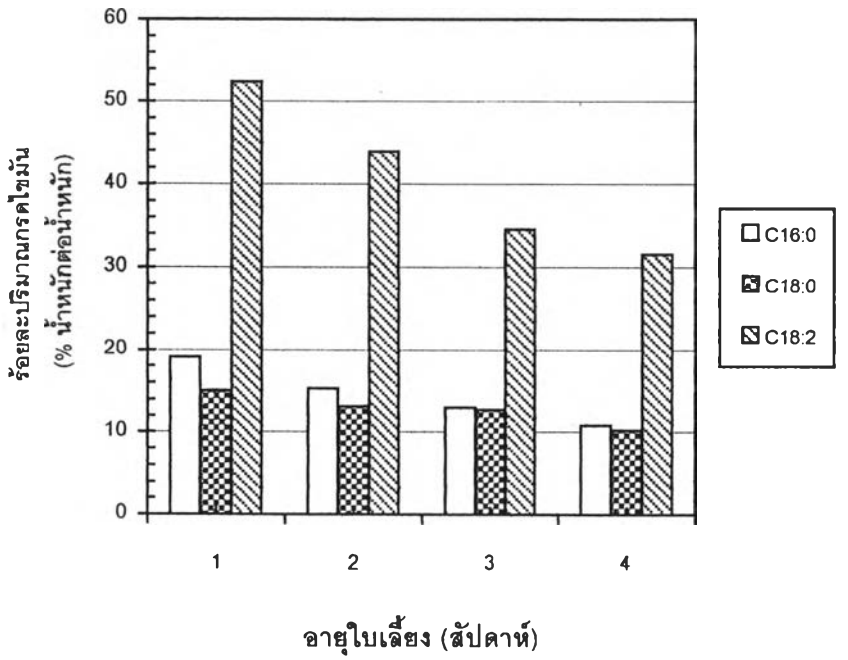
จากการนำใบเลี้ยงคำฝอยอายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 2.0% เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส นำแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ มาหาน้ำหนักแห้ง สกัดน้ำมัน และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน พบว่า น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำมันมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามลำดับอายุของใบเลี้ยง กล่าวคือ แคลลัสที่เจริญมาจากใบเลี้ยงอายุ 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 0.067 กรัม และ 1.32% ตามลำดับ ในน้ำมันมีกรดไขมันที่พบอย่างเด่นชัด ได้แก่ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดสเตียริก (C18:0) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุต่าง ๆ มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ กรดลิโนเลอิก (C18:2) มากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18:0) ซึ่งปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ใบเลี้ยงที่มีอายุมากขึ้น โดยพบว่า แคลลัสที่เจริญมาจากใบเลี้ยงอายุ 1 สัปดาห์ มีปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดสูงที่สุด รองลงมา คือ แคลลัสที่เจริญมาจากใบเลี้ยงอายุ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนกรดโอเลอิก (C18:1) ที่พบในแคลลัสของใบเลี้ยงอายุต่าง ๆ มีปริมาณน้อยมาก คือ ไม่เกิน 1% (ตารางที่ 3.19 และรูปที่ 3.12)

ตารางที่ 3.19 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัส ร้อยละปริมาณน้ำมัน และร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยง อายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อายุใบเลี้ยง (สัปดาห์)	น้ำหนักแห้งแคลลัส[1] (กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)	ร้อยละปริมาณน้ำมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)	ร้อยละปริมาณกรดไขมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)			
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
1	0.056±0.002	1.04±0.08	19.09±0.51	15.03±0.51	tr[2]	52.38±1.53
2	0.059±0.001	1.16±0.03	15.029±0.60	13.15±0.34	tr	43.89±1.15
3	0.065±0.001	1.17±0.05	13.0±0.42	12.71±0.59	tr	34.53±1.13
4	0.067±0.001	1.32±0.05	10.74±0.20	10.16±0.39	tr	31.51±0.48

[1] ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SE) จาก 3 ซ้ำ

[2] tr หมายถึง trace (มีปริมาณน้อยกว่า 1.0% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)



รูปที่ 3.12 แสดงร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยง อายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.2 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

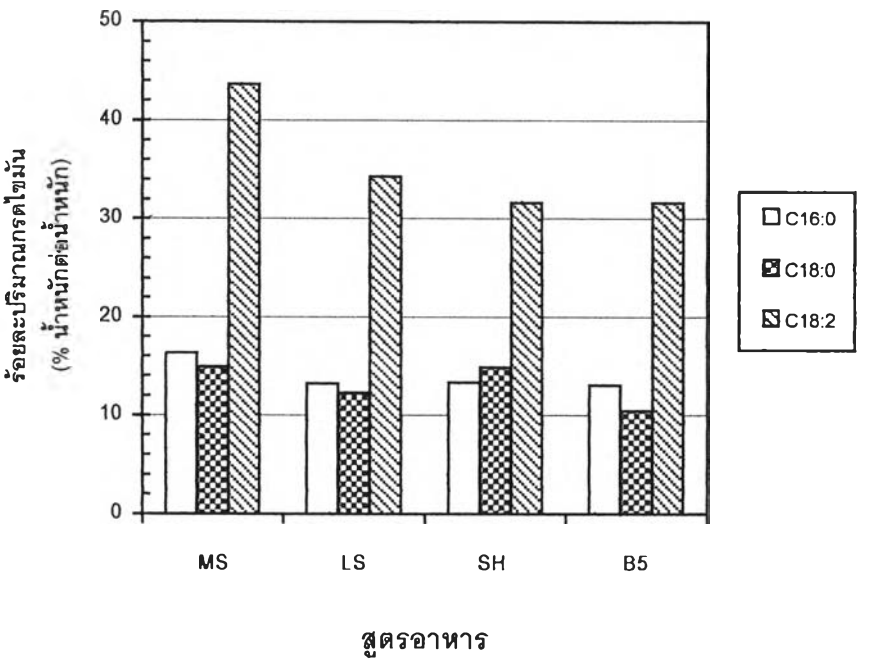
จากการนำใบเลี้ยงคำฝอยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 2.0% จนเกิดแคลลัส นำแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ นำมาหาน้ำหนักแห้ง สกัดน้ำมัน และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน พบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน คือ 0.060-0.070 กรัม และพบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SH มีปริมาณน้ำมันสูงที่สุด คือ 1.46% รองลงมา คือ สูตร B5, MS และ LS ซึ่งมีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 1.24%, 1.17% และ 0.76% ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน พบว่า แคลลัสที่เจริญขึ้นมาบนอาหารทุกสูตรมีปริมาณกรดลิโนเลอิก (C18:2) สูงที่สุด รองลงมา คือ กรดกรดปาล์มิติก (C16:0), กรดสเตียริก (C18:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ตามลำดับ โดยพบว่า แคลลัสที่เจริญบนอาหารสูตร MS มีกรดไขมันแต่ละชนิดสูงกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงด้วยการใช้อาหารสูตรอื่น ยกเว้นกรดโอเลอิก (C18:1) พบมากที่สุดในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร SH คือ มีปริมาณเท่ากับ 3.72% ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่น ๆ มีปริมาณกรดไขมันชนิดนี้น้อยมาก คือ ไม่เกิน 1% (ตารางที่ 3.20 และรูปที่ 3.13)

ตารางที่ 3.20 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัส ร้อยละปริมาณน้ำมัน และร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้งแคลลัส[1] (กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)	ร้อยละปริมาณน้ำมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)	ร้อยละปริมาณกรดไขมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)			
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
MS	0.060±0.001	1.17±0.05	16.31±0.36	14.89±0.44	tr[2]	43.57±1.22
LS	0.068±0.003	0.76±0.02	13.22±0.21	12.27±0.95	tr	34.27±1.48
SH	0.065±0.001	1.46±0.05	13.33±0.47	14.85±0.41	3.72±0.18	31.63±0.68
B5	0.070±0.002	1.24±0.05	13.03±0.39	10.45±0.20	tr	31.36±0.56

[1] ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SE) จาก 3 ซ้ำ

[2] tr หมายถึง trace (มีปริมาณน้อยกว่า 1% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)



รูปที่ 3.13 แสดงร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.3 ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต

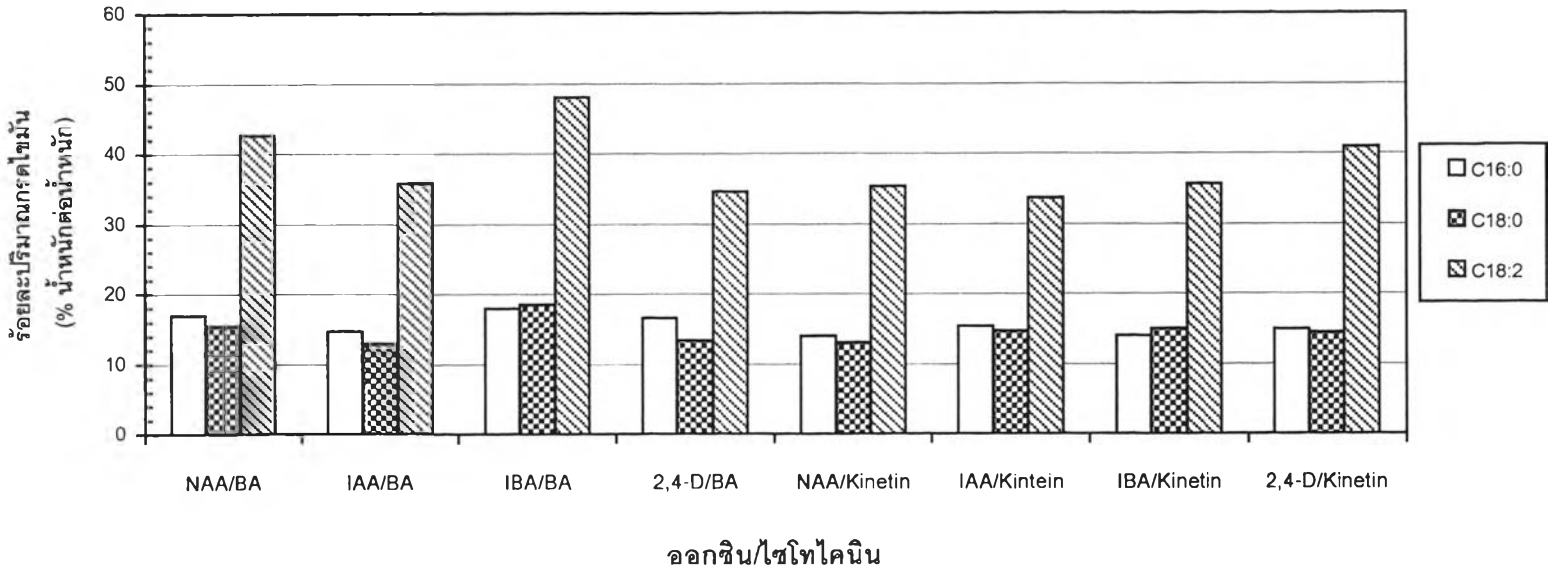
จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงคำฝอยบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่มร่วมกัน คือ ออกซิน (NAA, IAA, IBA และ 2,4-D) และไซโทไคนิน (BA และ Kinetin) โดยแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเกิดแคลลัสเจริญขึ้นมาบนใบเลี้ยง นำแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ มาหาน้ำหนักแห้ง สกัดน้ำมัน และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน พบว่า แคลลัสที่ได้จากการใช้ IBA ร่วมกับ Kinetin มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ 0.077 กรัม ส่วนแคลลัสที่ได้จากการใช้ NAA ร่วมกับ Kinetin มีน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด คือ 0.053 กรัม และพบว่า แคลลัสที่ได้จากการใช้ IAA ร่วมกับ Kinetin มีปริมาณน้ำมันสูงที่สุด คือ 2.74% ส่วนแคลลัสที่ได้จากการใช้ NAA ร่วมกับ Kinetin มีปริมาณน้ำมันต่ำที่สุด คือ 1.06% สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันพบว่า แคลลัสมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ กรดลิโนเลอิก (C18:2) มากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18:0) ไม่ว่าจะใช้ส่วนผสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตคู่ใด ๆ กรดไขมันที่มีปริมาณสูงที่สุด คือ กรดลิโนเลอิก (C18:2) และต่ำที่สุด คือ กรดโอเลอิก (C18:1) โดยพบว่าแคลลัสที่ได้จากการใช้ออกซินชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ BA มีปริมาณกรดไขมันส่วนใหญ่สูงกว่าการใช้ร่วมกับ Kinetin กล่าวคือ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดสเตียริก (C18:0) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ IBA ร่วมกับ BA ส่วนกรดโอเลอิก (C18:1) มีปริมาณมากที่สุดเมื่อใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA (ตารางที่ 3.21 และรูปที่ 3.14)

ตารางที่ 3.21 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัส ร้อยละปริมาณน้ำมัน และร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ

ออกซิน	ไซโตไคนิน	น้ำหนักแห้งแคลลัส[1] (กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)	ร้อยละปริมาณน้ำมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)	ร้อยละปริมาณกรดไขมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)			
				C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
NAA	BA	0.056±0.001	1.22±0.06	16.99±0.38	15.46±0.13	tr[2]	42.67±0.85
IAA	BA	0.056±0.002	1.37±0.12	14.68±0.12	12.91±0.69	tr	35.84±0.53
IBA	BA	0.054±0.001	2.26±0.11	17.97±0.30	18.59±0.71	tr	48.04±0.88
2,4-D	BA	0.061±0.001	1.42±0.11	16.55±0.10	13.42±0.20	3.47±0.10	34.60±0.68
NAA	Kinetin	0.053±0.002	1.06±0.06	13.96±0.48	13.11±0.38	tr	35.36±0.73
IAA	Kinetin	0.062±0.002	2.74±0.17	15.35±0.26	14.71±0.43	tr	33.71±0.27
IBA	Kinetin	0.077±0.001	1.33±0.12	13.98±0.31	15.00±0.49	tr	35.68±0.60
2,4-D	Kinetin	0.073±0.001	1.09±0.05	14.89±0.47	14.46±0.77	tr	40.89±0.58

[1] ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SE) จาก 3 ซ้ำ

[2] tr หมายถึง trace (มีปริมาณน้อยกว่า 1% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)



รูปที่ 3.14 แสดงร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโทไคนินชนิดต่าง ๆ

3.4.2.4 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

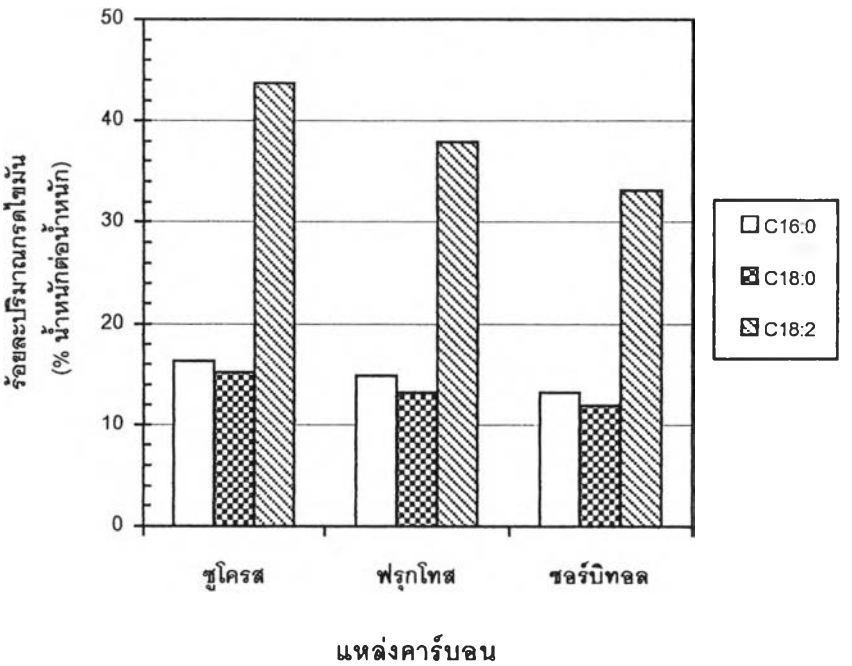
จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงคำฝอยบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเกิดแคลลัส จึงนำแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ มาหาน้ำหนักแห้ง สกัดน้ำมัน และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน พบว่า แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มีฟรุกโทสมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ 0.075 กรัม รองลงมา คือ การใช้อาหารที่มีซอร์บิทอลและซูโครส ตามลำดับ ซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.067 กรัม และ 0.056 กรัม ตามลำดับ ในการสกัดน้ำมันพบว่า แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มีซูโครสมีปริมาณน้ำมันสูงที่สุด คือ 1.25% รองลงมา คือ การใช้อาหารที่มีฟรุกโทสและซอร์บิทอล ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.98% และ 0.56% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในแคลลัส พบว่า กรดไขมันที่มีปริมาณมากที่สุด คือ กรดลิโนเลอิก (C18:2) รองลงมา คือ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดสเตียริก (C18:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ตามลำดับ โดยพบว่า แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่ใส่ซูโครสมีปริมาณกรดไขมันเหล่านี้สูงกว่าการใช้ฟรุกโทสและซอร์บิทอล ตามลำดับ ยกเว้นกรดโอเลอิก (C18:1) พบในแคลลัสที่เจริญบนอาหารที่ใส่ฟรุกโทสมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 3.80% ส่วนการใช้อาหารที่ใส่น้ำตาลชนิดอื่นพบกรดไขมันชนิดนี้น้อยมาก คือ ไม่เกิน 1% (ตารางที่ 3.22 และรูปที่ 3.15)

ตารางที่ 3.22 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัส ร้อยละปริมาณน้ำมัน และร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักแห้งแคลลัส[1] (กรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)	ร้อยละปริมาณน้ำมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)	ร้อยละปริมาณกรดไขมัน[1] (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)			
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
ซูโครส	0.056±0.001	1.25±0.06	16.31±0.38	15.21±0.29	tr[2]	43.69±0.62
ฟรุกโทส	0.075±0.002	0.98±0.06	14.88±0.33	13.25±0.43	3.80±0.12	37.94±0.45
ซอร์บิทอล	0.067±0.001	0.56±0.06	13.24±0.55	11.95±0.40	tr	33.15±0.80

[1] ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SE) จาก 3 ซ้ำ

[2] tr หมายถึง trace (มีปริมาณน้อยกว่า 1% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)



รูปที่ 3.15 แสดงร้อยละปริมาณกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีน้ำตาลซนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน