รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนแล้งและการชักนำให้เกิดต้นโดยใช้สาร polyethylene glycol ในสภาพหลอดทดลอง

(*In vitro* selection of drought-tolerance sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus and regeneration of plantlets from the selected callus lines using polyethylene glycol)

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 (เพิ่มเติม)

มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 23 เพิ่มเติม/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนแล้งและการชักนำให้เกิดต้นโดยใช้สาร polyethylene glycol ในสภาพหลอดทดลอง

(*In vitro* selection of drought-tolerance sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus and regeneration of plantlets from the selected callus lines using polyethylene glycol)

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 (เพิ่มเติม)

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 (เพิ่มเติม) มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 23 เพิ่มเติม/2560

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ร่วมวิจัย ดร.วาสินี พงษ์ประยูร อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา ผู้ร่วมวิจัย รวมทั้งบุคลากร เจ้าหน้าที่ และนิสิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยเฉพาะนายศราวุธ วงษ์แก้ว นางสาวธรรมพร โชติวรธรรม นางสาวภิญญดา ดีแพง นางสาวปิยธิดา แก้วสังข์ ที่มีส่วนร่วมในการปลูกท่อนอ้อยพันธุ์ การเพาะเลี้ยงปลายยอดในสภาพหลอดทดลอง และการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลทั้งในด้านการเจริญเติบโต และด้านสรีรวิทยา รวมถึงการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จ.ขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาให้สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้มีพระคุณที่ไม่ได้เอ่ยนามที่มีส่วนร่วมให้งานวิจัยชิ้นนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

บทคัดย่อ

นำปลายยอดอ้อยของอ้อย 2 พันธุ์คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์สุพรรณบุรี 50 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีขาวนวลและแคลลัสที่ได้เกาะกันหลวมๆ (friable callus) จากนั้นคัดเลือกลักษณะแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG 6000 ที่ระดับความเขมขน 0, 5, 10, 15 และ 20% จะเห็นได้ว่าแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่ไม่มีการเติม PEG แคลลัสที่ได้มีน้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด และจะเห็นได้ว่าน้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสลดลง เมื่อได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่มากขึ้น หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน โปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ CAT APX SOD 0พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อการสะสมโพรลีน โปรตีน และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ CAT APX และ SOD เพิ่มมากขึ้น โดยอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีปริมาณโพรลีน โปรตีน และแอควิตีของเอนไซม์ CAT APX และ SOD มากกว่าอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกอ้อยที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ในอนาคต

Abstract

Shoots of two cultivars sugarcane i.e. Khon Kaen 3 and Suphanburi 50 were cultured in MS medium containing 3 mg/l 2, 4-D and 0.5 mg/l kinetin for callus induction at 25°C and light intensity 2000 lux, 16 hours of light per day. For 4 weeks, it was found that callus can be induced in both cultivars which obtained a white color and friable callus. Then, callus were cultured on MS medium containing 3 mg/l 2,4-D 3 mg/l and 0.5 mg/l kinetin together with PEG 6000 at the concentration 0, 5, 10, 15 and 20% for 4 weeks. From the result, it shown that callus of both sugarcane cultivars that cultured on MS medium containing 3 mg/l 2, 4-D and 0.5 mg/l kinetin without PEG, callus obtained the highest fresh weight and diameter. On the other hand, it could be seen that the fresh weight and callus diameter decreased when receiving PEG 6000 at higher concentrations. The analysis of the amount of proline, protein and activity of the CAT APX SOD enzyme showed that all concentrations of PEG resulted in the accumulation of proline, proteins and the increased activity of the CAT APX and SOD enzymes. Khon Kaen 3 had the proline, protein content and activity of the enzyme CAT APX and SOD more than Suphanburi 50. From this results, this technique can be applied to select sugarcane cultivars that was resistant to dehydration.

สารบัญเรื่อง

เนื้อหา **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ.....ค
บทคัดย่อ.....ง
Abstract.....จ
สารบัญเรื่อง.....ฉ
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญภาพ.....ซ
บทนำ.....1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
ขอบเขตของการวิจัย.....2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
วิธีการดำเนินการวิจัย.....3
ผลการศึกษา.....7
วิจารณ์ผลการศึกษา.....21
สรุปผลการศึกษา.....26
บรรณานุกรม.....28
ภาคผนวก.....32

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ความเข้มข้นของ PEG ที่มีต่อน้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 9

2 ปริมาณโพรลีนในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 12

3 แอกติวิตีของ CAT (μmole H_2O_2 decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 14

4 แอกติวิตีของ APX (nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 16

5 แอกติวิตีของ SOD (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 18

6 ปริมาณของโปรตีน (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 19

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดที่มีใบม้วนบนอาหาร สูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 7

2 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 9

3 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 10

4 การชักนำให้เกิดยอดและรากของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และสุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. และ NAA 5 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน..... 10

5 ปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 12

6 แอกติวิตีของ CAT (μmole H2O2 decomposed/mg protein • min) ในแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 14

7 แอกติวิตีของ APX (nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 16

8 แอกติวิตีของ SOD (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 18

9 ปริมาณของโปรตีน (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์..... 19

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อ้อย เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในหลายๆ ประเทศ โดยเฉพาะประเทศในทวีปเอเชีย อาจถือเป็นแหล่งปลูกอ้อยแหล่งใหญ่ที่สุดของโลกโดยสามารถผลิตอ้อยได้ประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตอ้อยทั่วโลก (ประเสริฐ ฉัตรวชิรวงษ์, 2542) สำหรับประเทศไทยจัดเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลรายใหญ่ซึ่งติด1 ใน 5 ของโลกโดยสามารถผลิตน้ำตาลได้ปีละ 4.0-5.5 ล้านตัน และใช้บริโภคภายในประเทศประมาณ 1.7 ล้านตัน ส่วนที่เหลือจะส่งไปขายยังต่างประเทศและนำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละไม่น้อยกว่า 30,000ล้านบาท (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, 2541) นอกจากนี้ในปีพ.ศ. 2552 มีรายงานการส่งออกสินค้าที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายรวมทั้งสิ้น 5,052,570 ตัน ซึ่งคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 61,586ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปลูกอ้อยมักประสบกับปัญหาการระบาดของโรคแมลงศัตรูในแปลงปลูก ความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม เช่น ความแห้งแล้งของอากาศ ความแปรปรวนของฝน การใช้สารเคมีในดิน ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว จากข้อมูลพบว่าในพื้นที่ปลูกอ้อยในเขตน้ำฝนทั่วประเทศ จะมีผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 10 ตันต่อไร่ บางครั้งผลผลิตที่ได้ไม่แน่นอนเนื่องจากฝนแล้งทำให้กระทบต่อผลผลิตและรายได้ของเกษตรกร หากมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมโดยเฉพาะลักษณะทนแล้งจะช่วยเพิ่มผลผลิตและมูลค่าต่อไร่สูงขึ้น ทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาที่มีศักยภาพและเป็นไปได้ คือการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนแล้ง (รงรอง หอมนวล และคณะ, 2553) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถือเป็นเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการขยายพันธุ์พืชให้มีศักยภาพสูงได้ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์พืชเพื่อผลิตต้นพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดโรค และได้ต้นที่มีลักษณะคงเดิมทุกประการ สามารถนำวิธีการนี้ไปเพาะขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณประชากรของต้นพืชที่ต้องการได้ (อุดม นวพานิช, 2549) โดยการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการคัดเลือกลักษณะทนแล้งของแคลลัสอ้อยโดยการใช้สารโพลีเอ็ททีลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในความเข้มข้นต่างๆ ที่ทำให้เกิดสภาวะขาดน้ำในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อย และคัดเลือกแคลลัสอ้อยที่สามารถรอดชีวิตหรือมีแนวโน้มทนต่อสภาวะขาดน้ำ และนำมาทดสอบหาความสัมพันธ์กับความสามารถของกลไกการป้องกันตัว (defense mechanism) ของพืชจากอันตรายที่เกิดจากภาวะแล้ง โดยศึกษาจากกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) , catalase (CAT) และ ascorbate peroxidase (APX) รวมถึงปริมาณของโพรลีน (proline) และโปรตีน (protein) หลังจากนั้นนำแคลลัสอ้อยที่ได้มาชักนำให้เกิดยอดและรากและทำการย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน เพื่อประเมินหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเทคนิคที่ได้จะใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกลักษณะพันธุ์อ้อยที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ในเบื้องต้นและสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุง

พันธุ์อ้อยให้สามารถในการทนภาวะเครียดที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากภาวะแล้ง และนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยและเพิ่มมูลค่าในเชิงเกษตรกรรมและในเชิงเศรษฐกิจ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำ (ทนแล้ง) ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อศึกษาหาระดับความเข้มข้นของ PEG ที่แตกต่างกัน ในการประเมินความทนทานต่อภาวะแล้งในการชักนำให้เกิดแคลลัสของอ้อย

2.เพื่อศึกษาผลของภาวะแล้งที่มีต่อการสะสมปริมาณโพรลีนของแคลลัสอ้อย

3.เพื่อศึกษาผลของภาวะแล้งที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ SOD, CAT และ APX ของแคลลัสอ้อย

4.เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดยอดและรากของแคลลัสอ้อยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน

ขอบเขตของการวิจัย

1.การประเมินหาระดับความเข้มข้นของ PEG ที่แตกต่างกัน เพื่อประเมินความทนทานต่อภาวะแล้งในการชักนำให้เกิดแคลลัสของอ้อยที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

2. การศึกษาผลของ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีบางประการในแคลลัสอ้อย ที่เจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงในภาวะปกติและภาวะแล้ง

3. การศึกษาข้อมูลของลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ เพื่อประเมินหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและความทนทานต่อภาวะแล้ง ซึ่งสามารถที่จะนำไปปลูกในสภาพแปลงทดลองได้ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของอ้อยและระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีบางประการในแคลลัสอ้อย

2. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งโดยการใช้ PEG เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยและเพิ่มมูลค่าในเชิงเกษตรกรรมและในเชิงเศรษฐกิจ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำ (ทนแล้ง) ได้ และสามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ต่อไป

3. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง ซึ่งอยู่ในฐาน TCI หรือ ACI หรือเอกสารสืบเนื่องจากการประชุมระดับชาติ 1 เรื่อง

วิธีการดำเนินการวิจัย

1)การเพาะเลี้ยงปลายยอดอ้อยเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

สายพันธุ์อ้อยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ KK3 และสุพรรณบุรี 50 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีการส่งเสริมให้เพาะปลูก (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2556) โดยนำปลายยอดอ้อยมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้คลอรอกซ์ 10% และ 5% ที่เติมยาจับใบ (tween 20) 1-2 หยด แช่นานประมาณ 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างคลอรอกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำส่วนนี้มาลอกกาบใบออกจนถึงปลายยอด เพื่อตัดปลายยอดให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร นำปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. (ดัดแปลงจาก Rao and Jabeen, 2013) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส สังเกตการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

2) การคัดเลือกแคลลัสอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในอาหารที่เติม PEG

นำแคลลัสน้ำหนักประมาณ 250±10 กรัม ที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0,5, 10, 15, 20, 25% เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงในอาหารเดิม จำนวน 2 ครั้งทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญของแคลลัสที่มีความทนต่อสภาวะขาดน้ำตามวงรอบที่เพาะเลี้ยง (culture cycle) โดยบันทึกลักษณะแคลลัสที่เปลี่ยนแปลงไป สังเกตการตายของแคลลัสเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน แคลลัสที่มีความทนต่อสภาพขาดน้ำจะถูกพิจารณาให้เป็นแคลลัสสายพันธุ์อ้อยที่ทนต่อ PEG ที่ให้ และจะนำไปชักนำให้เกิดยอดและรากต่อไป

3) การชักนำให้เกิดยอดและราก

คัดเลือกแคลลัสอ้อยที่ได้ โดยบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส น้ำหนักสดของแคลลัส แล้วนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของแคลลัสอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในอาหารที่เติม PEG มาชักนำให้เกิดยอดและราก โดยการชักนำให้เกิดยอดและราก นำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. และย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 มก./ล.

4) การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของแคลลัสอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในอาหารที่เติม PEG

4.1) การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในแคลลัสอ้อย

การวัดปริมาณโพรลีน (หน่วยเป็นไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) โดยทำการสกัดตามวิธีการของ Bates *et al*., (1973) ดังนี้

4.1.1 เตรียมสารละลายโพรลีนมาตรฐานเข้มข้น 0 3.75 7.5 15 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากสารละลายโพรลีนมาตรฐาน 6 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเจือจางด้วย 3% sulfosalicylic acid แล้วนำสารละลายโพรลีนมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองและทำการทดลองเหมือนสารละลายตัวอย่างพืช

4.1.2 ชั่งตัวอย่างแคลลัส ประมาณ 500 มิลลิกรัม บดกับ 3% sulfosalicylic acid ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที

4.1.3 นำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติม acid-ninhydrin ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและสิ้นสุดปฏิกิริยาที่อ่างน้ำแข็ง

4.1.4 นำ reaction mixture ที่ได้เติม toluene ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 15-20 วินาที สารละลายจะเกิดการแยกตัวออกจากกันเป็นชั้นบนและชั้นล่าง

4.1.5 ดูดสารละลายส่วนบนออกจากหลอดทดลอง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยมี toluene เป็น blank

4.1.6 คำนวณหาปริมาณโพรลีนในสารละลายตัวอย่างพืช โดยใช้วิธีเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโพรลีน

4.2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) และโปรตีน

นำแคลลัสของอ้อยมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT, APX, SOD และโปรตีน โดยดัดแปลงจาก Sunohara and Matsumoto (2004) มีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 การสกัดเอนไซม์ (Enzyme extraction)

ทำการสกัดเอนไซม์ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำตัวอย่างแคลลัสอ้อยหนัก 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดแช่เย็นที่มีไนโตรเจนเหลว แล้วเติมสารละลายสกัด (extraction solution) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายสกัดประกอบด้วย 25 mM potassiumphosphate buffer (pH 7.8), 0.4 mM EDTA, 1 mM ascorbic acid และ 2% PVPP เมื่อบดเข้ากันดีแล้วนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนของเหลวใส (supernatant) มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำส่วนของเหลวใสที่ผ่านการกรองซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT, APX และ SOD ต่อไป

4.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

4.2.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT (CAT activity assay)

ตรวจสอบการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ CAT ตามวิธีของ Beers and Sizer (1951). โดยที่สารละลายสารตั้งต้นมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0 ใน 100 mM H_2O_2) ปริมาตร 0.90 ml และสารสกัดเอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร วัดอัตราการลดลงของ H_2O_2 ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร โดยที่ 1 ยูนิตของเอนไซม์ CAT คือ การลดลงของ H_2O_2 1 ไมโครโมลต่อนาที

4.2.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ APX (APX activity assay)

ตรวจสอบการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ APx ตามวิธีของ Nakano and Asada (1981) โดยที่สารละลายสารตั้งต้นมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 48.6 ml, 100 mM EDTA ปริมาตร 0.4 ml , 11.6 mM H_2O_2 ปริมาตร 0.75 ml, 100 mM ascorbic acid ปริมาตร 0.25 ml) เติม substrate solution 200 ไมโครลิตร วัดด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยที่ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ 1 ไมโครโมล การเกิดออกซิเดชั่นของกรดแอสคอร์บิก (ascorbate oxidation) ต่อนาที

4.2.2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ SOD (SOD activity assay)

ตรวจสอบการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ SOD ตามวิธีของ Foster and Hess (1980) โดยที่สารละลายสารตั้งต้นมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 216 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) ปริมาตร 0.25 ml, 1.1 mM cytochrome c จาก equine heart ปริมาตร 0.01 ml, 0.108 mM xanthine,0.3125 unit/ml of xanthine oxidase ปริมาตร 0.05 ml, น้ำกลั่น ปริมาตร 0.68 ml และ สารสกัดเอนไซม์ 0.005 ml วัดอัตราการลดลงของ cytochrome c ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยที่ 1 ยูนิตของเอนไซม์ SOD ถูกยับยั้งโดย 50% ที่ควบคุมอัตราการสร้างโดยเอนไซม์ xanthine oxidase ในการลดลงของ cytochrome c ที่ 25 องศาเซลเซียล

4.2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Bradford (1976) ดังนี้

ชั่งตัวอย่างแคลลัสให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.2-0.3 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย TRis-HCl pH 7.5 ผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปปั่นนาน 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปกรองด้วยกระดากรองเบอร์ 1 แล้วปิเปตสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Bradford ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex 15 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

5) วิธีการประเมินผล/สังเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองปัจจัย (two-way analysis of variance) โดยปัจจัยที่ 1 คือพันธุ์อ้อยและปัจจัยที่สองคือระดับความเข้มข้นของ PEG ที่แตกต่างกัน และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

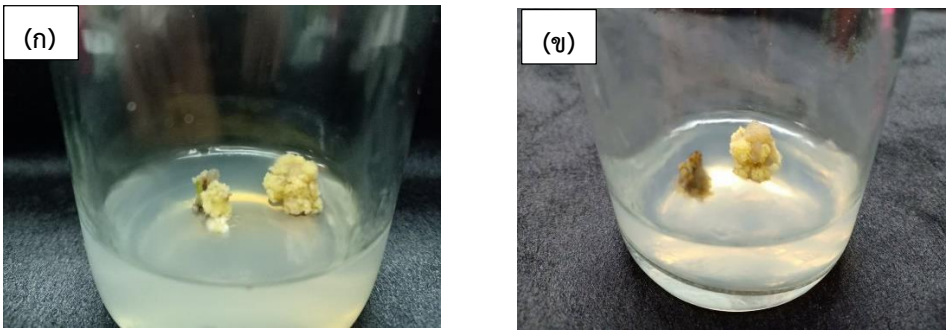
สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี

ผลการศึกษา

1.การเพาะเลี้ยงปลายยอดอ้อยเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการนำปลายยอดอ่อนที่มีใบม้วน ขนาดความยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และสุพรรณบุรี 50 มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ปรากฏว่ามีแคลลัสสีขาวนวลเกิดขึ้น และมีการเกาะกันหลวม (friable callus) (ตามภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดที่มีใบม้วน บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์
ก) พันธุ์สุพรรณบุรี 50 ข) พันธุ์ขอนแก่น 3

2. การคัดเลือกแคลลัสอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในอาหารที่เติม PEG

นำแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ น้ำหนักประมาณ 250±10 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0,5, 10, 15, 20, 25% เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงในอาหารเดิม จำนวน 2 ครั้งทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่เปลี่ยนแปลงไป ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 น้ำหนักสดแคลลัส

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ในอาหารสูตรที่ไม่เติม PEG (ชุดควบคุม) แคลลัสมีน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 0.3650 ±0.0327 มิลลิกรัม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 5% โดยมีน้ำหนักสดของ

แคลลัสเท่ากับ 0.2820 ± 0.1273 มิลลิกรัม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 1)

ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ในอาหารหารสูตรที่ไม่เติม PEG (ชุดควบคุม) แคลลัสมีน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 0.2670 ± 0.1161 มิลลิกรัม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 5% โดยมีน้ำหนักสดของแคลลัสเท่ากับ 0.2150 ± 0.1898 มิลลิกรัม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ ดังเช่นที่พบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีน้ำหนักสดของแคลลัสมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 1)

2.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ในอาหารสูตรที่ไม่เติม PEG (ชุดควบคุม) แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดเท่ากับ 2.8 ± 1.647 เซนติเมตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 1)

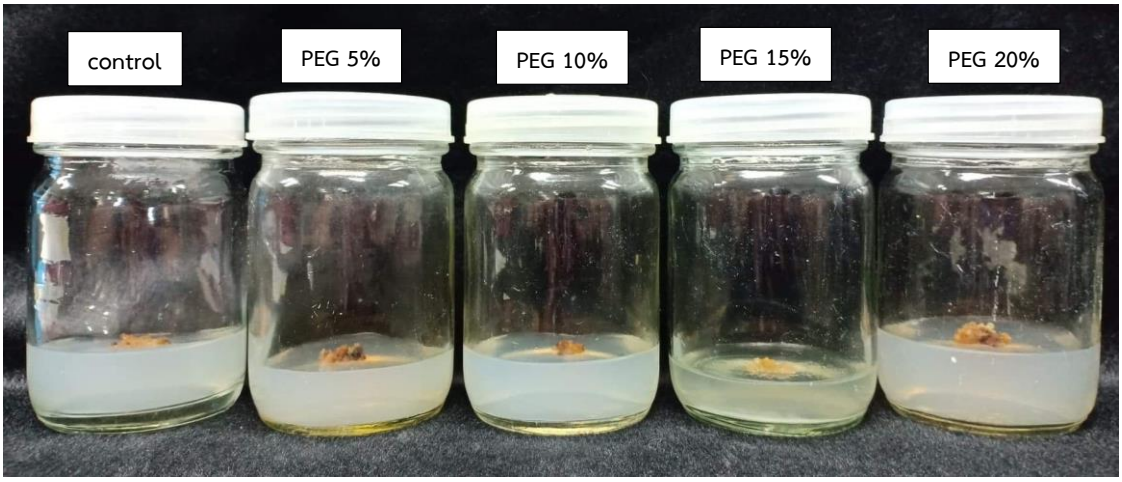
ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ในอาหารหารสูตรที่ไม่เติม PEG (ชุดควบคุม) แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดเท่ากับ 2.0±3.091 เซนติเมตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ ดังเช่นที่พบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 1)

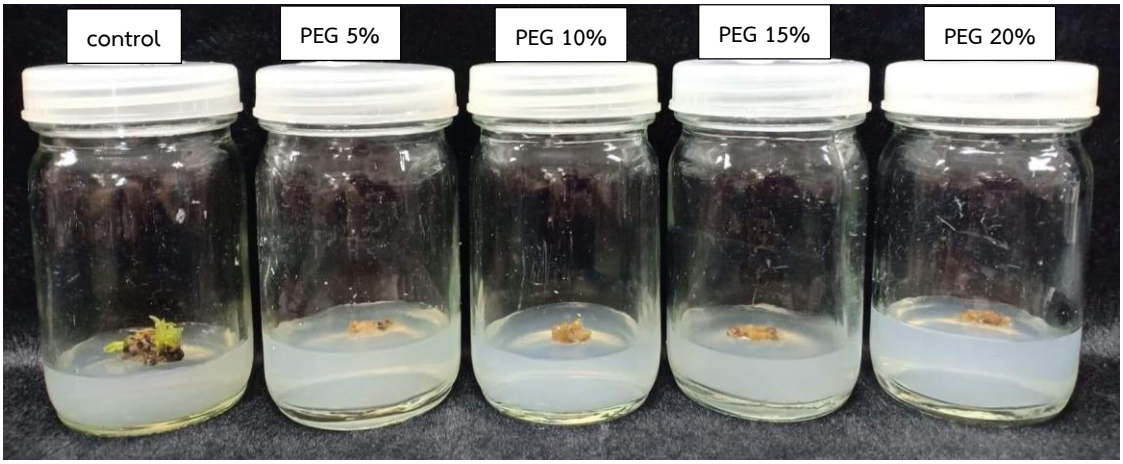
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ PEG ที่มีต่อน้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

พันธุ์	PEG	น้ำหนักสดของ callus (มิลลิกรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส (เซนติเมตร)
ขอนแก่น 3	0	0.3650 ± 0.0327^{aA}	2.8 ± 1.647^{aA}
	5	0.2820 ± 0.1273^{aB}	2.0 ± 1.841^{bB}
	10	0.1900 ± 0.0865^{bCD}	1.8 ± 0.699^{bcBC}
	15	0.1780 ± 0.2794^{cD}	1.6 ± 0.919^{cC}
	20	0.1720 ± 0.0940^{cD}	1.2 ± 1.350^{dD}
สุพรรณบุรี 50	0	0.2670 ± 0.1161^{aB}	2.0 ± 3.091^{aB}
	5	0.2150 ± 0.1898^{abC}	1.6 ± 3.155^{bC}
	10	0.1670 ± 0.3013^{bD}	1.4 ± 0.422^{bcCD}
	15	0.1550 ± 0.1777^{bcD}	1.2 ± 1.075^{cD}
	20	0.1420 ± 0.649^{bcD}	1.0 ± 2.199^{cE}

หมายเหตุ – ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยพันธุ์เดียวกัน) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยระหว่างพันธุ์) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 3 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3) การชักนำให้เกิดยอดและราก

เมื่อนำแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดยอด และการเพาะเลี้ยงยอดบนสูตร MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดราก สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ แต่จะเห็นได้ว่า ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากได้ดีกว่าพันธุ์สุพรรณบุรี 50 (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 การชักนำให้เกิดยอดและรากของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และสุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. และ NAA 5 มก./ล. เป็นเวลา 60 วัน

4) การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของแคลลัสอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในอาหารที่เติม PEG

4.1) การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในแคลลัสอ้อย

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อการสะสมโพรลีนในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยการสะสมโพรลีนในแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG แต่ละระดับความเข้มข้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และการสะสมโพรลีนในแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น มีค่ามากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีปริมาณโพรลีนในแคลลัสมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณโพรลีนมากที่สุดเท่ากับ 9.0837±0.07005 ไมโครกรัม/น้ำหนักสด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

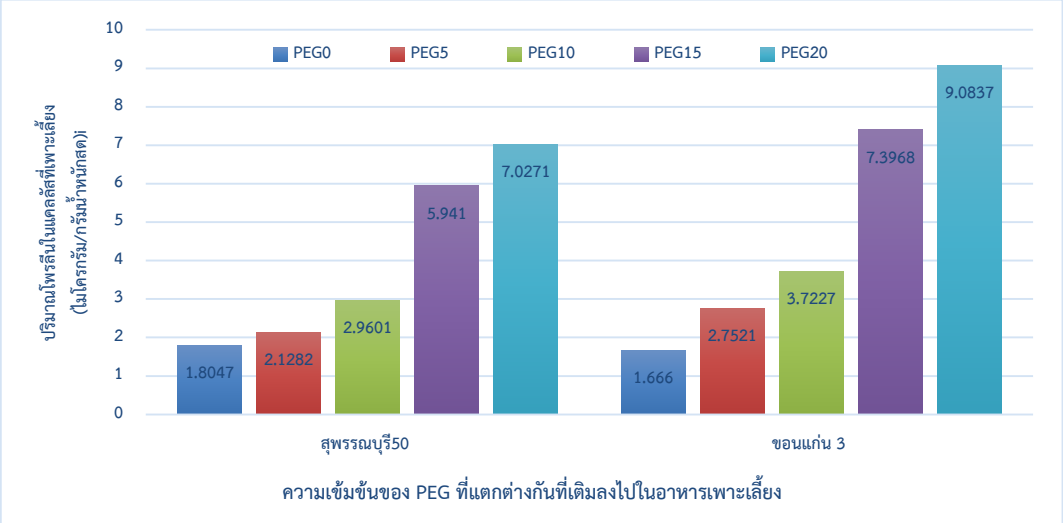
ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีปริมาณโพรลีนในแคลลัสมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณโพรลีนมากที่สุดเท่ากับ 6.7862±0.1004 ไมโครกรัม/น้ำหนักสด และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 15% โดยมีปริมาณโพรลีนเท่ากับ 5.9410±0.1834 ไมโครกรัม/น้ำหนักสด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น แคลลัสอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีปริมาณโพรลีนมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 2 ปริมาณโพรลีนในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ (Mean ± Standard error)

พันธุ์	PEG	ปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด)
ขอนแก่น 3	0	1.6660±0.04621^{aA}
	5	2.7521±0.1200^{bB}
	10	3.7227±0.1443^{cBC}
	15	7.3968±0.1200^{dD}
	20	9.0837±0.07005^{eE}
สุพรรณบุรี 50	0	1.8047±0.0611^{aA}
	5	2.1282±0.0693a^{AB}
	10	2.9601±0.0800^{bB}
	15	5.9410±0.1834^{cC}
	20	6.7862±0.1004^{cD}

หมายเหตุ – ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยพันธุ์เดียวกัน) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยระหว่างพันธุ์) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 5 ปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

4.2) ผลของ PEG ต่อแอกติวิตีของ CAT APX และ SOD

4.2.1 แอกติวิตีของ CAT

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อแอกติวิตีของ CAT ในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีแอคติวิตีของ CAT เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และแอคติวิตีของ CAT จะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีแอคติวิตีของ CAT เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีของ CAT มากที่สุดเท่ากับ 177.9480±7.5040 μmole H_2O_2 decomposed/mg protein • min และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

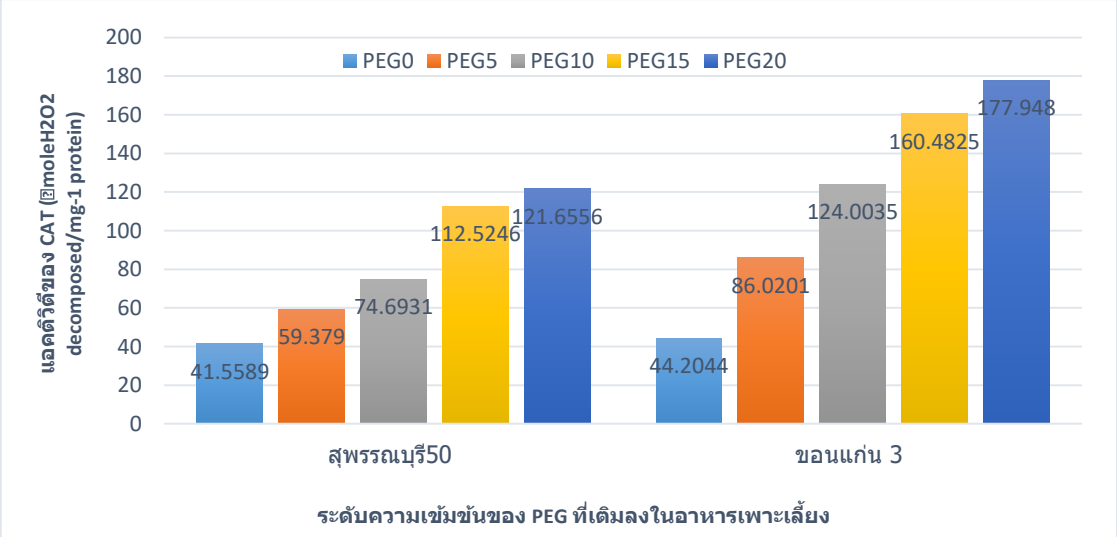
ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีแอคติวิตีของ CAT เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีของ CAT มากที่สุดเท่ากับ 121.6556±5.7110 μmole H2O2 decomposed/mg protein • min ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG 15% โดยมีแอคติวิตีของ CAT เท่ากับ 112.5246±5.7065 μmole H2O2 decomposed/mg protein • min แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีแอคติวิตีของ CAT มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 3 แอกติวิตีของ CAT (μmole H_2O_2 decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ (Mean ± Standard error)

พันธุ์	PEG	แอกติวิตีของ CAT (μmole H_2O_2 decomposed/mg protein • min)
ขอนแก่น 3	0	44.2044 ± 0.0145^{aA}
	5	$86.0201 \pm 7.4478^{abBC}$
	10	124.0035 ± 7.5599^{bC}
	15	160.4825 ± 0.0643^{cE}
	20	177.9480 ± 7.5040^{dF}
สุพรรณบุรี 50	0	41.5589 ± 5.7489^{aA}
	5	59.3790 ± 7.3758^{bD}
	10	74.6931 ± 2.4971^{cE}
	15	112.5246 ± 5.7065^{dF}
	20	121.6556 ± 5.7110^{dF}

หมายเหตุ – ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยพันธุ์เดียวกัน) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยระหว่างพันธุ์) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 6 แอกติวิตีของ CAT (μmole H2O2 decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

4.2.2 แอกติวิตีของ APX

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อแอกติวิตีของ APX ในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีแอคติวิตีของ APX เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และแอคติวิตีของ APX จะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีแอคติวิตีของ APX เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีของ APX มากที่สุดเท่ากับ 254.1098±10.7158 nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG 15% โดยมีแอคติวิตีของ APX เท่ากับ 229.1691±0.0919 nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

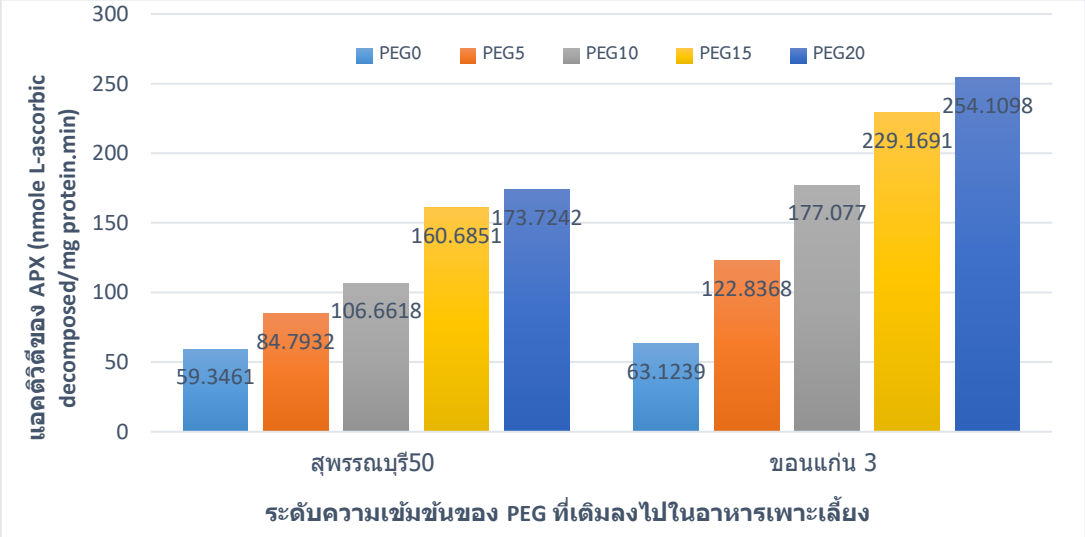
ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีแอคติวิตีของ APX เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีของ APX มากที่สุดเท่ากับ 173.7242±8.1554 nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG 15% โดยมีแอคติวิตีของ APX เท่ากับ 160.6851±8.1489 nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีแอคติวิตีของ APX มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 4 แอกติวิตีของ APX (nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ (Mean ± Standard error)

พันธุ์	PEG	แอกติวิตีของ APX (nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min)
ขอนแก่น 3	0	63.1239±0.0208^{aA}
	5	122.8368±10.6354^{bcC}
	10	177.0770±10.7955^{cCD}
	15	229.1691±0.0919^{dD}
	20	254.1098±10.7158^{dE}
สุพรรณบุรี 50	0	59.3461±8.2095^{aA}
	5	84.7932±10.5327^{bB}
	10	106.6618±3.5659^{cBC}
	15	160.6851±8.1489^{dC}
	20	173.7242±8.1554^{dCD}

หมายเหตุ – ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยพันธุ์เดียวกัน) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยระหว่างพันธุ์) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 7 แอกติวิตีของ APX (nmole L-ascorbic acid decomposed/mg protein • min) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

4.2.3 แอกติวิตีของ SOD

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อแอกติวิตีของ SOD ในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีแอคติวิตีของ SOD เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และแอคติวิตีของ SOD จะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีแอคติวิตีของ SOD เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีของ SOD มากที่สุดเท่ากับ 4.9350±0.0647 Unit mg-1 protein แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG 15%, 10% และ 5% โดยมีแอคติวิตีของ SOD เท่ากับ 4.8774±0.058, 4.6512±0.3037 และ 4.5086±0.0541 Unit mg-1 protein ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

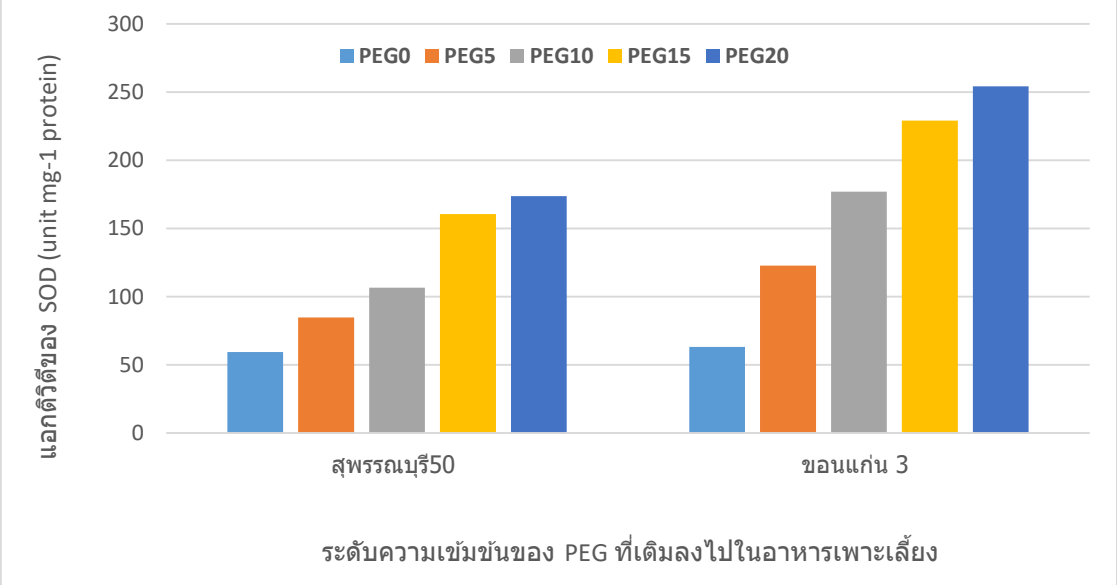
ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีแอคติวิตีของ SOD เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีของ SOD มากที่สุดเท่ากับ 4.7800±0.1202 Unit mg-1 protein และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีแอคติวิตีของ SOD มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 5 แอกติวิตีของ SOD (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ (Mean ± Standard error)

พันธุ์	PEG	แอกติวิตีของ SOD (Unit mg-1 protein)
ขอนแก่น 3	0	4.2543 ± 0.2111^{aBC}
	5	4.5086 ± 0.0541^{abC}
	10	4.6512 ± 0.3037^{abC}
	15	4.8774 ± 0.0586^{bD}
	20	4.9350 ± 0.0647^{bD}
สุพรรณบุรี 50	0	2.9413 ± 0.1151^{aA}
	5	3.5702 ± 0.1987^{aB}
	10	3.9745 ± 0.1154^{bB}
	15	4.5607 ± 0.1242^{cC}
	20	4.7800 ± 0.1202^{dCD}

หมายเหตุ – ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยพันธุ์เดียวกัน) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยระหว่างพันธุ์) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 8 แอกติวิตีของ SOD (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

4.3 ผลของ PEG ต่อปริมาณของโปรตีน

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อปริมาณของโปรตีนในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่จะเห็นได้ชัดเจนว่า เมื่อระดับของ PEG มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นคือที่ระดับ PEG 20% ปริมาณโปรตันในแคลลัสมีค่าลดลงในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีปริมาณของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 15% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณของโปรตีนมากที่สุดเท่ากับ 3.51 ± 0.18 Unit mg-1 protein และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ และที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% จะเห็นได้ว่ามีปริมาณโปรตีนในแคลลัสลดลง (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

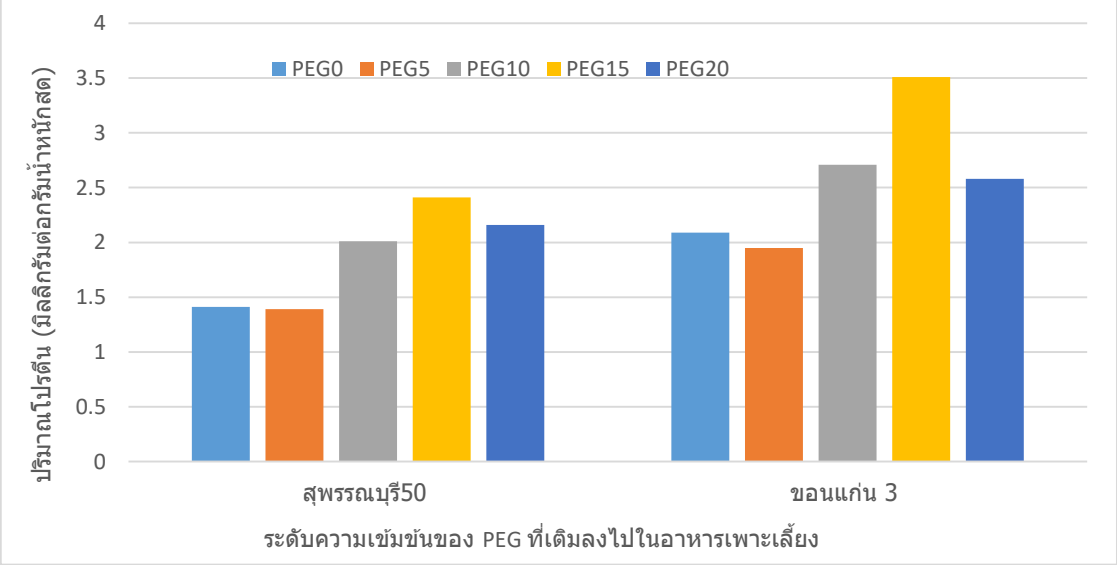
ในอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG 6000 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นสูง จะมีปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 20% แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดเท่ากับ 2.76 ± 0.09 Unit mg-1 protein ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ได้รับ PEG 15% โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2.41± 0.06 Unit mg-1 protein แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีปริมาณของโปรตีนมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 6 ปริมาณของโปรตีน (Unit mg-1 protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ (Mean ± Standard error)

พันธุ์	PEG	แอกติวิตีของโปรตีน (Unit mg^{-1} protein)
ขอนแก่น 3	0	2.09 ± 0.10^{aBC}
	5	1.95 ± 0.08^{aB}
	10	2.71 ± 0.05^{bD}
	15	3.51 ± 0.18^{cE}
	20	2.58 ± 0.07^{bF}
สุพรรณบุรี 50	0	1.41 ± 0.10^{aA}
	5	1.39 ± 0.14^{aA}
	10	2.01 ± 0.05^{bB}
	15	2.41 ± 0.06^{cCD}
	20	2.16 ± 0.09^{bD}

หมายเหตุ – ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยพันธุ์เดียวกัน) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (ในอ้อยระหว่างพันธุ์) แสดงว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$



ภาพที่ 9 ปริมาณของโปรตีน (Unit mg^{-1} protein) ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล และ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

อภิปรายผลการวิจัย

ผลของ PEG ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดของแคลลัสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม PEG มีค่ามากที่สุด และลดลงตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งโพลีเอทธิลีนไกลคอล (หรือ polyethylene glycol ; PEG) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถนำมาควบคุมระดับของภาวะแล้งหรือภาวะการขาดน้ำในพืชได้ตามต้องการ โดย PEG สามารถทำให้ค่าศักย์ของน้ำหรือค่าวอเตอร์โพเทนเชียล (water potential) ของสารละลายธาตุอาหารหรืออาหารสังเคราะห์ที่ใช้ปลูกพืชมีค่าลดลงและควบคุมการเกิดออสโมซิสระหว่างพืชกับน้ำได้ ซึ่ง PEG ที่มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 4000 ขึ้นไป สามารถนำมาใช้ในการจำลองภาวะแล้งในหลอดทดลองได้โดยไม่เป็นพิษกับพืช (Steuter et al., 1981) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเติม PEG อาหารเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้น 5-20% มีผลทำให้น้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมีค่าลดลงตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สอดคล้องกับงานทดลองของ Bouiamrine and Diouri (2012) ที่ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของข้างฟ่างบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. ร่วมกับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มมากขึ้นมีผลไปลดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำในแคลลัว มีผลทำให้น้ำหนักสด อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์และปริมาณน้ำในแคลลัสมีค่าลดลง เนื่องจากการเติม PEG มีผลไปทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำและมีผลไปลดปริมาณการดูดซับน้ำของเซลล์จากอาหารที่เพาะเลี้ยง เป็นผลทำให้แรงดันเต่งของเซลล์ลดลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง และจากงานวิจัยของ Heyser and Nabors (1981) แสดงให้เห็นว่าเมื่อภาวะเครียดออสโมติคเพิ่มขึ้นจากการเติม PEG ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง มีผลทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง ซึ่งผลจากภาวะเครียดจากการขาดน้ำในเซลล์นี้มีผลทำให้เซลล์มีการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้น และซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากภาวะเครียดน้ำ จึงทำให้เซลล์พืชมีการปรับตัวให้ทนทานต่อภาวะเครียดน้ำนี้

จากการทดลองจะเห็นว่า จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นจะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีน้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสที่มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับความเข้มข้นของ PEG แสดงให้เห็นว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีความทนทานต่อภาวะขาดน้ำหรือภาวะเครียดน้ำ (water stress) ได้ดีกว่าอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ซึ่งอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (มีชื่อเดิมว่า 94-2-200) จัดเป็นอ้อยพันธุ์ใหม่สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นอ้อยพันธุ์ที่มีการแตกกอดี ใบคลุมพื้นที่ได้เร็ว ทำให้การแข่งขันกับวัชพืชได้

ดี ส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัชพืช และมีความต้านทานในระดับปานกลางต่อโรคแส้ดำและเหี่ยวเน่าแดง นอกจากนี้อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สามารถปลูกได้ทั่วไป ในพื้นที่ที่เป็นดินร่วนปนทรายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตปลูกอ้อยของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อ้อยพันธุ์นี้มีความทนแล้งได้เป็นอย่างดี (วารสารกรมวิชาการเกษตร, 2011)

นอกจากนี้จากการทดลองในการชักนำให้เกิดยอดและราก จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดยอดและการเพาะเลี้ยงยอดบนสูตร MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ แต่จะเห็นได้ว่า ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากได้ดีกว่าพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เนื่องจากลักษณะประจำพันธุ์ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 นั้นมีลักษณะเด่นคือ แตกกอดี ใบคลุมพื้นที่เร็ว ที่สำคัญยังให้ผลผลิตสูงอีกด้วย (ข่าวคมชัดลึก, 2562) จึงมีผลทำให้การชักนำให้เกิดให้เกิดยอดและรากในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีการตกยอดรากที่ดีกว่าพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ซึ่งอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 จัดเป็นอ้อยพันธุ์คั้นน้ำ สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศและปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศท้องถิ่นได้ดี เจริญเติบโตได้เร็ว อัตราการแตกกอดี มีความต้านทานโรคแส้ดำ โรคราใบขาว โรคลำต้นหรือใส่เน่าแดงและหนอนกออ้อยได้ดี หากปลูกในเขตชลประทานหรือมีการให้น้ำอย่างสม่ำเสมอจะสามารถให้ผลผลิตสูง จึงจัดเป็นพันธุ์ที่ต้องการน้ำมาก หากขาดน้ำจะมีผลทำให้ปริมาณความหวานลดลง (ความรู้ด้านการเกษตร, 2562)

ผลของ PEG ที่มีต่อลักษณะทางชีวเคมีในอ้อย

ผลของ PEG ที่มีต่อปริมาณโพรลีน

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อการสะสมโพรลีนในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยการสะสมโพรลีนในแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG แต่ละระดับความเข้มข้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และการสะสมโพรลีนในแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น มีค่ามากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะเห็นได้ว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น แคลลัสอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีปริมาณโพรลีนมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้สอดคล้องกับงานทดลองของงานทดลองของ Abdul-Qadir et al., (2011) ที่ได้ศึกษาผลของภาวะขาดน้ำต่อการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและการพัฒนาของเอมบริโอจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธ์หอมมะลิในสภาพหลอดทดลอง โดยใช้ PEG 3000 เพื่อชักนำให้เกิดภาวะขาดน้ำ โดยเพาะเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG 0, 3, 6 และ

9% จากการทดลองพบว่า PEG ที่ 6 และ 9% มีผลไปลดน้ำหนักสดของแคลลัส และการพัฒนาของเอมบริโอ แต่เห็นได้ชัดว่าปริมาณของโพรลีนในแคลลัสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้จากงานทดลองของ Muscolo et at., (2014) ที่ได้ศึกษาผลของ PEG ที่ชักนำให้เกิดภาวะขาดน้ำที่มีต่อการงอกของเมล็ดเลนทิล (lentil) *(Len culinaris* L.) 4 สายพันธุ์ โดยใช้เมล็ดของ lentil 4 สายพันธุ์และได้รับ PEG 6000 5 ระดับคือ 0, 10, 15, 18 และ 21% โดยเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความยาวราก ปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อ (tissue water content ; WC) รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase, β- amylase, α-glucosidase และปริมาณสารออสโมไลท์ (osmolyte) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากเริ่มทำการทดสอบการงอกของเมล็ด จากการทดลองว่า ภาวะขาดน้ำมีผลไปลดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความยาวราก และ WC ในทุกพันธุ์ตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้ แต่พบว่าปริมาณของโพรลีนและปริมาณน้ำตาลที่ละลายน้ำได้มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งเห็นได้ในพันธุ์ Eston และ Castelluccio เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ

จากการสะสมโพรลีนที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเซลล์พืชได้รับ PEG จัดเป็นกลไกการป้องกันตัว (defense mechanism) อย่างหนึ่งของพืช เนื่องจากโพรลีนเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พบได้ในพืชหลายชนิดที่อยู่ในภาวะขาดน้ำหรือภาวะแล้ง ซึ่งภาวะแล้งเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โพรลีนเพิ่มมากขึ้น โดยภาวะแล้งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของพืช (Reddy et al., 2004) ซึ่งการขาดน้ำในระยะต้นกล้าส่งผลให้การพัฒนาของต้นพืชช้าลงและมีพื้นที่ใบน้อยลง (ธีระพงศ์และคณะ, 2547) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะมิโนและฮอร์โมนบางชนิด เช่น โพรลีน (Waldren and Teare, 1974) ซึ่ง Hsiao (1973) รายงานว่า โพรลีนทำหน้าที่เป็นตัวเก็บรักษาคาร์บอนและไนโตรเจนในระหว่างที่พืชขาดน้ำ ซึ่ง พืชจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตหลังจากพืชพ้นสภาวะขาดน้ำ (Barnett and Naylor, 1966) และโพรลีนที่สะสมเพิ่มขึ้นในสภาวะขาดน้ำ จะช่วยรักษาระดับการทำงานของเอนไซม์ให้ดำเนินเป็นปกติ และรักษาโครงสร้างของเซลล์ให้เป็นปกติ

ผลของ PEG ต่อแอกติวิตีของ CAT APX และ SOD

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อแอกติวิตีของ CAT, APX และ SOD ในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และแอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า และจะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีแอคติวิตีของเอนไซม์มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG ผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้สอดคล้องกับงานทดลองของ Rao และ Jabeen (2013) ที่ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 mg/l ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/l

และเติม PEG ที่ระดับความเข้มข้น 20% พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ CAT, APX, POX และ SOD เพิ่มสูงมากขึ้น รวมทั้งมีปริมาณของโพรลีนและกรดแอสคอร์บิกเพิ่มสูงขึ้นด้วย ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ได้รับ PEG เปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่ได้รับ PEG

จากการทดลองในครั้งนี้ การให้ PEG มีผลทำให้เกิดภาวะขาดน้ำขึ้นในพืช ทำให้พืชมีการตอบสนองโดยการปิดปากใบซึ่งยับยั้งกระบวนการตรึงกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้มีการนำ NADPH ที่ได้จากกระบวนการส่งถ่ายอิเลคตรอนไปใช้ช้าลง ส่งผลให้มี NADP+ กลับมารับอิเลคตรอนใหม่ไม่พอ เกิดการขาดแคลนตัวรับอิเลคตรอน จึงมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนให้กับตัวรับอิเลคตรอนอื่น เช่น ออกซิเจน เกิดเป็นรีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์ (reactive oxygen species ; ROS) ขึ้น ซึ่งการสร้างและสะสม ROS นำไปสู่การเกิดลิปิด เพอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) และการทำลายองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ (Elstner and Osswald, 1994) โดยเฉพาะไขมันที่เมมเบรนของคลอโรพลาสต์และไทลาคอยด์ เพราะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากและภายในคลอโรพลาสต์มีความเข้มข้นของกาซออกซิเจนสูง ทำให้พืชที่ได้รับภาวะแล้งมีปริมาณรงควัตถุลดลงเพราะเมมเบรนต่างๆ ของคลอโรพลาสต์ถูกทำลาย (Moran et al., 1994 ; Baisak et al., 1994) ดังนั้นพืชจึงต้องมีกลไกการป้องกันตัวต่างๆ จากการทำลายของ ROS ซึ่งพืชมีระบบการกำจัด ROS ทั้งในไซโตซอลและคลอโรพลาสต์ที่ประกอบด้วยสารแอนติออกซิแดนซ์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymic antioxidants) โดยทั่วไปเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ascorbate, glutathione, α-tocopheraol และ carotenoids และสารแอนติออกซิแดนซ์ที่เป็นเอนไซม์ (enzymic antioxidants) เช่น SOD, CAT, POX และเอนไซม์ในวงจร ascorbate glutathione cycle ที่ประกอบด้วย APX, DHAR, MDHAR และ GR (Smirnoff, 1993 ; Allen, 1995 และ Alscher *et al*.,1997) ซึ่ง SOD เป็นเอนไซม์ตัวแรกในกระบวนการกำจัด ROS ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide ไปเป็น hydrogen peroxide และน้ำ ซึ่ง CAT และ POX จะเป็นเอนไซม์ที่ใช้กำจัด hydrogen peroxide โดย CAT พบใน peroxisome ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ในการกำจัด hydrogen peroxide ที่เกิดจาก photorespiration หรือระหว่างการเกิด β-oxidation ของกรดไขมันในไกลออกซิโซมและช่วยกำจัด hydrogen peroxide ที่แพร่ออกมาจากคลอโรพลาสต์ POX ในพืชมีหลายชนิด ในการกำจัด hydrogen peroxide ต้องการสารตั้งต้น (R) สำหรับการเกิดแคทาไลซิสด้วย ส่วนมากพบในผนังเซลล์ที่เป็นบริเวณที่ใช้ hydrogen peroxide ในการสร้างสารประกอบฟีนอกซี่เพื่อนำไปสร้างลิกนิน (Bowler *et al*., 1992) จะเห็นได้ว่าจากการทำงานของ SOD ทำให้เกิด hydrogen peroxide จำนวนมากซึ่งจะถูกทำลายต่อไปโดย ascorbate-glutathione cycle โดยมี APX และ GR ทำหน้าที่หลักในคลอโรพลาสต์ เนื่องจาก CAT ไม่พบในคลอโรพลาสต์ ส่วน APX พบได้ทั้งในคลอโรพลาสต์และไซโตซอลของพืช (Foyer et al., 1994) ซึ่งเอนไซม์ทั้งหมดที่กล่าวนี้ จัดเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทำลาย ROS และทำให้พืชสามารถทนต่อภาวะขาดน้ำได้

ผลของ PEG ต่อปริมาณโปรตีน

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อปริมาณของโปรตีนในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่จะเห็นได้ชัดเจนว่า เมื่อระดับของ PEG มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นคือที่ระดับ PEG 20% ปริมาณโปรตีนในแคลลัสมีค่าลดลงในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีปริมาณของโปรตีนมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับของความเข้มข้นของ PEG แต่มีปริมาณโปรตีนลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่ระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มีค่ามากคือ PEG ที่ระดับ 20% (ตารางที่ 7 และภาพที่ 9) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gupta et.al. (2015) ที่ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.0 mg/l ร่วมกับ PEG 2.5-10% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้และมีปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นจาก 0.27% เป็น 1.83% ในชุดการทดลองที่เติม PEG 5% แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ PEG ให้มากขึ้นจะเห็นได้ว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณโปรตีนลดลง ซึ่งการสะสมโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นจากภาวะขาดน้ำของพืชเมื่อเติม PEG ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงนี้ จะเห็นได้ว่ามีการสะสมโพรลีนมากขึ้น ซึ่งโพรลีนจัดเป็นสารปรับค่าออสโมติกที่สามารถไปทำปฏิกริยากับเอนไซม์ เพื่อรักษาโครงสร้างและกิจกรรมของโปรตีนให้ดีขึ้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของโพรลีนที่สูงยังสามารถป้องกันไม่ให้พืชได้รับอันตรายภายใต้สภาวะเครียดได้อีกด้วย

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1.จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักสดของแคลลัสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม PEG มีค่ามากที่สุด และลดลงตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง โดยแคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีน้ำหนักสดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสที่มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ในทุกระดับความเข้มข้นของ PEG แสดงให้เห็นว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีความทนทานต่อภาวะขาดน้ำหรือภาวะเครียดน้ำ (water stress) ได้ดีกว่าอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50

2. เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อการสะสมโพรลีนในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีการสะสมโพรลีนในแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นและมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น แคลลัสอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีปริมาณโพรลีนมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50

3. เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อแอกติวิตีของ CAT, APX และ SOD ในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และจะเห็นได้ว่า แคลลัสของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีแอคติวิตีของเอนไซม์มากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50

4. เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสของอ้อยทั้งสองพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. และเติม PEG ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ให้มีผลต่อปริมาณของโปรตีนในแคลลัสของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ โดยปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และปริมาณของโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าแคลลัสอ้อยที่ได้รับ PEG ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อระดับของ PEG มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นคือที่ระดับ PEG 20% ปริมาณโปรตีนในแคลลัสมีค่าลดลงในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์จะเห็นได้ว่า แคลลัสของ

อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.5 มก./ล. ที่เติม PEG 6000 ในทุกระดับความเข้มข้น มีปริมาณของโปรตีนมากกว่าแคลลัสของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส ควรมีการเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโตในหลายๆ กลุ่ม เพื่อเปรียบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์
2. ควรมีการศึกษาในอ้อยหลายๆ พันธุ์ ที่มีรายงานลักษณะประจำพันธุ์ถึงการทนแล้งและลักษณะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับความทนแล้ง
3. ควรมีการศึกษาทางด้านกายวิภาคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทนแล้งของพืช เช่น จำนวนปากใบ ความหนานแน่นปากใบ ลักษณะของขนที่ปกคลุมใบ และ/หรือลักษณะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับความทนแล้ง

ผลผลิต

1. ผลงานตีพิมพ์ “คุณภาพต้นและเมล็ดข้าวอินทรีย์ บ้านหนองแสง จังหวัดนครนายก” (อยู่ระหว่างการดำเนินการ)
2. ผลงานเชิงสาธารณะ

2.1 รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ จัดส่งให้แก่ สำนักงานเกษตรจังหวัดนครนายก และเกษตรกรเจ้าของนา ที่คณะวิจัยได้เข้าไปทำงานวิจัย เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพื้นที่และจัดทำแผนการผลิตพืชอินทรีย์ และจัดถ่ายทอดความรู้ในชุดโครงการแก่เยาวชนผู้สนใจ และประชาชนในพื้นที่ต่อไป

2.2 ผลิตบัณฑิต : ระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) 2 คน คือ นางสาวกมลชนก ชนาวรรธน์สกุล และนางสาวนัทธมน เสาน้อย

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย - สัญญาเลขที่ 23/2560 (เพิ่มเติม)
โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 (เพิ่มเติม) มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนแล้งและการชักนำให้เกิดต้นโดยใช้สาร polyethylene glycol ในสภาพหลอดทดลอง (*In vitro* selection of drought-tolerance sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus and regeneration of plantlets from the selected callus lines using polyethylene glycol)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร. ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร

รายงานในช่วงตั้งแต่ วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 30 สิงหาคม พ.ศ. 2561

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 200,000 บาท เมื่อวันที่ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2560

งวดที่ 2 (40%) 160,000 บาท เมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2561

งวดที่ 3 (10%) 40,000 บาท เมื่อ .....

รวม 400,000 บาท

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ
1. ค่าตอบแทน	50,400	50,400	0
2. ค่าใช้สอย	30,000	30,000	0
3. ค่าวัสดุ	279,600	279,600	0
4. ค่าครุภัณฑ์	-	-	0
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ 5.1 ค่าธรรมเนียมอุดหนุนมหาวิทยาลัยและส่วนงาน	40,000	40,000	0
รวม			0

(.....)

นางสาวศิรศาธิญากร บรรหาร

หัวหน้าโครงการวิจัย

บรรณานุกรม

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน. (2557). พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ. (2558). *สรีรวิทยาของพืชในสภาวะเครียด.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประเสริฐ ฉัตรวชิรวงษ์. (2542). อ้อย. น. 270-295. ใน พืชเศรษฐกิจ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. (2541). อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลไทยในทศวรรษหน้า. ว. น้ำตาล. 34 (2): 1-7.

รงรอง หอมนวล เรวัติ เลิศฤทัยโยธิน รัตนา เอการัมย์ และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. (2553). การคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนแล้งโดยใช้สาร polyethylene glycol ในสภาพปลอดเชื้อ ใน *การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7, (*หน้า 1681-1688). นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.

วราภรณ์ ภูตะลุน. (2557). เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ทางเภสัชศาสตร์. ขอนแก่น : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ. (2554). *อ้อย (Sugarcane : Saccharum officinarum) พืชเศรษฐกิจ.* เอกสารประกอบการสอนวิชาพืชเศรษฐกิจ (Economic crops 510-211) . ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. (2556). *โครงการติดตามประเมินผลสัมฤทธิ์การพัฒนาและขยายพันธุ์อ้อยพันธุ์ดี*. รายงานการดำเนินงานฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2552). สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี2550-2552. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อุดม นวพานิช. (2549). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยราคำแหง.

อัญชลี ร่มพา. (2543). ความสัมพันธ์ของแอกทิวิตีของซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส ปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสงและการเจริญเติบโตในถั่วเหลือง (Glycin max (L.) Merrill.) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย.

Abdul-Qadir, L.H. and Al-Ka'aby H.K. (2011). The effect of water callus and somatic embryos formation of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Jasmine cultured *in vitro*. *Journal of Basrah Researches (Science)*. 37(3) : 270-280.

Akte, J., Yasmin, S., Bhuiyan MJH., Khatum, F., Roy, J. and Goswami, K. 2016. *In vitro* screening of rice genotype using polyethylene glycol under drought stress. *Progressive Agriculture*. 27(2) : 128-135.

Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance usung transgenic plants. *Plant Physiol*. 107 : 1049-1054.

Alscher, R.G., Donahue, J.L., and Cramer, C.L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants : Relationships in green cells. *Physiol. Plant*. 100 : 224-233.

Aziz, A. and Larher, F. (1998). Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf disc of *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol*. 153 : 754-762.

Baisak, R., Rana, D., Achaya, P. B.B.., and Kar, M. (1994). Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol*. 35(3) : 489-495.

Bates, L. S., Woldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 31-37.

Beers, R.F, and Sizer, I.W. (1951) A spectrophotometeric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133–140.

Bowler, C., Montagu, M.V., and Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev. Plant physiol. Plant Mol.Biol*. 43 : 83-116.

Braford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Ulilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254.

Elstner, E.F., and Osswald, W. (1994). Mechanism of the active activation during plant stress. *Proc. R. Soc. Edinburgh*. 102 : 131-154.

Foster JG, Hess JL (1980) Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activity in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiol* 66:482–487

Foyer, C. H., Descourvieres, P., and Kunert, K.J. (1994). Protection against oxygen radicals : an important defense ,echanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Envi*. 17 : 507-523.

Jabeen, F.T.Z. (2007). Selection of drought tolerant cell lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) through cell and tissue culture technique. Ph.D.Thesis submitted to Gulbarga University, Gulbarga Karnataka, India.

Lecoeur, J., Wery, J., Turc, O. and Tardieu, F. 1995. Expansion of leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* 46: 1093-1101.

Li, L., and Staden, J.V. (1998) Effects of plant growth regulators on the antioxidants system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Reg*. 24 : 55-66.

Mohammadkhani, N. & Heidari, R. 2007. Effects of drought stress on protective enzyme activities and lipid peroxidation in two maize cultivars. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(21): 3835-3840

Moran, J.F., Becana, M. Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., and Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. 194 : 346-352.

Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C. and Maggio, A. 2014. Effect of PEG-induced grought stress on seed germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interactions*. 9(1) : 354-363.

Naderi, R., Valizadeh, M., Toorchi, M. and Shakiba M. R., (2014). Antioxidant enzyme changes in response to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Acta Biologica Szegediensis*. 58(2) : 95-101.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880

Navari-Izzo, F., Teresa, M. Milone, A., Quarticci, M.F. (1996). Drought stress in seedling : Lipid metabolism and lipid peroxidation during recovery from drought in *Lotus corniculatus* and *Cerastium fontanum*. *Physiol. Plant*. 139 : 621-625.

Nguyen, H.T., Babu, R.C. and Blum, A. 1997. Breeding for drought resistance in rice: Physiology and molecular genetics consideration. *Crop Science,* 37: 1426-1443

Rao, S. and Jabeen, F.T.Z. (2013). In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 19(2) : 261-268.

Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189–1202

Salin, M.L. (1987). Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant*. 72 : 681-689.

Scandalios, J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol*. 101 : 7-12.

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen species in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*. 125 : 27-58.

Sunohara, Y., and Matsumoto, H. (2004). Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. Plant Science, 16, 597-606.

Steuter, A.A., Mozafer, A., and Goodin, J. R. (1981). Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol*. 67: 64-67.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. 2nd ed. Massachusetts. Sinaure Associatae.

Zayed, M.A., and Zeid, I.M. (1997/98). Effect of water and salt stresses on growth, chlorophyll, mineral irons and organic solutes contents and enzymes activity in mung bean seedling. *Biol. Plant*. 40 (3) : 351-356.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลง MS

1. การเตรียม Stock solution (อารยา บุตดี, 2555)

Stock solution I: Macronutrient, 100X	(กรัม/500 มิลลิลิตร)
$Cacl_2.2H_2O$	22
Stock solution II: Macronutrient, 1,000X	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
$MnSO_4.4H_2O$	2.23
$ZnSo_4.7H_2O$	0.86
H_3BO3	0.62
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025
$CuSo_4.4H_2O$	0.0025
$CoCl_2.6H_2O$	0.0025
Stock solution III: Macronutrient, 1,000X	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
Kl	0.083
Stock solution IV: Vitamins, 1,000X	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
Glycine	0.2
Nicotinic acid	0.05
Pytidoxine-HCl	0.05
Thiamin-HCl	0.01
Myo-inositol	10.00
Stock solution V: Iron/EDTA	(กรัม/100 มิลลิลิตร)
$FeSo_4.4H_2O$	0.557
$Na_2EDTA.2H_2O$	0.745

การเตรียม Stock V ชั่ง $FeSo_4$ และ $Na_2EDTA2H_2O$ แยกกัน แล้วจึงละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนประมาณ 60 องศาเซลเซียส จนละลายดีแล้วจึงเทรวมกัน Stock solution ทุกขวดต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมอาหารสูตร MS (อารยา บุตดี, 2555)

2.1 ชั่งสารเคมีดังรายการต่อไปนี้

Potassium nitrate; KNO_3	1.90 กรัม
Ammonium nitrate; NH_4NO_3	1.65 กรัม
Magnesium sulfate; $MgSO_4 . 2H_2O$	0.37 กรัม
Potassium phosphate; KH_2PO_4	0.17 กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 20 มิลลิลิตร

2.2 เติมสารละลายที่ละลายไว้แล้ว ลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

2.3 เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม

2.4 เติมสารละลายจาก stock solution ตามปริมาตรดังต่อไปนี้

stock solution I	10 มิลลิลิตร
stock solution II	1 มิลลิลิตร
stock solution III	1 มิลลิลิตร
stock solution IV	.1 มิลลิลิตร
stock solution V	5 มิลลิลิตร

2.5 เติมสารควบคุมการเจริญ (ถ้าต้องการใส่)

2.6 ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.7 ปรับ pH ให้ได้ 5.7±1 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH

2.8 เติมวุ้น 7 กรัม แล้วนำไปเข้าไมโครเวฟ เพื่อให้วุ้นละลาย

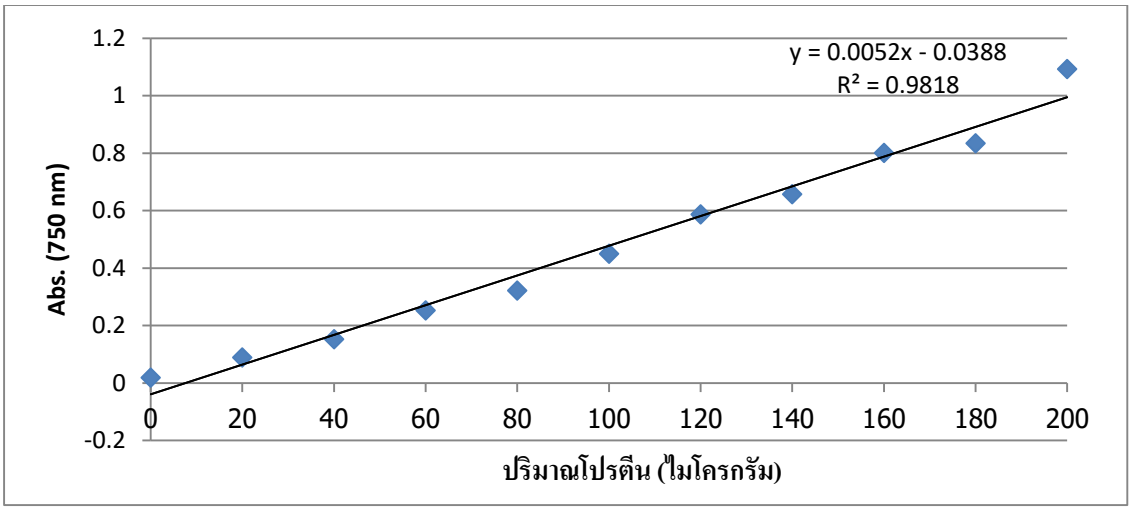
2.9 เทวุ้นใส่ขวดเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 นาที

ภาคผนวก ข

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน

ปริมาณโปรตีน	Abs. (750 นาโนเมตร)
1. 0	0.019
2. 20	0.089
3. 40	0.152
4. 60	0.253
5. 80	0.322
6. 100	0.450
7. 120	0.587
8. 140	0.657
9. 160	0.801
10. 180	0.834
11. 200	1.092

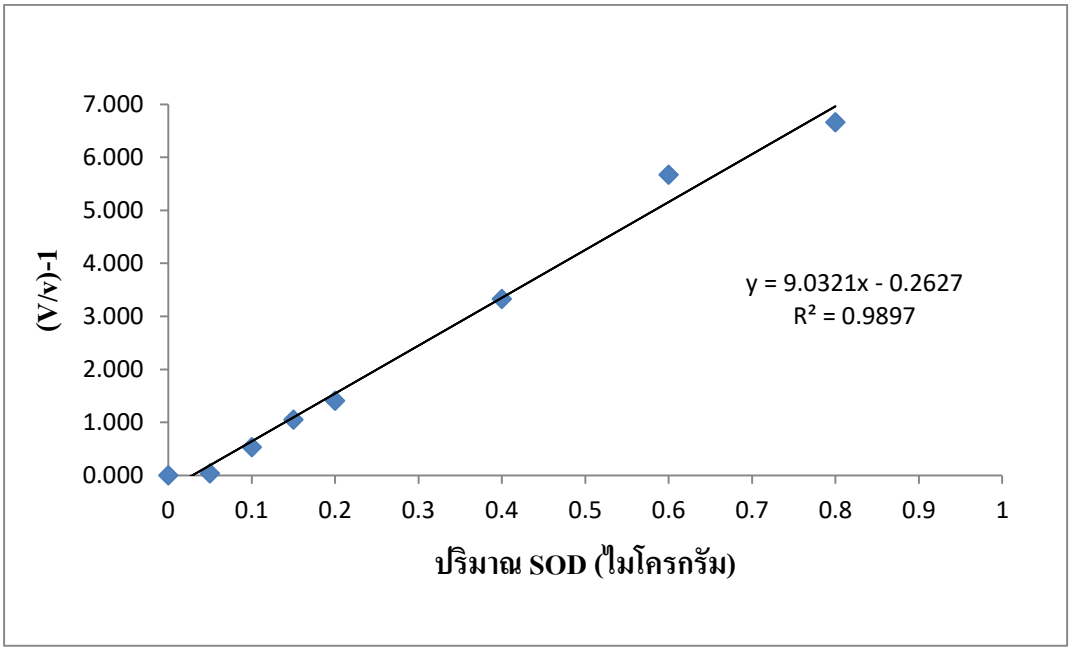


ภาพภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน

ตัวอย่างการสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน

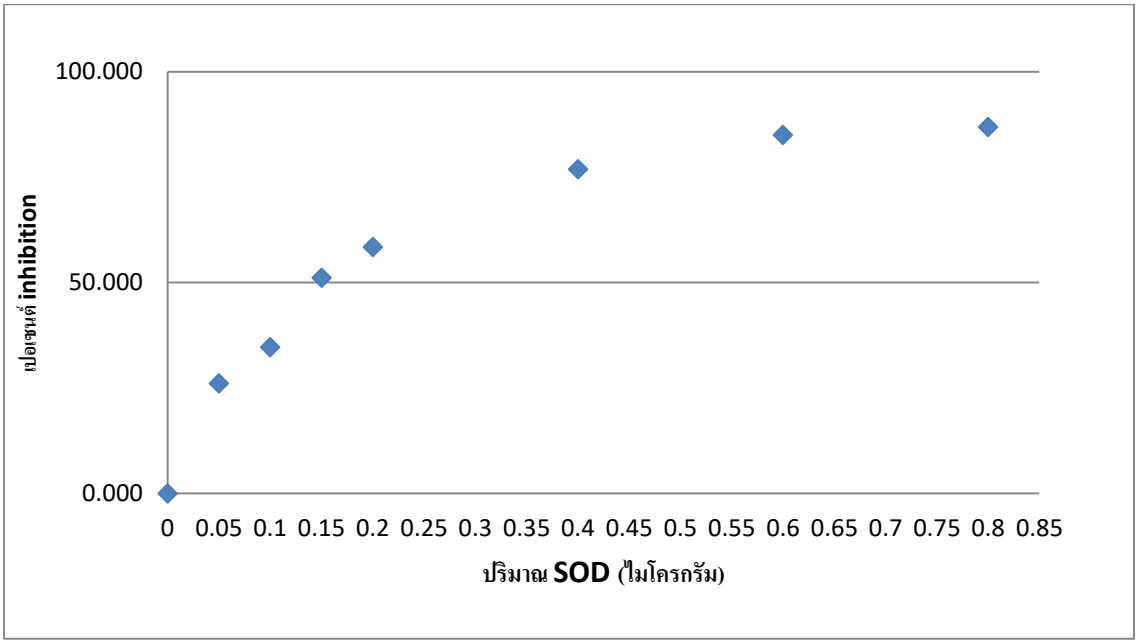
ปริมาณ SOD	Abs. (750 นาโนเมตร)	(V/v)-1
1. 0	0.467	0.000
2. 0.05	0.345	0.035
3. 0.1	0.305	0.531
4. 0.15	0.228	1.048
5. 0.2	0.194	1.407
6. 0.4	0.108	3.324
7. 0.6	0.070	5.671
8. 0.8	0.061	6.656

ได้ค่า V = 0.467/10 และ v = 0.345 0.305 0.228 0.194 0.108 0.070 และ 0.061 ในหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 8 ตามลำดับ ซึ่งสามรถนำมาคำนวณ (V/v)-1 และนำไปใช้ในการสร้างกราฟได้ ดังนี้



ภาพภาคผนวกที่ ข-2 กราฟเส้นตรงมาตรฐานของ SOD ปริมาณต่างๆ

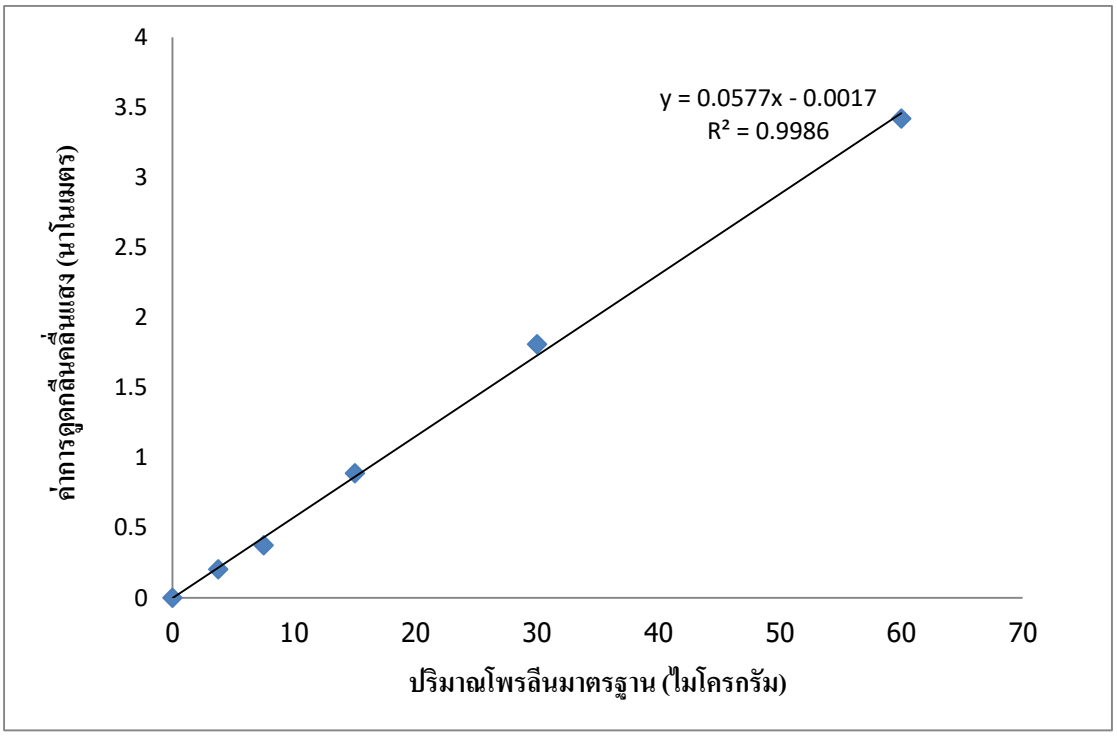
ในแต่ละหลอดทดลองสามารถหาเปอร์เซ็นต์ inhibition ได้จากสูตร (V/v)-1*100/V และเขียนกราฟความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ inhibition ปริมาณ SOD ได้ดังนี้



ภาพภาคผนวกที่ ข-3 เปอร์เซ็นต์ inhibition ของ SOD ปริมาณต่างๆ

ตัวอย่างการสร้างกราฟมาตรฐานโพรลีน

ปริมาณโพรลีน (ไมโครกรัม)	Abs. (750 นาโนเมตร)
1. 0	0.000
2. 3.75	0.202
3. 7.5	0.374
4. 15	0.889
5. 30	1.810
6. 60	3.420



ภาพภาคผนวกที่ ข-4 กราฟมาตรฐานโพรลีนในการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนในแคลลัสอ้อย