

รายงาน

การพัฒนาแทนเพื่อเป็นพืชน้ำต้นแบบในการวิจัยพื้นฐาน
และการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Development of Duckweed as a Model Aquatic-Plant
for Basic Research and Application in Biotechnology

สลิล ชัยโรจน์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยทุนอุดหนุน งบประมาณแผ่นดิน
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2557

สารบัญ

	หน้า
1. บทคัดย่อ.....	1
2. ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการฯ.....	2
3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
4. ขอบเขตของการวิจัย.....	3
5. วิธีการดำเนินการวิจัย.....	3
6. ผลการวิจัย.....	9
7. อภิปรายผลการวิจัย.....	55
8. สรุปผลการวิจัย.....	67
9. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้งาน.....	68
10. เอกสารอ้างอิง.....	69

1. บทคัดย่อ

แหน (duckweed) เป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดและสามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็วในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย ดังนั้นแหนจึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นพืชต้นแบบเพื่อใช้ในการศึกษาทางชีววิทยา โครงสร้างและสรีรวิทยาของพืช อนุชีววิทยา ชีวเคมี รวมไปถึงการนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ทาง เทคโนโลยีชีวภาพ จากการศึกษาพบว่าแหนที่พบในแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาประกอบไปด้วย 3 สายพันธุ์ซึ่งสามารถจำแนกได้ด้วยเทคนิค PCR คือ แหนใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แหนเล็ก (*Lemna minor*) และ ไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) ซึ่งสามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ โดยทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยสารฟอกขาวหรือสารโพวิโดน ไอโอดีน โดยแหนทั้ง 3 ชนิดเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลว Hoagland E และมีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณที่ 6.6, 2.7 และ 2.4 วัน ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าแหนใหญ่ แหนเล็ก และ ไข่น้ำมีลักษณะเป็นรูปวงรี มีขนาดพารามิเตอร์ (กว้าง x ยาว) เฉลี่ย 3.95×5.38 , 1.37×2.41 และ 0.45×0.56 มม. ตามลำดับ โดยมีจำนวนปากใบเฉลี่ย 88, 135 และ 78 คู่/มม.² ตามลำดับ และขนาดของปากใบ (กว้าง x ยาว) เฉลี่ย 12.6×20.0 , 13.7×22.5 และ 23.6×30.5 ไมครอน ตามลำดับ จากการศึกษาปริมาณ คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในแหนทั้ง 3 ชนิดพบว่า แหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดที่ 10.9, 28.7 และ 18.8 %ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 20.5, 16.0 และ 7.48 %ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และพบว่ากรดซาลิไซลิกและกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนิลออกซีอะซีติกที่ความเข้มข้น 10 μM มีผลในการชะลอการเจริญเติบโตของแหนเล็กและแหนใหญ่ ในขณะที่กรดแอบไซซิกและต่าง ๆ ทับทิมส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังไม่พบสารเคมีชนิดใดที่สามารถเหนี่ยวนำให้ แหนออกดอกภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยผู้วิจัยกำลังศึกษาผลของแสงต่อการออกดอกของแหน และพัฒนา กระบวนการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แหนเพื่อใช้พัฒนาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์และการแปลงพันธุ์ในแหนต่อไป

2. ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการฯ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและมีทรัพยากรที่สามารถนำมาใช้วิจัยเพื่อการพัฒนา นวัตกรรมทางชีวภาพได้มาก แต่เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศกำลังพัฒนา แหล่งเงินทุนในการวิจัยจึงมีอยู่ จำกัด และขีดความสามารถในการวิจัยจึงมีอาจเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้วได้ ซึ่งประเทศเหล่านี้จะ เน้นการวิจัยพื้นฐานเพื่อเป็นแหล่งข้อมูลในการทำวิจัยประยุกต์ต่อไป ดังนั้นเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืนและ เหมาะสมกับประเทศไทย การพัฒนาความรู้พื้นฐานควบคู่ไปกับการนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ จึงมีความ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะทำให้ประเทศไทยสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นได้

ปัจจุบันงานวิจัยพื้นฐานทางด้านพืชจะเน้นไปที่พืชต้นแบบคือ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งจัดเป็น วัชพืชบกและขึ้นในสภาพอากาศที่เย็น ข้อได้เปรียบของ *Arabidopsis* คือ มีขนาดเล็กและยังมีขนาดของของจี โนม (genome) เล็กกว่าพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่น เจริญเติบโตเร็วโดยใช้เวลาประมาณ 3 เดือนในแต่ละรุ่น นอกจากนี้ *Arabidopsis* ยังมีแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมและมีการพัฒนากระบวนการทางพันธุวิศวกรรมที่ สมบูรณ์ที่สุด ทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่เลือก *Arabidopsis* เป็นต้นแบบในการศึกษากระบวนการทางชีววิทยาและ ชีวเคมีในพืช แต่ข้อเสียของ *Arabidopsis* คือไม่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อการประยุกต์ใช้ได้ และเจริญเติบโตได้ ในสภาพอากาศเย็นเท่านั้น ดังนั้นการวิจัยพื้นฐานโดยใช้ *Arabidopsis* จึงไม่เหมาะสมกับการพัฒนาทาง วิทยาศาสตร์ของประเทศไทย

ในทางตรงข้าม แหน (duckweed) ซึ่งเป็นวัชพืชน้ำที่พบทั่วไปในประเทศไทย มีความเหมาะสมในการ นำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นพืชต้นแบบในประเทศไทย กล่าวคือแหนซึ่งจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นพืชดอกที่เล็ก ที่สุด สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและเร็วกว่า *Arabidopsis* นอกจากนี้องค์ประกอบของเนื้อเยื่อไม่มีความ สลับซับซ้อน อีกทั้งยังมีขนาดจีโนมใกล้เคียงกับ *Arabidopsis* แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็วในเขตร้อน ดังนั้นพืชตระกูลแหน (*Lemnaoideae*) จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นพืชต้นแบบเพื่อใช้ใน การศึกษาทางชีววิทยาของเซลล์ โครงสร้างและสรีรวิทยาของพืช อณูชีววิทยา ชีวเคมี รวมไปถึงการนำองค์ ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพในประเทศไทย

ดังนั้นการพัฒนาแหนใหญ่เพื่อเป็นพืชต้นแบบจึงมีความสำคัญสำหรับการพัฒนาการเรียนการสอน ทางด้านชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืชในประเทศไทย และเพื่อการรองรับข้อมูลทางพันธุกรรมของ แหนที่สามารถนำไปใช้ในการทำวิจัยเชิงลึกและวิจัยเชิงประยุกต์ต่อไปในอนาคต

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 3.1. ศึกษาชีววิทยาของแหนในระดับต่างๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในการเรียนการสอนทางด้านพืชในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล และใช้เป็นพืชต้นแบบในการทำวิจัยพื้นฐาน
- 3.2. พัฒนาการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกสายพันธุ์แหนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทำวิจัยเชิงลึกหรือการทำวิจัยเชิงประยุกต์
- 3.3. พัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อรองรับการประยุกต์ใช้กับข้อมูลรหัสพันธุกรรมของแหน และการปรับปรุงพันธุ์

4. ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ประกอบไปด้วยโครงการวิจัยย่อยสามส่วนที่เกี่ยวข้องกัน

- 4.1. การศึกษาวิจัยในเชิงชีววิทยาของแหน โดยจะมีการนำแหนแต่ละชนิดมาศึกษาโครงสร้างทางชีววิทยาทั้งในระดับเนื้อเยื่อและในระดับเซลล์ มีการศึกษาวงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ รวมถึงการศึกษาทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา
- 4.2. การพัฒนาการนำแหนเข้ามาเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง เพื่อการควบคุมตัวแปรต่างๆ และมีการปรับปรุงอาหารเลี้ยง อณูหภูมิ และแสง ที่เป็นระบบ โดยจะมีการคัดเลือกสายพันธุ์แหนที่เหมาะสมในการใช้ประโยชน์ในการทำวิจัยเชิงลึกหรือวิจัยเชิงประยุกต์ต่อไป
- 4.3.. การพัฒนาเทคนิคกระบวนการเปลี่ยนสภาพแหน (transformation) ที่เหมาะสมประหยัด และเป็นระบบเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์หรือคัดเลือกพันธุ์แหนโดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หรือเทคนิคการกลายพันธุ์ (mutation) ต่อไป โดยคาดว่าจะสามารถพัฒนาแหนต้นแบบที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอาหาร พลังงานหรือสิ่งแวดล้อมได้ภายในระยะเวลาโครงการ 2-3 ปี

5. วิธีการดำเนินการวิจัย

5.1. การเก็บตัวอย่างแหน

ทำการเก็บตัวอย่างแหนจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 ชนิด ได้แก่ แหนใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แหนเล็ก (*Lemna minor*) และไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) จากบริเวณแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาอย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อล้างตะกอนดิน เศษอินทรีย์ และแมลงน้ำหลายชนิดที่

ติดอยู่ตามรากและใบของแหวนใหญ่ออก จากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อล้างไออนอนจากน้ำประปาและตกตะกอนเศษดินที่เหลืออยู่

5.2. การกำจัดสิ่งมีชีวิตที่ปนเปื้อนในแหวน

5.2.1. เตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS; Murashige and Skoog, 1962) โดยทำการทดลองเลี้ยงแหวนในอาหารแข็ง MS ในขวดแก้วมีฝาปิด และมีอาหารเพาะเลี้ยงอยู่ขวดละ 20-25 มิลลิลิตร

5.2.2. ทาวิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดสิ่งมีชีวิตปนเปื้อนในแหวนใหญ่และแหวนเล็ก โดยเริ่มจากการแช่ชิ้นส่วนแหวนใหญ่ที่ตัดรากออกลงในสารฟอกขาวไฮเตอร์ความเข้มข้น 3, 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทั้งหมด 3-5 ครั้งๆละ 5 นาที ตัดแต่งเอาส่วนที่ถูกทำลายออกแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ ความเข้มแสง $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5.2.3. ทาวิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดสิ่งมีชีวิตปนเปื้อนในไขน้ำ โดยเริ่มจากการห่อไขน้ำในผ้าขาวบาง แล้วนำไปแช่ในสารฟอกขาวไฮเตอร์ความเข้มข้น 2 หรือ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือเบตาดีนความเข้มข้น 10 หรือ 20 เปอร์เซ็นต์ หรือทิงเจอร์ไอโอดีนความเข้มข้น 5 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 หรือ 60 วินาที ล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทั้งหมด 3-5 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยให้แสงสว่างด้วย

5.2.4. หลังจากกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนแล้วนำแหวนไปเพาะเลี้ยงที่ หลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 10-14 วัน เพื่อบันทึก ร้อยละการรอดชีวิต และร้อยละการปนเปื้อนตามลำดับ

5.3. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแหวน

5.3.1. เตรียมอาหารเหลว 4 สูตร ได้แก่ อาหารเหลวสูตร MS, Hoagland-E (Cross J, <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/media.htm>), Hoagland-E⁺ (Cowgill and Milazzo, 1989) และ Schenk and Hildebrandt (SH; Schenk and Hildebrandt, 1972) โดยใช้ความเข้มข้นปกติ (1x) หรือที่ครึ่งความเข้มข้น (0.5x) และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม

5.3.2. ถ่ายแหวนปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS เป็นเวลา 7 วันเพื่อปรับสภาพจากนั้นถ่ายแหวนลงในอาหารเหลวแต่ละชนิด โดยแต่ละขวดจะใส่แหวนจำนวน 4-10 ฟรอนต์ ตามขนาดและชนิดของแหวน โดยนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้มแสงประมาณ $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นับจำนวนฟรอนต์ที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 2-3 วัน เป็นเวลา 10-14 วัน

5.3.3. วิเคราะห์การเจริญของแห่นโดยศึกษาระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณ (doubling time) ของฟรอนด์ โดยอาหารที่ให้ค่าระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณน้อยที่สุดแสดงว่าแห่นเจริญในอาหารดังกล่าวได้ดีที่สุด

5.4. การวิเคราะห์การเติบโตของแห่น

เพาะเลี้ยงแห่นในอาหารที่ให้การเจริญเติบโตได้ดี และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคปทุก 12 ชั่วโมง แล้วนำข้อมูลภาพถ่ายมาวิเคราะห์ผลโดยการวัดขนาดของใบโดยใช้โปรแกรม ImageJ (Schneider et al., 2012)

5.5. การเพาะเลี้ยงแห่นใหญ่เพื่อนำมาวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล

5.5.1. เตรียมอาหารเหลว 4 สูตร ได้แก่ อาหารเหลวสูตร MS, E, E⁺ และ SH ใส่กระบะพลาสติกสี่เหลี่ยมจำนวน 6 ใบๆละ 1 ลิตร นำแห่นใหญ่และปहनเล็กปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในกระบะพลาสติกสี่เหลี่ยมที่เตรียมไว้ คลุมด้วยพลาสติกห่ออาหาร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้มแสง $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 14-21 วัน แล้วแต่ชนิดของแห่น

5.5.2. เก็บเกี่ยวแห่นที่เพาะเลี้ยงโดยการกรองผ่านตะแกรงลวดแล้วนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง เพื่อชะล้างสารอาหารที่ติดอยู่กับใบและรากของแห่นใหญ่ออกจากรู้นั้นทิ้งให้สะเด็ดน้ำก่อนนำมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.6. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธีอบลมร้อน

5.6.1. นำถ้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ไปอบไล่ความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากอบเสร็จแล้วรีบนำถ้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้นที่มีสารดูดความชื้นซิลิกา 30 นาที นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปอบซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที จนทราบน้ำหนักที่แน่นอน

5.6.2. ชั่งตัวอย่างแห่นน้ำหนักประมาณ 1-3 กรัม ใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ที่รู้น้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบไล่ความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากอบเสร็จรีบนำถ้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ที่มีตัวอย่างไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ 30 นาที นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งก่อนนำมาอบซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที หรือจนได้น้ำหนักที่แน่นอน

5.6.3. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความชื้นของแห่นใหญ่จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(w_1 - w_2) \times 100}{w_1}$$

เมื่อ $w_1 =$ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

$w_2 =$ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

5.7. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแหวน

5.7.1. สกัดคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างแหวนโดยใช้ตัวอย่างบด 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนตัวอย่างกับสารละลายออกจากกัน เก็บส่วนสารละลายไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

5.7.2. วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน โดยใช้สารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายแอนโทรนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

5.7.3. วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีฟินอลซัลฟิวริกโดยใช้สารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟินอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5.8. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในแหวน

5.8.1. สกัดโปรตีนในตัวอย่างแหวนใหญ่โดยใช้ตัวอย่างแหวนใหญ่บด 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนตัวอย่างกับสารละลายออกจากกัน เก็บส่วนสารละลายไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

5.8.2 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลอร์วี (Lowry's Method) โดยใส่สารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Lowry's reagent 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสาร Folin-Ciocalteu reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

5.8.2 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ bicinchoninic acid (BCA) โดยใส่สารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย BCA reagent 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

5.8.3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาลท์ (Kjeldahl Method) โดยย่อยตัวอย่างแห้ง 2 กรัม ก่อนในหลอดย่อย ซึ่งใช้ซิลิเนียมซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จำนวน 1 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30 มิลลิตร และใส่เม็ดกันเดือด 10 เม็ด ย่อยตัวอย่างในเครื่องย่อยที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ย่อยต่อไปอีก 30 นาที และเพิ่มอุณหภูมิที่ 350 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส หลังจากสารละลายใสย่อยต่ออีก 1 ชั่วโมง แล้วนำสารตัวอย่าง 1 มิลลิตร ไปกลั่นโดยเจ็จาง 200 เท่า ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับ pH เป็น 9.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำการกลั่นเป็นเวลา 8 นาที ไอรระเหยที่ได้จะถูกดักไว้ในขวดรูปชมพู่ที่มีกรดบอริกความเข้มข้น 4% 100 มิลลิตร จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟิวริกจนถึงจุดยุติ นำปริมาตรที่ไทเทรตคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\%P = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}}) \times M_N \times C_{\text{acid}} \times D \times Z \times f_{\text{protein}}}{m_{\text{sample}}} \times 100$$

%P คือ น้ำหนักโปรตีนเป็นร้อยละ

V_{sample} คือ ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับสารตัวอย่าง (ml)

V_{blank} คือ ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับแบลงค์ (ml)

M_N คือ มวลโมเลกุลของไนโตรเจน = 14.0067 (g/mol)

C_{acid} คือ ความเข้มข้นของกรดในหน่วยโมลต่อลิตร (M)

Z คือ ปริมาณการแตกตัวของกรด

D คือ จำนวนเท่าที่เจือจางตัวอย่าง

F_{protein} คือ ค่าโปรตีนแฟคเตอร์คิดจากในตัวอย่างส่วนใหญ่ น้ำหนักไนโตรเจนมีประมาณ

16% ของน้ำหนักโปรตีนค่าโปรตีนแฟคเตอร์จึงมีค่า $= \frac{100\%}{16\%} = 6.25$

M_{sample} คือ น้ำหนักตัวอย่าง (mg)

5.9. การศึกษาสารเคมีที่มีผลในการเหนี่ยวนำให้เหนียวใหญ่ออกดอก

5.9.1. เตรียมอาหารเหลวสูตร MS หรือ PS; Pirson-Seidel (Pirson and Seidel, 1950) ที่มีกรดซาลิไซลิก, กรดแอสไซติก, กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก, กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก หรือ ต่างทับทิม ที่มีความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

5.9.2. นำเหนียวที่ได้จากการเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 30 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารเคมีดังกล่าว โดยนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้มของแสง $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 15 วัน

5.9.3. บันทึกการแตกใบใหม่ การเจริญเติบโตและการออกดอกของเหนียว โดยถ่ายรูปเหนียว ทุกๆ 3 วัน นาน 15 วัน แล้วนำข้อมูลภาพถ่ายของเหนียวมาวิเคราะห์ผลโดยการวัดพื้นที่ใบ โดยใช้โปรแกรม Imagej เพื่อศึกษาระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบและพื้นที่ใบ โดยระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ แสดงถึงการเจริญ (development) และระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบแสดงถึงการเติบโต (growth)

5.10. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเหนียว

5.10.1. สุ่มตัวอย่างเหนียวที่ต้องการวิเคราะห์มาถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป เพื่อศึกษาโครงสร้างภายนอก

5.10.2. นำเหนียวใหญ่ และเหนียวเล็กตัวอย่าง ไปตัด เพื่อวัดความหนา และใช้ไขน้ำทั้งต้นเพื่อส่องดูโครงสร้างปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.10.3. วัดความกว้าง ความยาวของใบ ขนาดของปากใบและจำนวนปากใบโดยใช้โปรแกรม Image J

5.11. การตรวจสอบชนิดของเหนียวโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.11.1. การออกแบบไพรเมอร์ ทำได้โดยหาข้อมูลคลอโรพลาสต์จีโนมที่สนใจของเหนียวใหญ่ เหนียวเล็ก และไขน้ำ ในฐานข้อมูล <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> โดยกำหนดค่าขนาดไพรเมอร์ 20 – 22 bp, T_m

50 – 60 , % Gc 50 - 60 , ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 1000-1200 bp จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาตรวจสอบโดยการ blast กับฐานข้อมูล NCBI

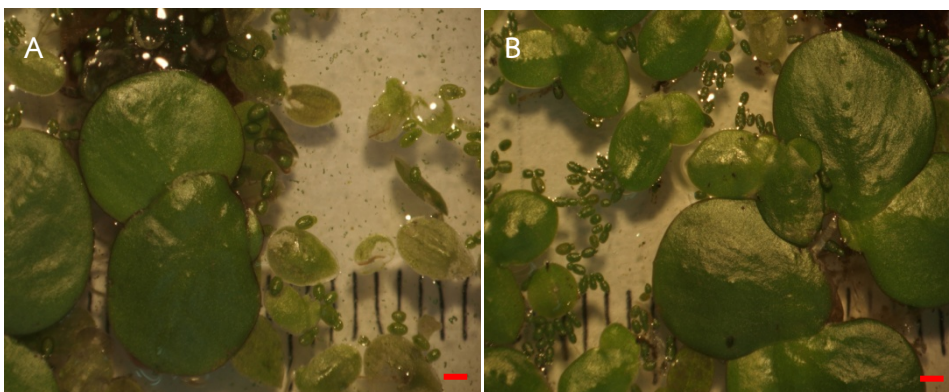
5.11.2. การสกัดคลอโรพลาสต์จีโนมจากแห่น ทำได้โดยนำแห่นมา 1-2 กรัม ทำความสะอาดและเอารากออก บดให้ละเอียดใน Edwards Buffer (Edwards et al., 1991) นำไปปั่นที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสมาผสมกับ isopropanol ในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เติสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ที่ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

5.11.3. เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ Taq DNA Polymerase (PL1202, Vivantis) และไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ และใช้รอบ PCR ดังต่อไปนี้ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ทั้งหมด 40 รอบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไปรีนเจลที่ความเข้มข้นวุ้น 1% ใน TAE buffer (Tris-Acetate EDTA) pH 8.0

6. ผลการวิจัย

6.1. ชนิดของแห่นที่พบในแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพา

จากการสำรวจทางด้านชีววิทยาในแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาพบการกระจายตัวของแห่น 3 ชนิด ในบริเวณมหาวิทยาลัยบูรพา (รูปที่ 1) ได้แก่ แห่นใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แห่นเล็ก (*Lemna minor*) และไข่น้ำ (*Wolffia globosa*)

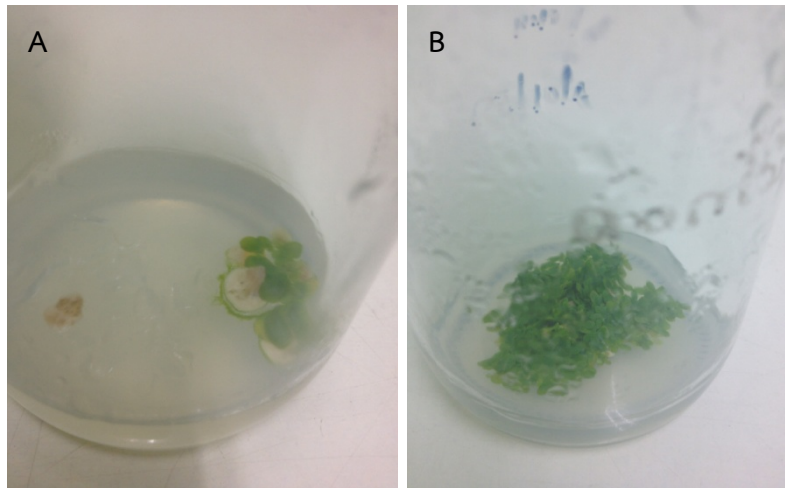


รูปที่ 1. แห่นชนิดต่างๆที่เก็บได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติภายในมหาวิทยาลัยบูรพา (A) บ่อน้ำบริเวณหอพระโรงเรียนสาธิต พิบูลบำเพ็ญ (B) บ่อน้ำบริเวณหลังตึกเคมี คณะวิทยาศาสตร์ โดยพบว่าแห่นใหญ่ (*Spirodela*

polyrhiza) จะมีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 1 ซม. ในขณะที่แหนเล็ก (*Lemna minor*) จะมีขนาด 2-3 มม. และไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มม. (สเกลบาร์ = 1 มม.)

6.2. การกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหน

แหนที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีการปนเปื้อนจาก สาหร่าย และจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตที่ติดมากับราก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สาหร่ายและจุลินทรีย์เหล่านั้นจะส่งผลให้แหนมีสถานะที่ไม่ปลอดภัย (รูปที่ 2) ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดสิ่งมีชีวิตที่ปนเปื้อนนั้นด้วยด้วยสารฟอกขาว (Bleach) ทิงเจอร์ไอโอดีนหรือเบตาดีนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน



รูปที่ 2. แหนที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 7-14 วัน

A) แหนที่มีการปนเปื้อน B) แหนที่ปลอดภัยการปนเปื้อน

6.2.1. แหนใหญ่

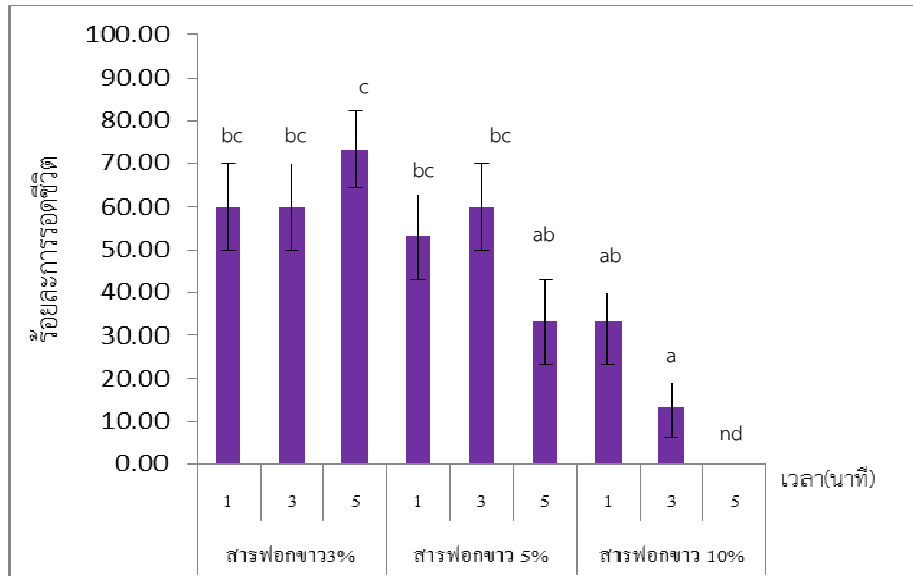
6.2.1.1 ร้อยละการรอดชีวิต

จากการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหนใหญ่ด้วยสารฟอกขาว และทิงเจอร์ไอโอดีนที่เวลาและความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า เมื่อใช้สารฟอกขาว ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที มีอัตราการรอดชีวิตของแหนใหญ่สูงที่สุดร้อยละ 73.33 (รูปที่ 3) ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของทิงเจอร์ไอโอดีนที่ร้อยละ 50, 75 และ 100 เป็นเวลา 1, 3 หรือ 5 นาที ไม่พบการรอดชีวิตของแหนใหญ่

6.2.1.2 ร้อยละการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

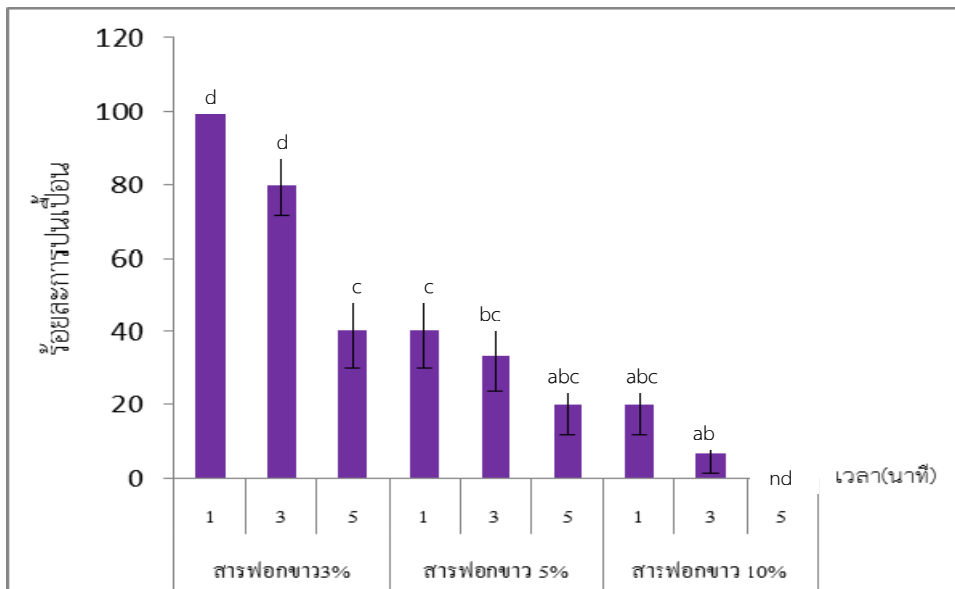
จากการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหนใหญ่ด้วยสารฟอกขาว และทิงเจอร์ไอโอดีนที่เวลาและความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่าเมื่อใช้สารฟอกขาวความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 3 นาที พบการปนเปื้อนน้อยสุด

เท่ากับร้อยละ 6.67 (รูปที่ 4) ในขณะที่การกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนความเข้มข้นร้อยละ 50, 75 และ 100 ไม่พบการปนเปื้อนและไม่พบการรอดชีวิต



รูปที่ 3. การรอดชีวิตของแห่นใหญ่ที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยสารฟอกขาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน (บาร์ = SD; nd = ไม่พบการรอดชีวิต)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4. การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในแห่นใหญ่ที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยสารฟอกขาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน (บาร์ = SD; nd = ไม่พบการรอดชีวิต)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

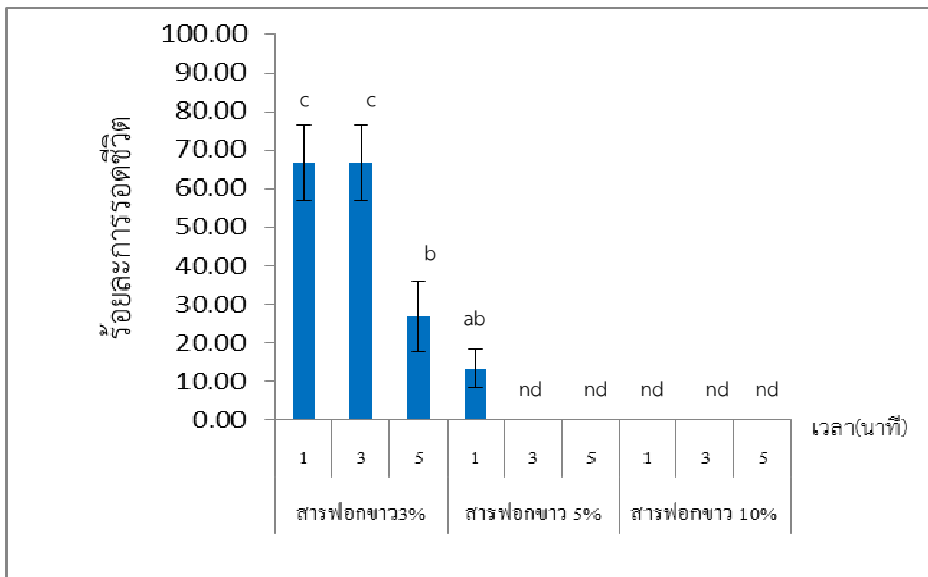
6.2.2. แหน่เล็ก

6.2.2.1 ร้อยละการรอดชีวิต

จากการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหน่เล็กด้วยสารฟอกขาว และทิ้งเจอร์ไอโอดีนที่เวลาและความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า เมื่อใช้สารฟอกขาวที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 1 นาที หรือ 3 นาที มีการรอดชีวิตของแหน่เล็กสูงที่สุดร้อยละ 66 (รูปที่ 5) ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นทิ้งเจอร์ไอโอดีนร้อยละ 50, 75 และ 100 ไม่พบการรอดชีวิตของแหน่เล็ก

6.2.2.2 ร้อยละการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

จากการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหน่เล็กด้วยสารฟอกขาว และทิ้งเจอร์ไอโอดีนที่เวลาและความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่าเมื่อใช้สารฟอกขาวความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 3 นาที พบการปนเปื้อนน้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 6.67 (รูปที่ 6) ในขณะที่การกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนด้วยทิ้งเจอร์ไอโอดีนความเข้มข้นร้อยละ 50, 75 และ 100 ไม่พบการปนเปื้อน และไม่พบการรอดชีวิต



รูปที่ 5. การรอดชีวิตของแหน่เล็กที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยสารฟอกขาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน (บาร์ = SD; nd = ไม่พบการรอดชีวิต)

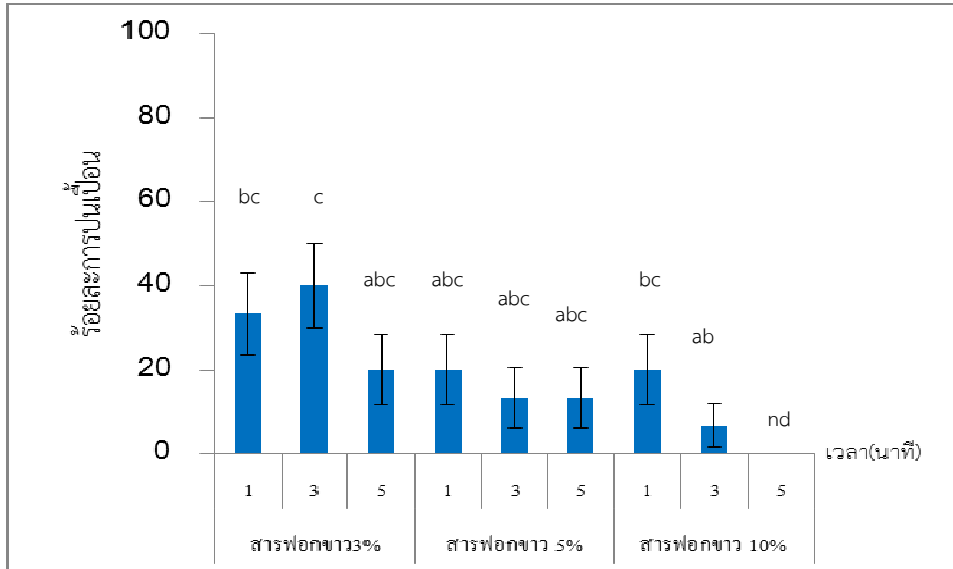
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.2.3. ไข่น้ำ

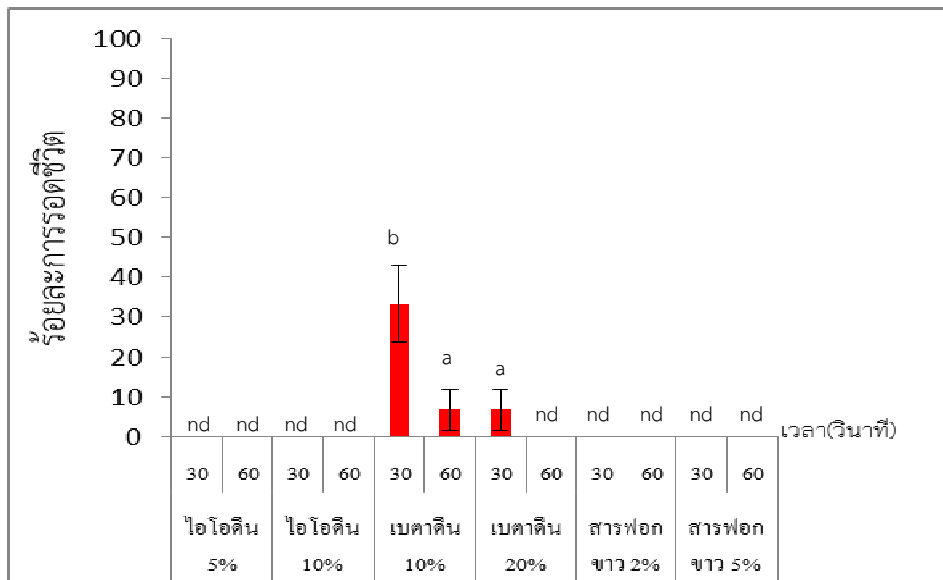
6.2.3.1 ร้อยละการรอดชีวิต

จากการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในไข่น้ำด้วยสารฟอกขาว เบตาดีน และทิ้งเจอร์ไอโอดีนที่เวลาและ

ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเมื่อใช้เบตาดีนความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 วินาทีที่มีการรอดชีวิตของไข่น้ำสูงที่สุดร้อยละ 33 (รูปที่ 7) ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารฟอกขาวที่ร้อยละ 2 และ 5 หรือทิงเจอร์ไอโอดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 ที่เวลา 30 หรือ 60 วินาที ไม่พบการรอดชีวิตของไข่น้ำ



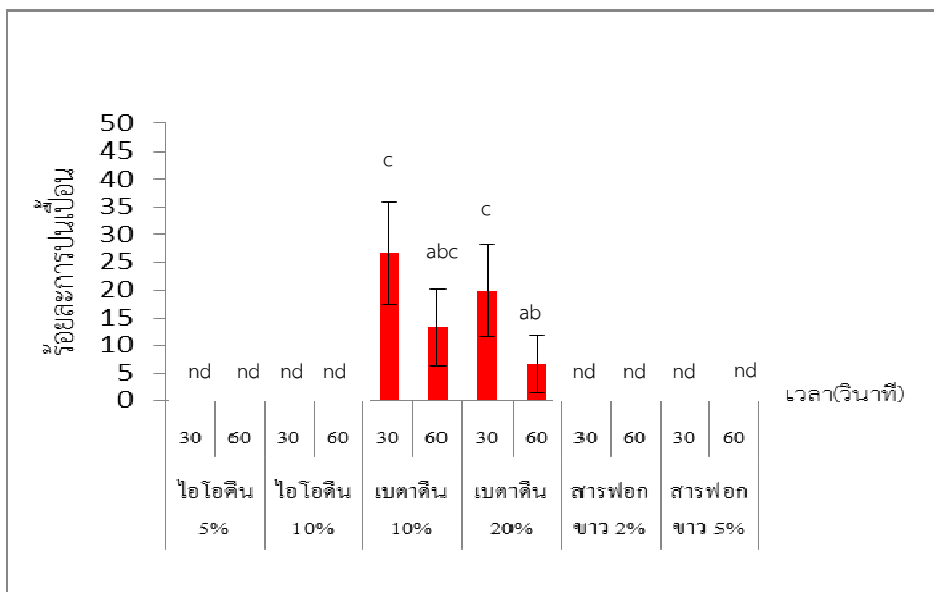
รูปที่ 6. การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในแหล่งที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยสารฟอกขาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน (บาร์ = SD; nd = ไม่พบการรอดชีวิต)
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 7. การรอดชีวิตของไข่น้ำที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยไอโอดีน เบตาดีน สารฟอกขาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน (บาร์ = SD; nd = ไม่พบการรอดชีวิต)
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.2.3.2 ร้อยละการปนเปื้อน

จากการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในไข่น้ำด้วยสารฟอกขาว เบตาดีน และทิงเจอร์ไอโอดีนที่เวลาและความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่าเมื่อใช้เบตาดีนความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 60 วินาที พบการปนเปื้อนน้อยสุดเท่ากับร้อยละ 6.67 (รูปที่ 8) ในขณะที่เมื่อใช้สารฟอกขาวความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 5 และทิงเจอร์ไอโอดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 เป็นเวลา 30 วินาที และ 60 วินาที ไม่พบการปนเปื้อน และไม่พบการรอดชีวิต

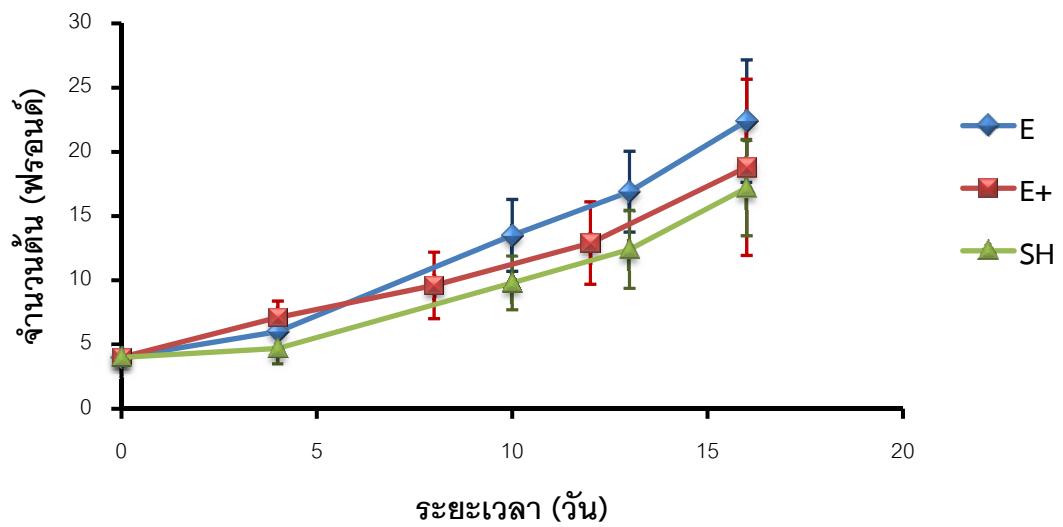


รูปที่ 8. การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในไข่น้ำที่ผ่านการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยไอโอดีน เบตาดีนและสารฟอกขาว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS เป็นเวลา 7 วัน (บาร์ = SD; nd = ไม่พบการรอดชีวิต) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

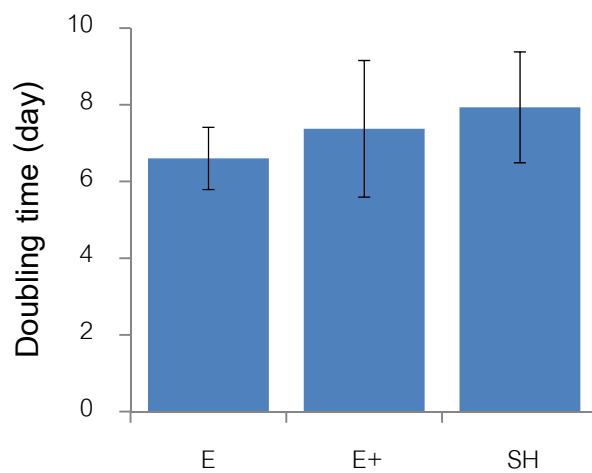
6.3. การเจริญของเห็บในห้องปฏิบัติการ

6.3.1. เห็บใหญ่

เมื่อนำเห็บใหญ่ที่ปราศจากเชื้อมาเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเหลว 3 สูตร ได้แก่ Hoagland-E (E), Hoagland-E+ (E+) หรือ Schenk and Hildebrandt (SH) พบว่าเห็บใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด (รูปที่ 9) โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนทวีคูณ (doubling-time) ในเวลา 6.6 วัน (รูปที่ 10) มีพื้นที่ฟรอนด์เฉลี่ย 28.8 ตารางมิลลิเมตร และความยาวรากเฉลี่ย 13.8 มิลลิเมตร (รูปที่ 11) ภายในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วัน ในขณะที่เห็บใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E⁺ มีการสร้างทิวเรียนจำนวนมากเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน (รูปที่ 12)

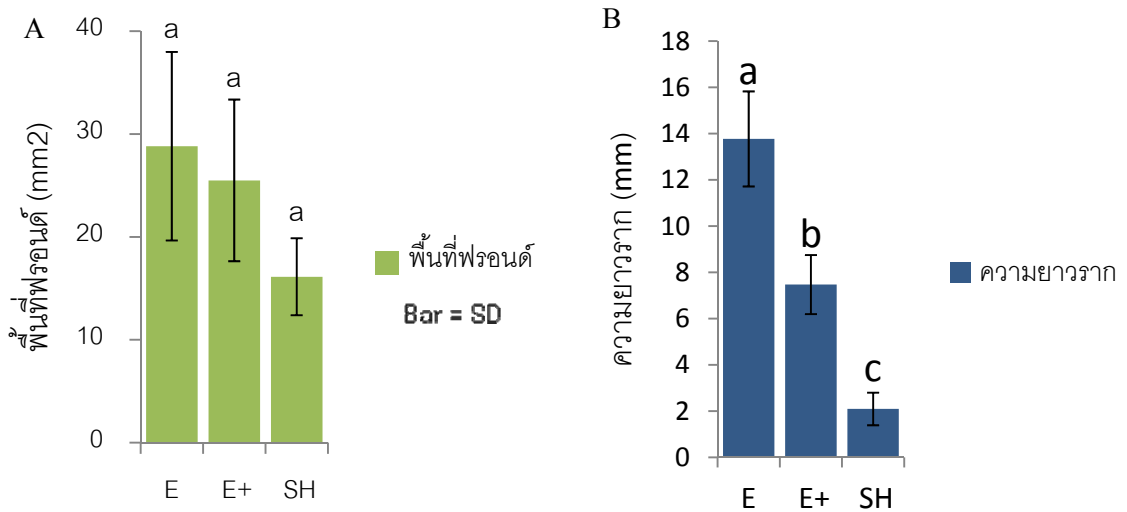


รูปที่ 9. การเจริญเติบโตของหนอนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร E, E+ หรือ SH (บาร์ = SD)

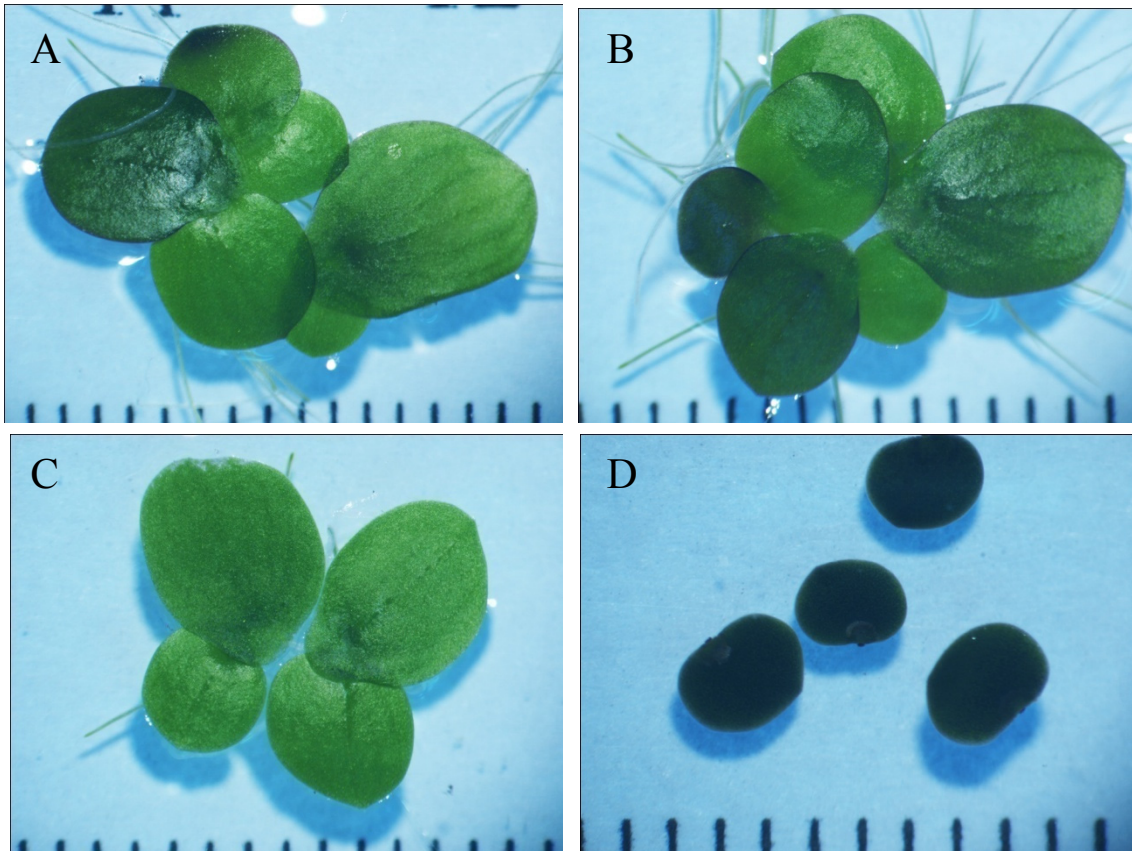


รูปที่ 10. อัตราการเพิ่มจำนวนตัวของคุณของหนอนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 15 วัน (บาร์ = SD)

หมายเหตุ : ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

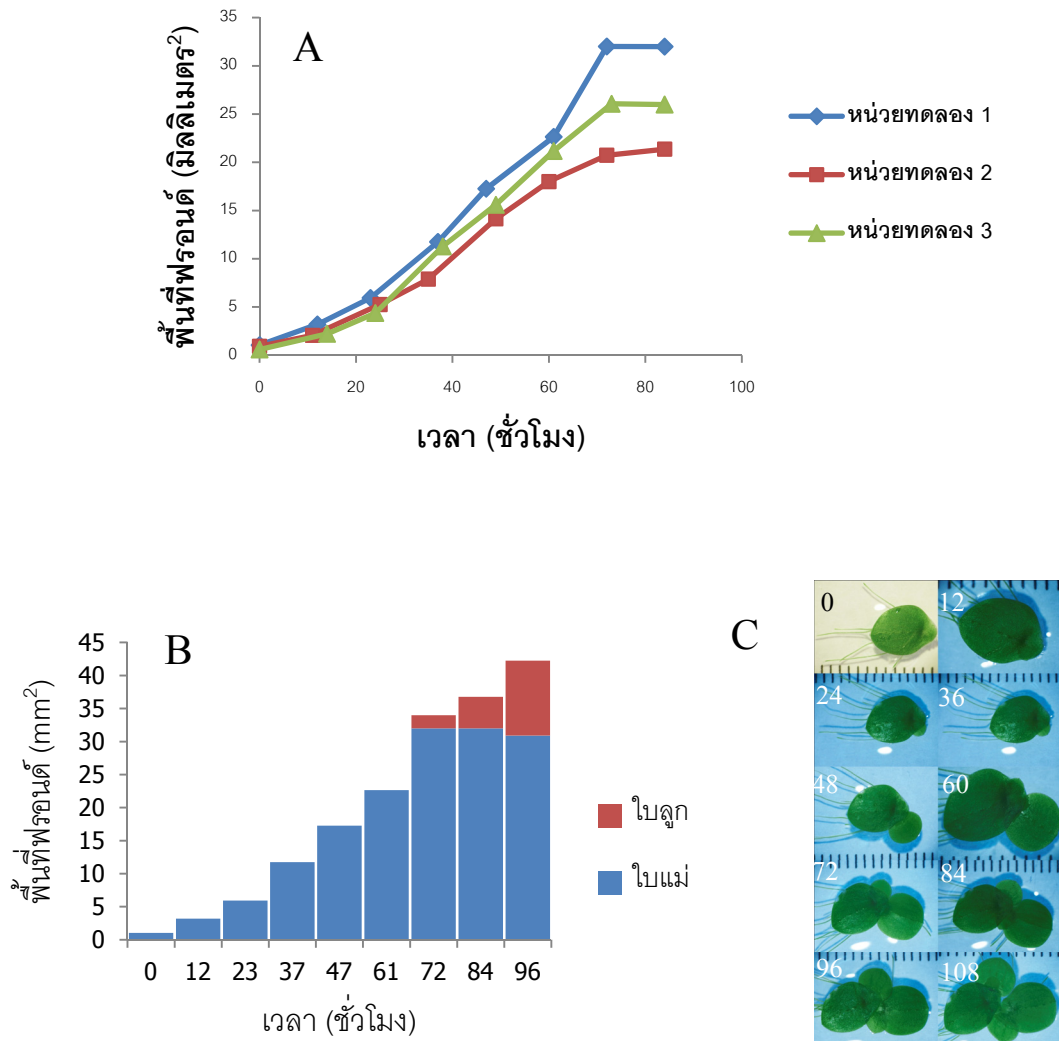


รูปที่ 11. เปรียบเทียบพื้นที่ฟรอนด์ (A) และความยาวราก (B) ของแหนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 15 วัน (บาร์ = SD)
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 12. ลักษณะภายนอกของแหนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 30 วัน ใน A) อาหารสูตร E B) อาหารสูตร E+ C) อาหารสูตร SH และ D) Turions ที่พบในอาหารสูตร E+ 45 วัน (สเกล = 1 มม.)

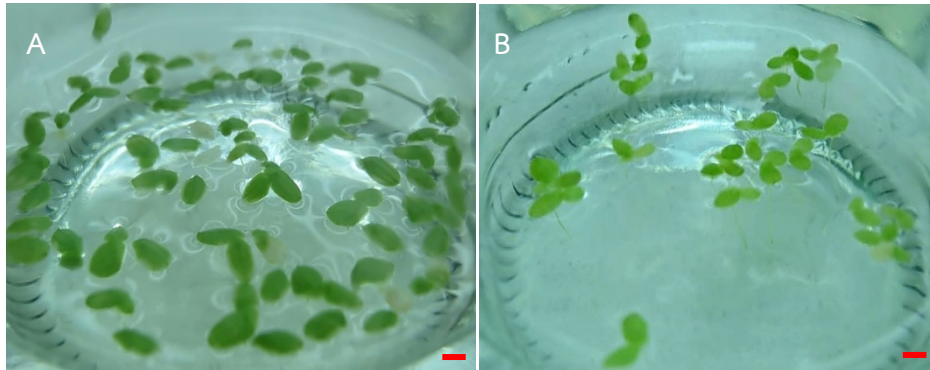
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร E โดยการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอไมโครสโคป โดยเริ่มต้นเพาะเลี้ยงที่ 1 พรอนต์พบว่าพรอนต์เริ่มแรกจะไม่มี การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น พรอนต์ที่แตกออกมาใหม่จะเจริญเติบโตเต็มที่ในระยะเวลาเฉลี่ย 72 ชั่วโมง (รูปที่ 13) และ เกิดรากภายในระยะเวลาเฉลี่ย 48 ชั่วโมง และเริ่มแตกต้นใหม่ทันทีในชั่วโมงที่ 72



รูปที่ 13. การเจริญเติบโตของแหวนใหญ่ (A) และการแตกต้นใหม่ของแหวนใหญ่ (B) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 96 ชม. ในอาหารสูตร E ซึ่งสอดคล้องกับภาพถ่ายการเจริญเติบโตของแหวนใหญ่ทุกๆ 12 ชม. เป็นเวลา 108 ชม. (C) (สเกล = 1 มม.)

6.3.2. แหน่เล็ก

จากการเพาะเลี้ยงแหน่เล็ก (*Lemna minor*) ในอาหารเหลว 4 สูตร ได้แก่ Murashige & Skoog (MS), Hoagland-E (E), Hoagland-E+ (E+) หรือ Schenk and Hildebrandt (SH) ที่สองความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นปกติ (1x) กับความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (0.5x) พบว่าแหน่เล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแต่ละสูตรมีลักษณะสีของแผ่นใบที่แตกต่างกัน (รูปที่ 14) และมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันซึ่งจำแนกได้ดังนี้



รูปที่ 14. ลักษณะสีของแหน่เล็กที่แตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ในอาหาร (A) สูตร E และ (B) สูตร SH (สเกลบาร์ = 2 มม.)

6.3.2.1. แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E ความเข้มข้นปกติ มีลักษณะแผ่นใบสีเขียวเป็นจำนวนมาก ซึ่งพบมากกว่าชุดควบคุม โดยใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 2.7 วัน มีจำนวนฟรอนด์เฉลี่ย 177.78 ฟรอนด์ (รูปที่ 15)

6.3.2.2 แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SH ความเข้มข้นปกติ มีลักษณะแผ่นใบสีเขียวมากกว่าชุดควบคุม และแผ่นใบขาวซีดน้อยกว่าชุดควบคุม ใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 2.9 วันและมีจำนวนฟรอนด์เฉลี่ย 130.67 ฟรอนด์ (รูปที่ 15)

6.3.2.3 แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ความเข้มข้นปกติ มีลักษณะแผ่นใบสีเขียวจำนวนมาก และแผ่นใบขาวซีดพบมากกว่าชุดควบคุม ใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 2.8 วัน และมีจำนวนฟรอนด์เฉลี่ย 131.78 ฟรอนด์

6.3.2.4 แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E⁺ ความเข้มข้นปกติ มีลักษณะแผ่นใบสีเขียวจำนวนมากกว่าชุดควบคุม และมีแผ่นใบขาวซีดน้อยกว่าชุดควบคุม ใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 3.0 วัน มีจำนวนฟรอนด์เฉลี่ย 144.44 ฟรอนด์

6.3.2.5 แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) มีลักษณะแผ่นใบสีเขียวน้อยที่สุด แต่ใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณมากที่สุดและจำนวนฟรอนด์เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 5.4 วัน และ 42.56 ฟรอนด์ ตามลำดับ

6.3.2.6 แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS, SH, E และ E⁺ ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง มีลักษณะใบสีเขียวมากกว่าชุดควบคุม แต่แหน่เล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ SH ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง มีจำนวนแผ่นใบขาวซีดที่มากกว่าชุดควบคุม และใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 3.67, 2.67, 2.57 และ 2.78 วัน ตามลำดับ มีจำนวนฟรอนด์เฉลี่ย 84.67, 78.33, 158.89 และ 166.44 ฟรอนด์ ตามลำดับ

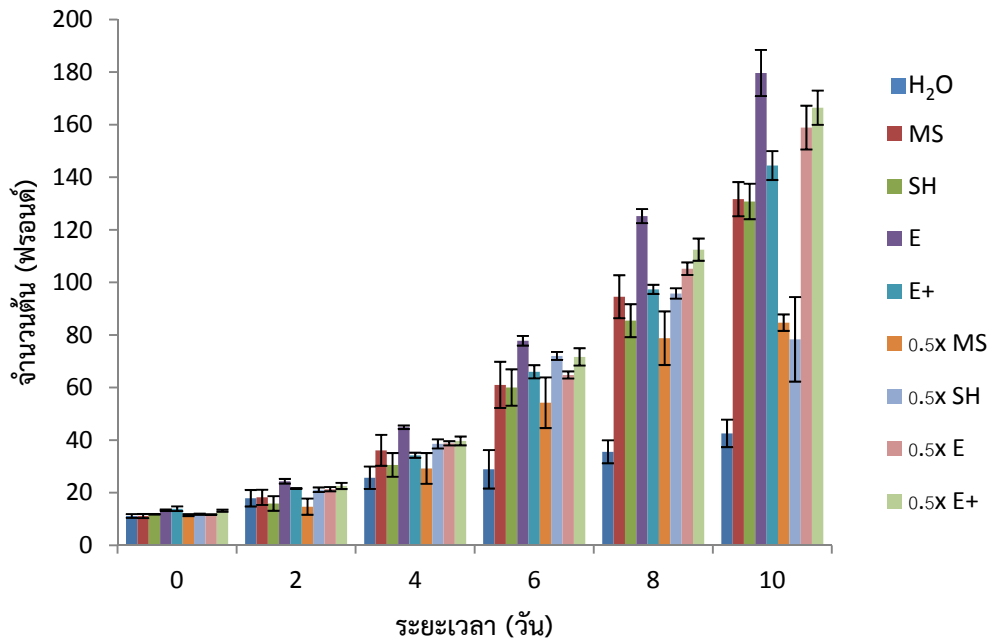
6.3.2.7 แหน่เล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ SH ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง มีลักษณะแผ่นใบขาวซีดมากที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารเหลวสูตรอื่นๆและชุดควบคุม (รูปที่ 16) และใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 3.67 และ 2.67 วัน ตามลำดับ โดยมีจำนวนแผ่นใบขาวซีด คือ 19.56 และ 41.44 ฟรอนด์ ตามลำดับ

เมื่อทดสอบด้วยวิธี Tukey HSD ให้ผลทดสอบว่า แหน่เล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ SH ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งมีจำนวนแผ่นใบขาวซีดมากที่สุด (ตารางที่ 1) และแหน่เล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณมากกว่าแหน่เล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรอื่นๆ และแหน่เล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทุกสูตรใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 17)

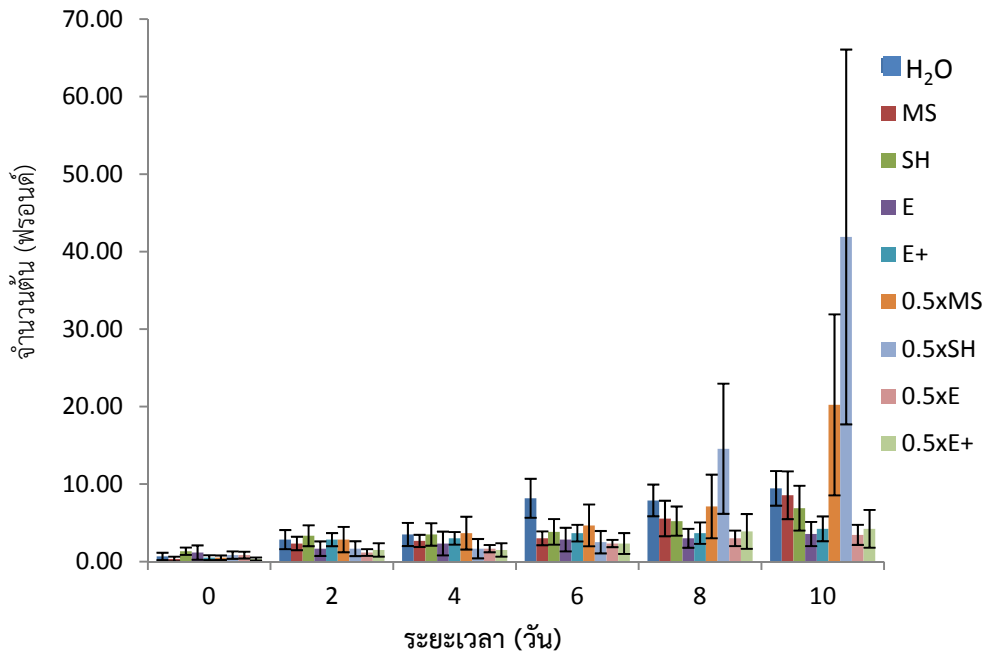
ตารางที่ 1. ลักษณะไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 10 วัน (n = 10)

สูตรอาหาร	ลักษณะแผ่นใบ (ใบ)	
	สีเขียว	สีขาวซีด
H ₂ O	42.33±9.53 ^a	9.11±3.62 ^a
MS	131.78±27.57 ^b	9.67±5.77 ^a
SH	130.67±25.15 ^b	6.67±5.29 ^a
E	177.78±25.51 ^c	3.22±2.82 ^a
E ⁺	144.44±33.78 ^{b,c}	5.44±3.00 ^a
0.5x MS	84.67±24.20 ^a	19.56±20.45 ^b
0.5x SH	78.33±41.27 ^a	41.44±42.67 ^b
0.5x E	158.89±31.99 ^{b,c}	3.33±2.35 ^a
0.5x E ⁺	166.44±33.31 ^{b,c}	4.22±2.22 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

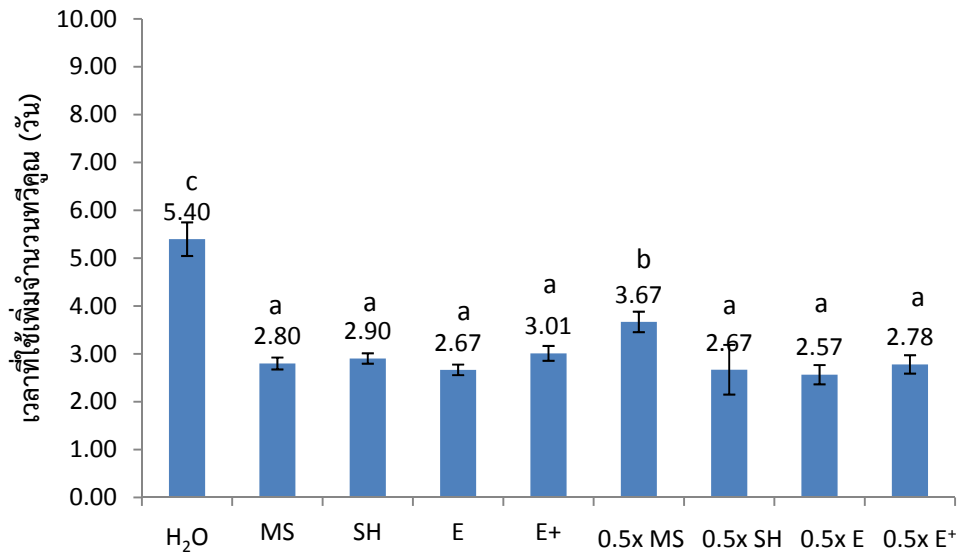


รูปที่ 15. การเพิ่มจำนวนฟรอนต์ของแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 10 วัน (บาร์=SEM)



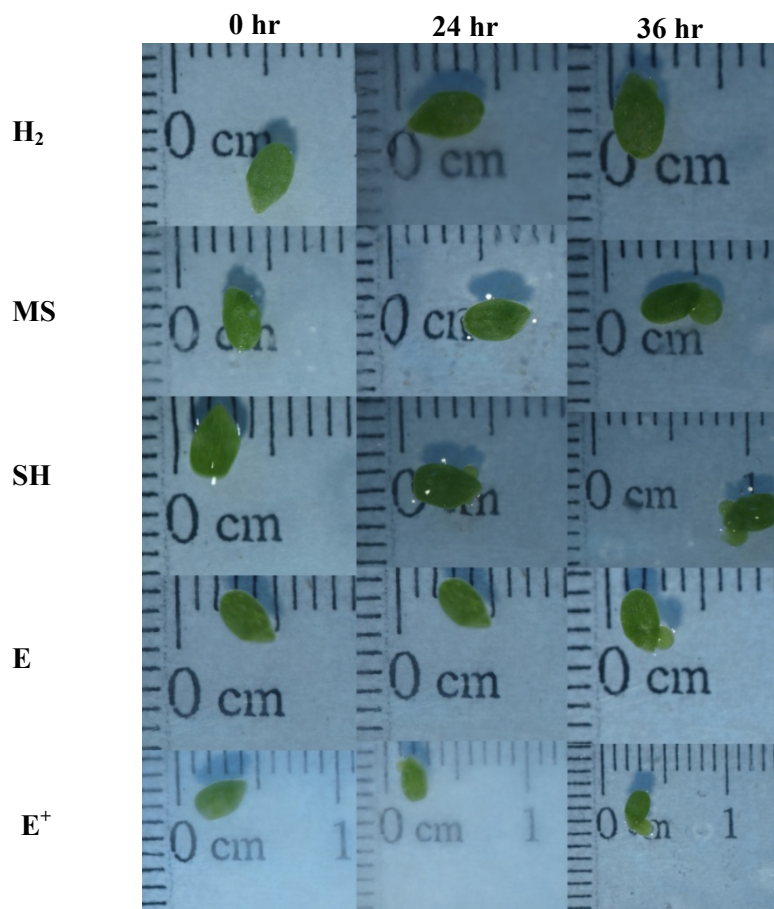
รูปที่ 16. การปรากฏแผ่นใบขาชีวิตของแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 10 วัน (บาร์=SEM)

เมื่อนำแหนเล็กที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 4 สูตร ที่ความเข้มข้นปกติ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 108 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SH และ E⁺ เริ่มมีการแตกฟรอนต์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, E และชุดควบคุมน้ำกลั่น เริ่มมีการแตกฟรอนต์ที่เวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 18)

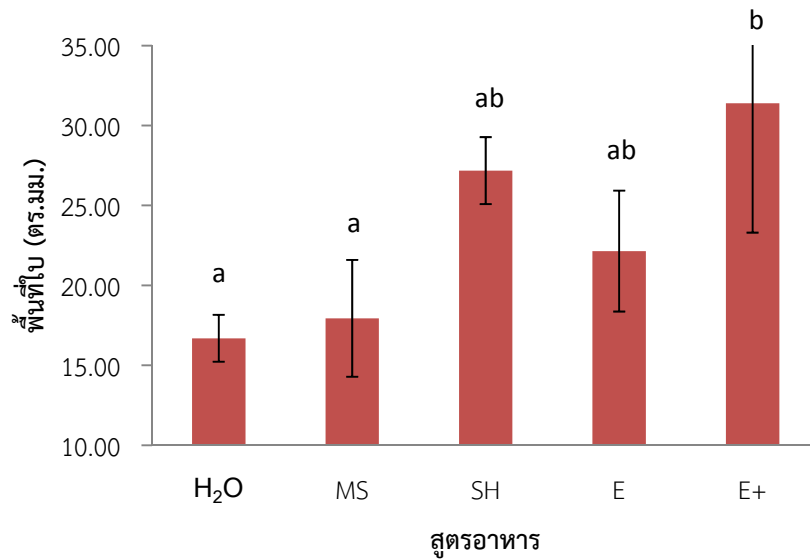


รูปที่ 17. เวลาที่ใช้เพิ่มจำนวนทวีคูณของແນລີ້ກທີ່ພະເລີ້ງໃນห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 10 วัน (บาร = SEM)

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 18. ลักษณะการแตกฟรอนด์ของແນລີ້ກທີ່ພະເລີ້ງໃນห้องปฏิบัติการในระยะเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 19. เปรียบเทียบพื้นที่ใบของหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงอาหารเหลวที่เวลา 108 ชั่วโมง (บาร์=SEM)

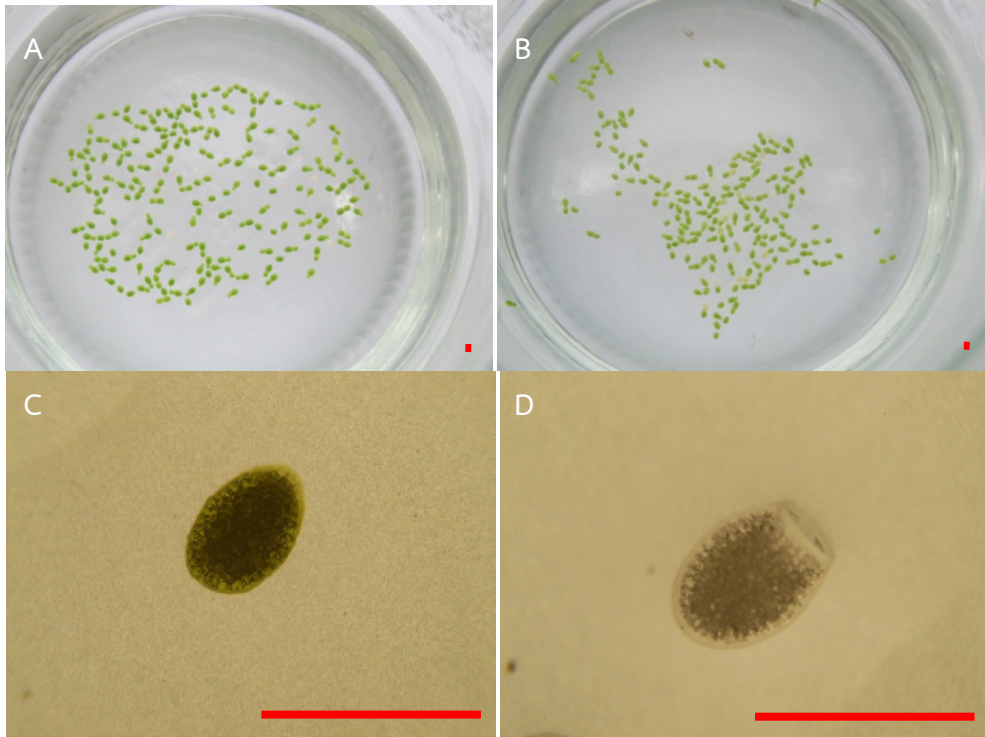
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 4 สูตร ความเข้มข้นปกติ ที่เวลา 108 ชั่วโมง พบว่าหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E⁺ มีพื้นที่ใบมากที่สุดคือ 31.39 ตารางมิลลิเมตร ในขณะที่หน่อเล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, SH และ E มีพื้นที่ใบเท่ากับ 17.93, 27.18 และ 22.14 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 19) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมน้ำกลั่น มีพื้นที่ใบ 16.69 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งมีพื้นที่ใบน้อยที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan ให้ผลทดสอบว่า หน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E⁺ มีพื้นที่ใบมากกว่าหน่อเล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ

6.3.3. ไข่น้ำ

จากการเพาะเลี้ยงไข่น้ำ ในอาหารเหลว 4 สูตร ได้แก่ Murashige & Skoog (MS), Hoagland-E (E), Hoagland-E+ (E+) หรือ Schenk and Hildebrandt (SH) ที่สองความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นปกติ (1x) กับความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (0.5x) เป็นเวลา 14 วัน พบว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแต่ละสูตรมีลักษณะสีของแผ่นใบที่แตกต่างกัน (รูปที่ 20) และมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันซึ่งจำแนกได้ดังนี้

4.2.1 ไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) มีลักษณะฟรอนด์สีเขียวอ่อนกว่าอาหารเหลวสูตรอื่น และใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณมากที่สุด คือ 4.23 วัน

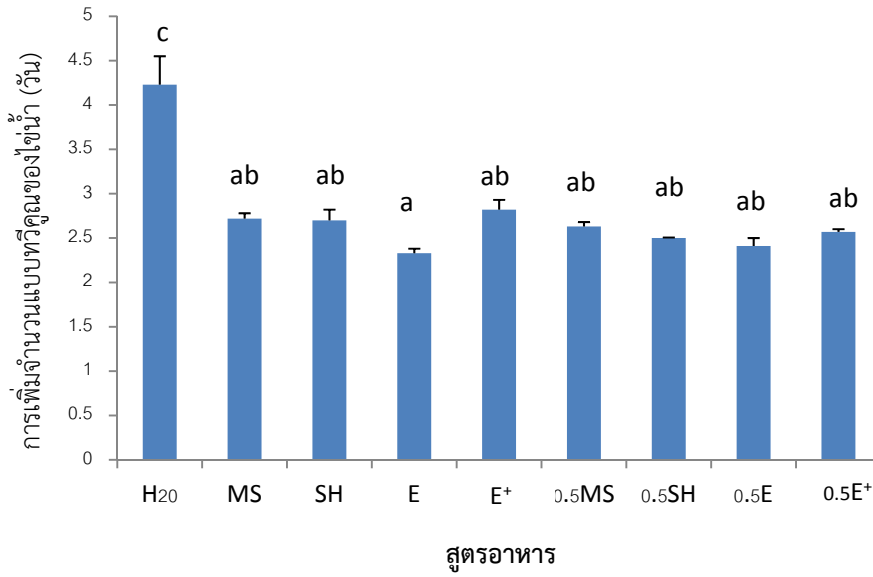


รูปที่ 20. ลักษณะสีของใบที่แตกต่างกันของไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 14 วัน ใน (A) อาหารเหลวสูตร E (B) อาหารเหลวสูตร E⁺ (C) ฟรอนต์สีเขียว (D) ฟรอนต์สีขาวยืด (สเกลบาร์ = 1 มม.)

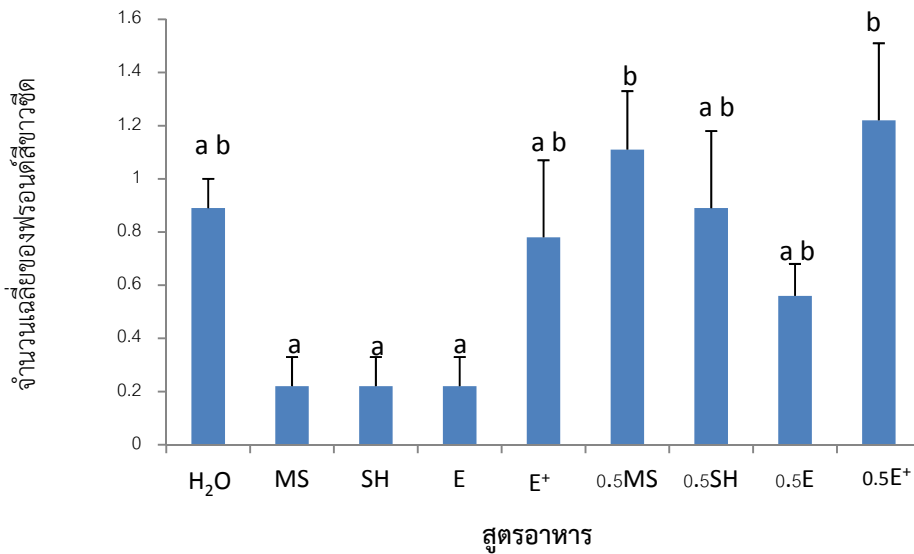
4.2.2 ไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ ที่ความเข้มข้นปกติ (1x) มีลักษณะฟรอนต์สีเขียวมากกว่าชุดควบคุม และมีฟรอนต์สีขาวยืดน้อยกว่าชุดควบคุม โดยใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 2.72, 2.70, 2.33 และ 2.82 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 21)

4.2.3 ไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ ที่ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (0.5x) มีลักษณะฟรอนต์สีเขียวมากกว่าชุดควบคุม โดยใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่ 2.63, 2.50, 2.41 และ 2.57 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 21) และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ E⁺ ที่ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (0.5x) มีลักษณะฟรอนต์สีขาวยืดมากที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารเหลวสูตร MS, SH และ E (รูปที่ 22) โดยมีฟรอนต์สีขาวยืดเฉลี่ย คือ 3.33 และ 3.67 ฟรอนต์ ตามลำดับ

เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan ให้ผลทดสอบว่า ไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E⁺ และ MS ที่ความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง มีจำนวนฟรอนต์สีขาวยืดมากที่สุด (รูปที่ 22) และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E ที่ความเข้มข้นปกติ ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณน้อยกว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรอื่นๆ และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทุกสูตรใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 21)



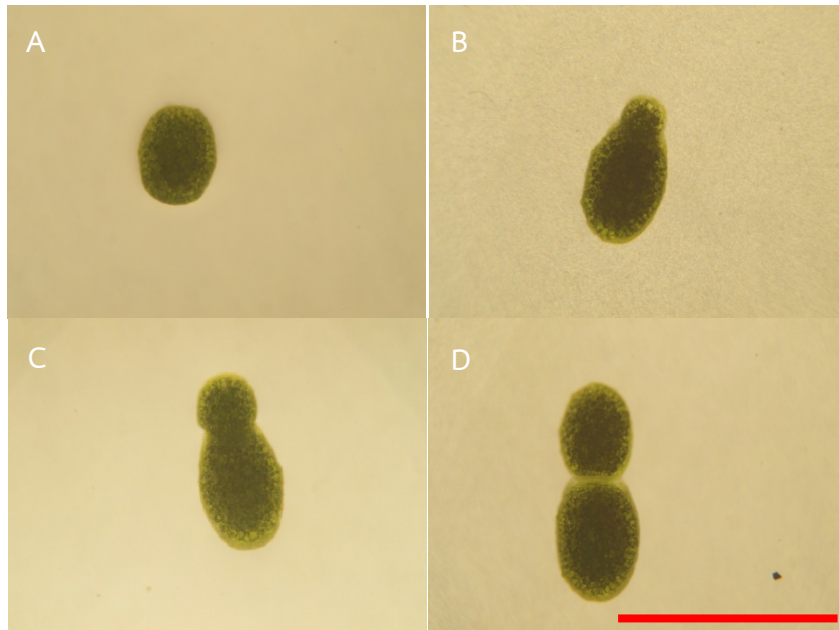
รูปที่ 21. การเพิ่มจำนวนฟรอนด์แบบทวีคูณของไขน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 14 วัน (n = 3) (บาร์=SEM) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 22. การปรากฏฟรอนด์สีขาวซีดของไขน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 14 วัน (n = 3) (บาร์=SEM) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของไขน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าไขน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland E มีการเพิ่มจำนวนฟรอนด์แบบทวีคูณมากที่สุดคือ 2.33 วัน จึงได้นำไขน้ำที่ปราศจากการปนเปื้อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland E (E) ที่ความ

เข้มชั้นปกติ เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยเริ่มต้นจาก 1 ฟรอนต์ พบว่ามีการเพิ่มจำนวนฟรอนต์เป็น 23 ฟรอนต์ โดยเฉลี่ย มีการเพิ่มจำนวนโดยฟรอนต์จะติดกัน 2 ฟรอนต์ แล้วหลุดออกจากกันที่บริเวณระหว่างฟรอนต์ 2 ฟรอนต์ จะแยกออกเป็นฟรอนต์เดี่ยว จากนั้นก็จะมีฟรอนต์ขนาดเล็ก เกิดขึ้นมาใหม่จากฟรอนต์เดิม และฟรอนต์ที่หลุดออกมา (รูปที่ 23)

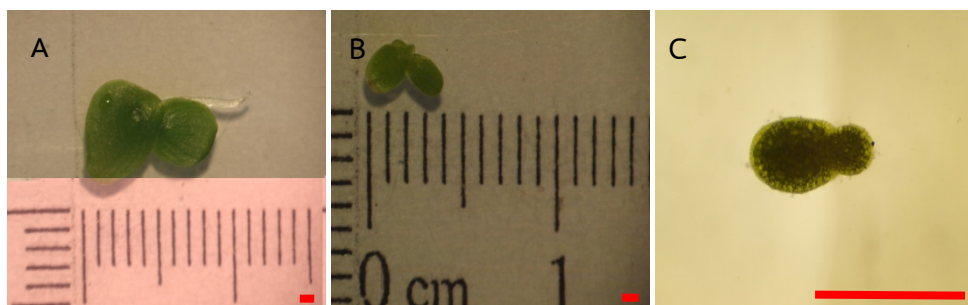


รูปที่ 23. การเกิดฟรอนต์ใหม่ของไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E เป็นระยะเวลา 48 ชม. (A) ไข่น้ำที่พร้อมจะแตกฟรอนต์ใหม่ (B) ฟรอนต์ใหม่เริ่มแตกออกมา ในระยะเวลา 16 ชม. (C) 32 ชม. (D) 48 ชม.

(สเกลบาร์ = 1 มม.)

6.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแหวนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

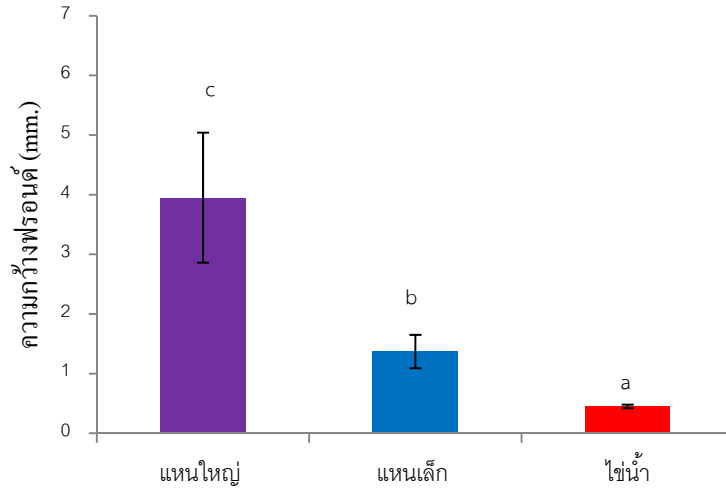
แหวนใหญ่ แหวนเล็ก และไข่น้ำ ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มีลักษณะฟรอนต์ และขนาดที่แตกต่างกัน (รูปที่ 24)



รูปที่ 24. ลักษณะของฟรอนต์ (A) แหวนใหญ่ (B) แหวนเล็ก (C) ไข่น้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (สเกลบาร์ = 1 มม.)

6.4.1. ความกว้างของฟรอนต์

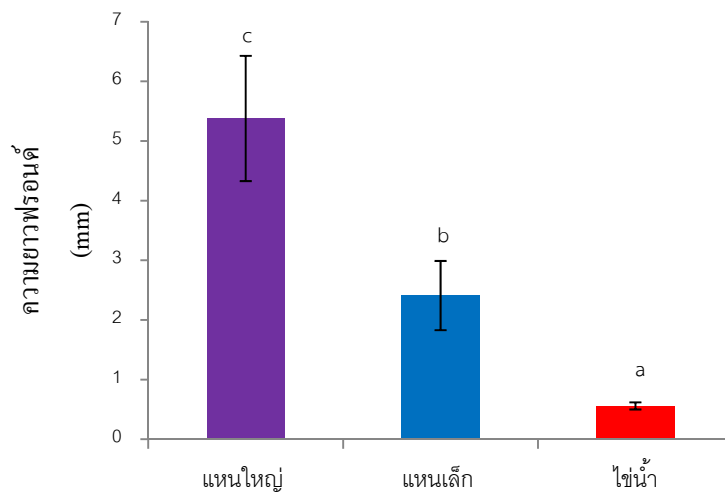
แหวนใหญ่ แหวนเล็ก และไข่น้ำ มีความกว้างของฟรอนต์เฉลี่ยเท่ากับ 3.95, 1.37, และ 0.45 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 25)



รูปที่ 25. ความกว้างฟรอนต์แหวนใหญ่ แหวนเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS (บาร์=SD) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.4.2. ความยาวของฟรอนต์

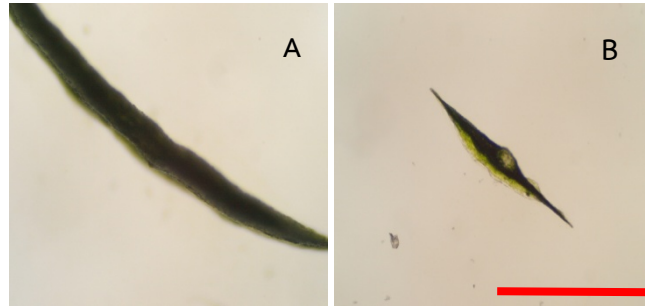
แหวนใหญ่ แหวนเล็ก และไข่น้ำ มีความยาวของฟรอนต์เฉลี่ยเท่ากับ 5.38, 2.41 และ 0.56 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 26)



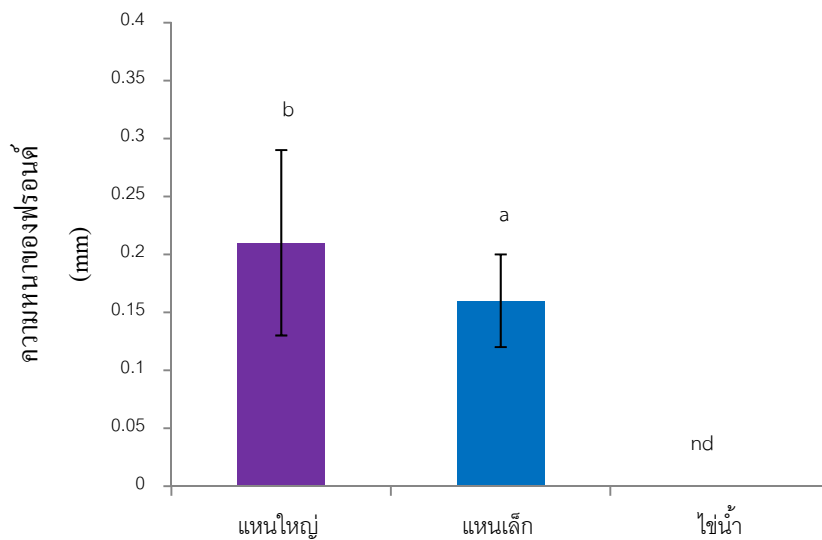
รูปที่ 26. ความยาวฟรอนต์แหวนใหญ่ แหวนเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS (บาร์=SD) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.4.3. ความหนาของฟรอนต์

จากการเปรียบเทียบลักษณะความหนาฟรอนต์ (รูปที่ 27) พบว่าแห่นใหญ่มีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 0.21 มิลลิเมตร และ แห่นเล็กมีความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 0.16 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างกัน ส่วนไข่น้ำไม่สามารถวัดขนาดความหนาของฟรอนต์ได้ (รูปที่ 28)



รูปที่ 27. ภาพถ่ายด้านข้างเปรียบเทียบความหนาของฟรอนต์ (A) แห่นใหญ่ (B) แห่นเล็ก (สเกลบาร์ = 1 มม.)

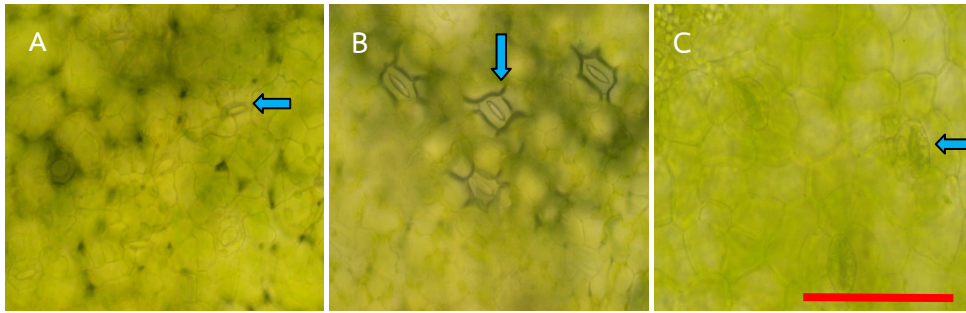


รูปที่ 28. ความยาวฟรอนต์แห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS (บาร์=SD; nd=ไม่สามารถวิเคราะห์ได้)

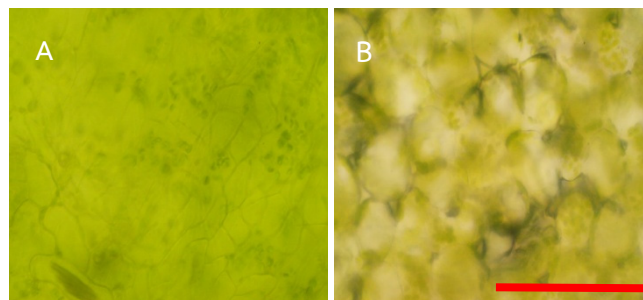
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.4.4. จำนวนปากใบ

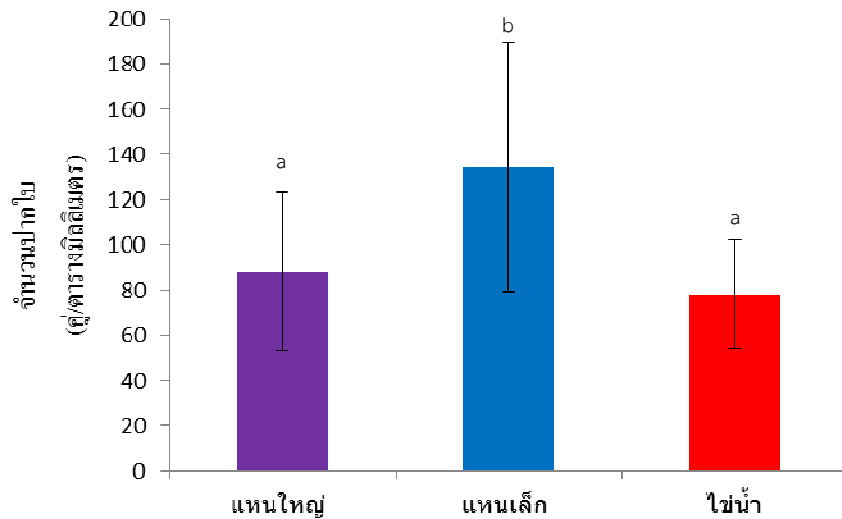
จากการเปรียบเทียบจำนวนปากใบด้านหลังฟรอนต์ (รูปที่ 29) และด้านล่างฟรอนต์ (รูปที่ 30) ของแห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำ ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าจำนวนปากใบของแห่นเล็กมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 134.68 คู่ต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งมีจำนวนแตกต่างกับแห่นใหญ่และไข่น้ำที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88.06 และ 78.08 คู่ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 31) ในขณะที่ด้านล่างฟรอนต์ไม่พบปากใบ



รูปที่ 29. ปากใบที่พบบนด้านหลังพรอนด์ของ (A) แหนใหญ่ (B) แหนเล็ก และใน (C) ไข่น้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (สเกลบาร์ = 0.1 มม.)



รูปที่ 30. ลักษณะด้านผิวใต้พรอนด์ของ (A) แหนใหญ่ (B) แหนเล็ก ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (สเกลบาร์ = 0.1 มม.)

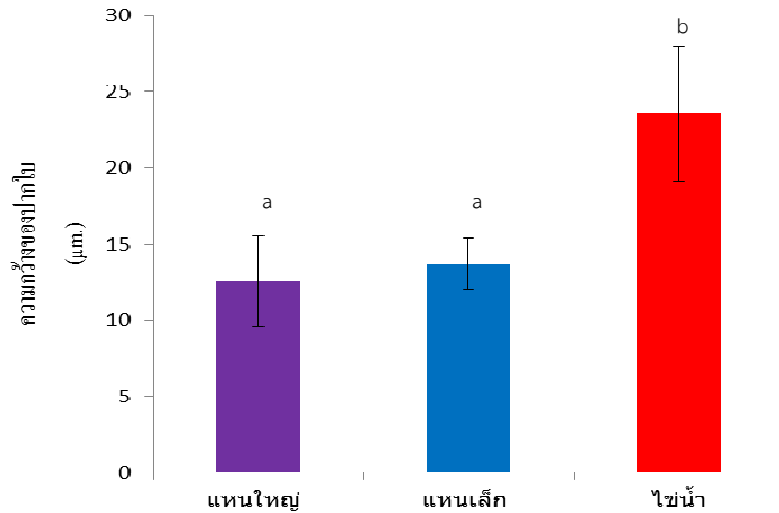


รูปที่ 31. ความหนาแน่นของปากใบที่พบในแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.4.5. ความกว้างปากใบ

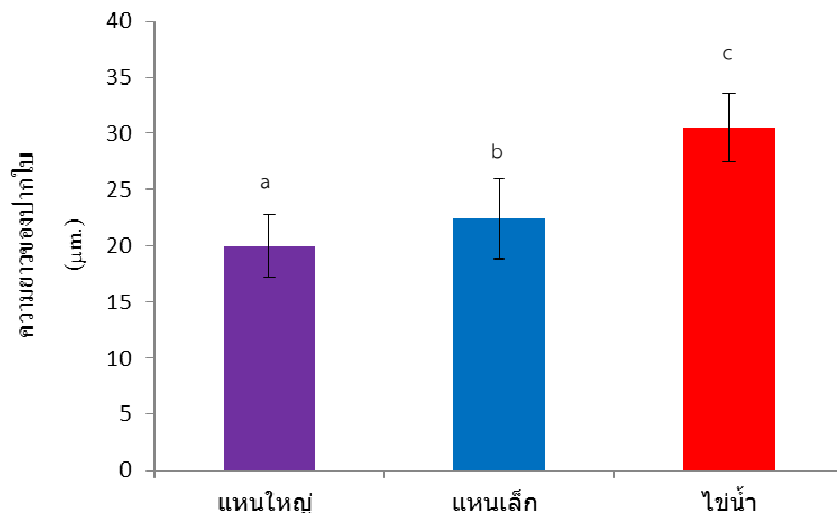
ขนาดความกว้างปากใบของไข่น้ำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $30.49 \mu\text{m}$ ซึ่งมีขนาดแตกต่างกับแห่นใหญ่ และแห่นเล็กที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $12.57 \mu\text{m}$ และ $13.67 \mu\text{m}$ ตามลำดับ (รูปที่ 32)



รูปที่ 32. ความกว้างปากใบของแห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS (บาร์=SD) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.4.6. ความยาวปากใบ

ขนาดความยาวปากใบของแห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.98 , 22.51 และ $30.49 \mu\text{m}$ ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 33)



รูปที่ 33. ความยาวปากใบของแห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร MS (บาร์=SD) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.4.7. ความยาวราก

จากการวิเคราะห์ความยาวรากของแห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำ ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในอาหารเหลวสูตร MS (รูปที่ 34) พบว่าความยาวรากของแห่นใหญ่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.26 มิลลิเมตร ส่วนแห่นเล็กไม่สามารถวัดความยาวรากได้ในอาหารสูตร MS ในขณะที่ไข่น้ำไม่พบโครงสร้างของราก



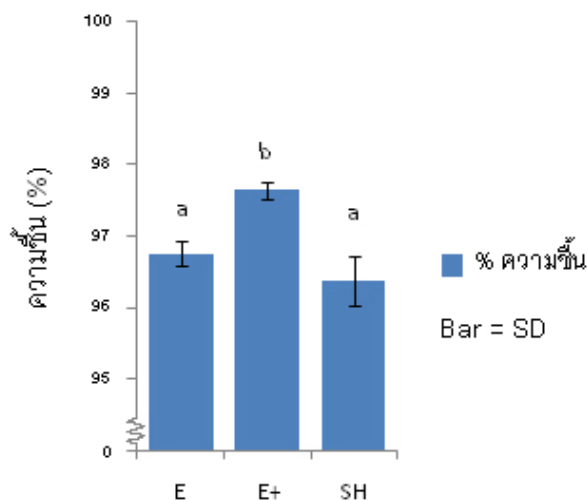
รูปที่ 34. รากของแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS (สเกลบาร์ = 1 มม.)

6.5. ปริมาณสารชีวโมเลกุลในแห่น

6.5.1. แห่นใหญ่

6.5.1.1 ความชื้น

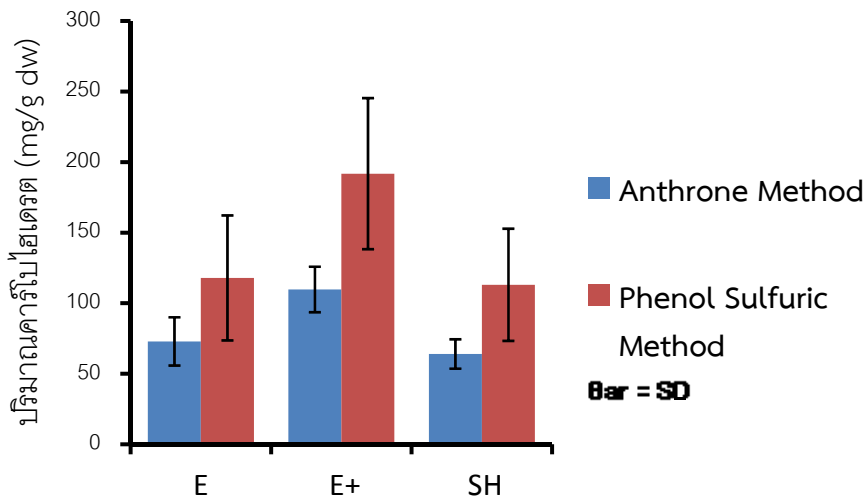
จากการวิเคราะห์ความชื้นโดยวิธีอบร้อนพบว่า แห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E, E⁺ และ SH มีความชื้นคิดเป็นร้อยละ 96.77, 97.65 และ 96.38 ตามลำดับ (รูปที่ 35) ซึ่งค่าความชื้นดังกล่าวสามารถนำไปคำนวณหาน้ำหนักแห้งของแห่นใหญ่ที่ใช้ทดลองได้



รูปที่ 35. ความชื้นในแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร E, E⁺ หรือ SH เป็นเวลา 21 วัน (บาร์=SD) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.5.1.2 คาร์โบไฮเดรตในรูปแป้งและน้ำตาล

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแห่นใหญ่ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรน หรือฟีนอลซัลฟิวริก ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริกจะให้ค่าที่สูงกว่า และมีค่าความคลาดเคลื่อนมากกว่า (รูปที่ 36) อย่างไรก็ตามแนวโน้มของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วัดได้จากทั้งสองวิธีเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ แห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E⁺ จะให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าอาหารเหลวสูตร E หรือ SH โดยถ้ายึดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้จากวิธีแอนโทรน แห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E, E⁺ และ SH มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 72.36, 108.90 และ 63.47 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่ถ้ายึดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้จากวิธีหรือฟีนอลซัลฟิวริก แห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E, E⁺ และ SH มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 110.83, 190.28 และ 112.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 36)

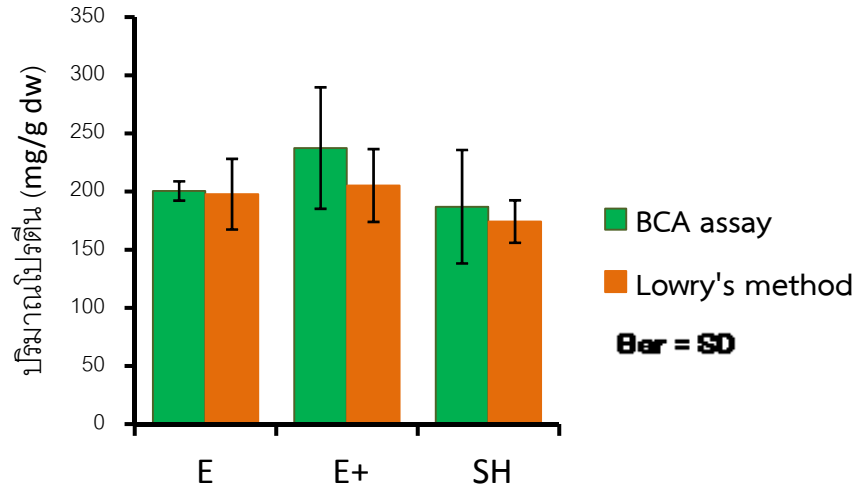


รูปที่ 36. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร E, E⁺ หรือ SH เป็นเวลา 21 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรนหรือวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (บาร์=SD)

6.5.1.3 โปรตีน

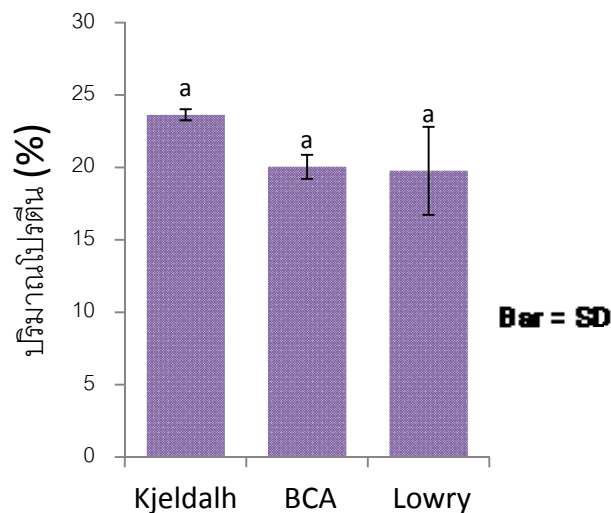
ปริมาณโปรตีนในแห่นใหญ่ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยกรดไบซินโคนิค หรือวิธีของลอร์วีให้ผลไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยกรดไบซินโคนิค พบว่าแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E, E⁺ และ SH มีปริมาณโปรตีน 200.49, 237.41 และ 186.95 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของลอร์วี พบว่าแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E, E⁺ และ SH มีปริมาณโปรตีน 197.74, 205.16 และ 174.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แสดงให้เห็น

ว่าแทนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E⁺ จะให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าอาหารเหลวสูตร E หรือ SH ถึงแม้ว่าทั้งอาหารทั้งสามสูตรจะให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 37)



รูปที่ 37. ปริมาณโปรตีนในแทนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 21 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยกรดไบซินโคนิคหรือวิธีของลอร์วี (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 38. ปริมาณโปรตีนในแทนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร E เป็นเวลา 21 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยกรดไบซินโคนิค, วิธีของลอร์วี หรือวิธีเจลดาลห์ (บาร์=SD)

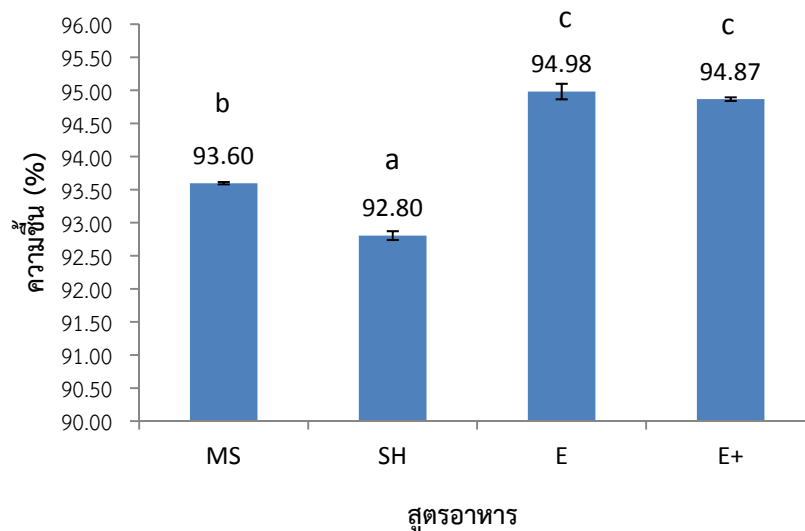
หมายเหตุ : ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยสองวิธีข้างต้นไม่ได้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด เนื่องจากต้องมีการสกัดโปรตีนออกมาจากตัวอย่างก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่วัดได้จากการสกัดแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกรดโบซินโคนิค หรือวิธีของลอร์รี กับปริมาณโปรตีนที่วัดได้จากตัวอย่างทั้งหมดโดยใช้วิธีเจลดาลท์ โดยใช้หน่วยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร E เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าวิธีทั้งสามวิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยวิธีเจลดาลท์จะให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดและมีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด (รูปที่ 38)

6.5.2. แหนเล็ก

6.5.2.1 ความชื้น

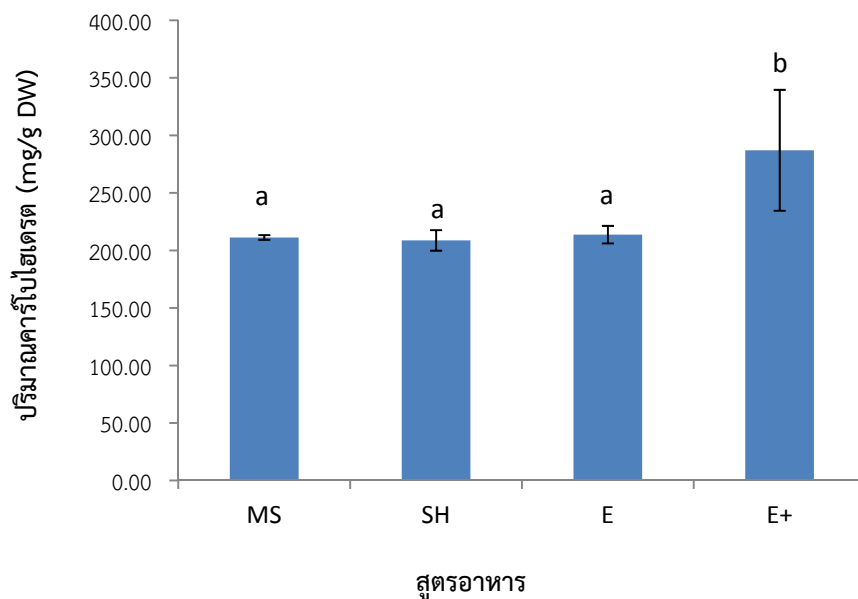
จากการทดลอง พบว่าแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 4 สูตร MS, SH, E และ E⁺ มีปริมาณความชื้นร้อยละ 93.60, 92.80, 94.98 และ 94.87 ตามลำดับ (รูปที่ 39) เมื่อทดสอบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan และ Tukey HSD ให้ผลทดสอบว่า แหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E และ E⁺ มีปริมาณความชื้นสูงกว่าแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ SH อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 39. ความชื้นในแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS, E, E⁺ หรือ SH เป็นเวลา 14 วัน (บาร์=SEM) หมายถึง ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.5.2.2 คาร์โบไฮเดรตในรูปแป้งและน้ำตาล

จากการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในແຫນ່ເລັກທີ່ເພາະເລີຍในห้องปฏิบัติการ พบว่าແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 211.26, 208.71, 213.69 และ 286.99 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 40) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan และ Tukey HSD ให้ผลทดสอบว่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในอาหารเหลวสูตร E⁺ มากกว่าແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในอาหารเหลวทั้งสามสูตรอย่างมีนัยสำคัญ

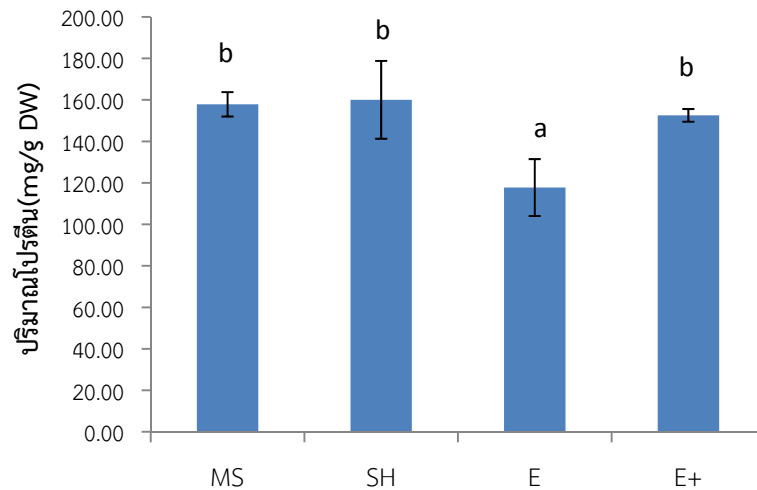


รูปที่ 40. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS, E, E⁺ หรือ SH เป็นเวลา 14 วัน (บาร์=SEM)

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.5.2.3 โปรตีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในห้องปฏิบัติการ พบว่าແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 157.86, 160.01, 117.0 และ 152.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 41) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan และ Tukey HSD ให้ผลทดสอบว่า แຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในอาหารเหลวสูตร E มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าແຫນ່ເລັກที่ເພາະເລີຍในอาหารเหลวสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ



สูตรอาหาร

รูปที่ 41. ปริมาณโปรตีนในแหวนเล็กที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS, E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 14 วัน (บาร์=SEM) หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.5.3. ไข่น้ำ

6.5.3.1 ความชื้น

จากการทดลองพบว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ มีปริมาณความชื้นร้อยละ 93.69, 96.07, 96.28 และ 96.79 ตามลำดับ (รูปที่ 42) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Duncan ให้ผลทดสอบว่า ไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS มีปริมาณความชื้นน้อยกว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SH, E⁺ และ E อย่างมีนัยสำคัญ

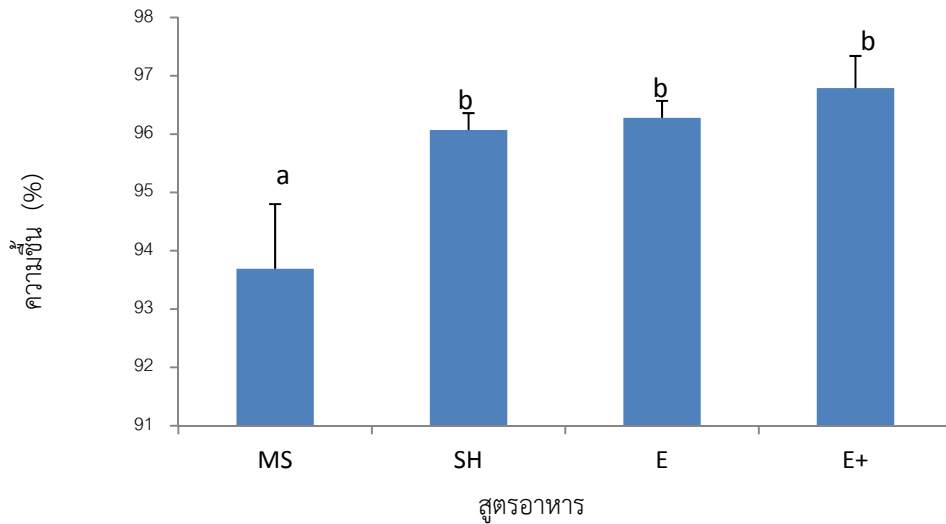
6.5.3.2 คาร์โบไฮเดรตในรูปแป้งและน้ำตาล

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 4 สูตร พบว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ มีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 9.17, 13.44, 18.67 และ 18.84 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 43) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Duncan และ Tukey HSD ให้ผลทดสอบว่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทุกสูตรไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

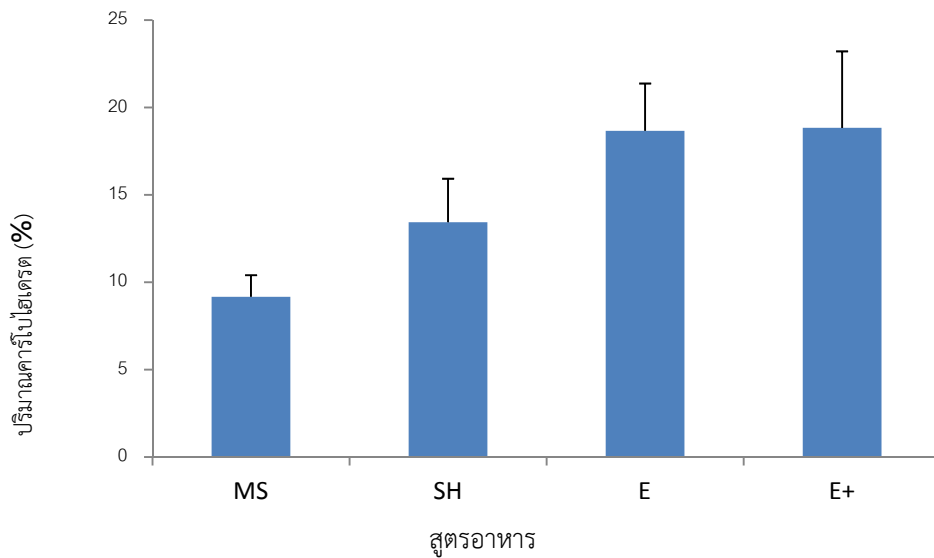
6.5.3.3 โปรตีน

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 4 สูตร พบว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, SH, E และ E⁺ มีโปรตีนร้อยละ 2.34, 5.05, 7.48 และ 2.99 ของน้ำหนักแห้ง

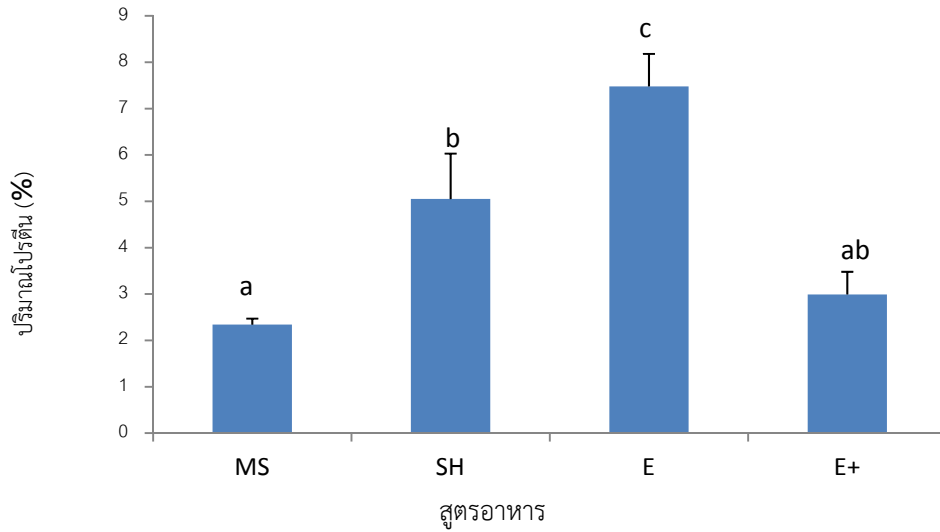
ตามลำดับ (รูปที่ 44) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Duncan ให้ผลทดสอบว่า ไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร E มีปริมาณโปรตีนมากกว่าไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรอื่น อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 42. ความชื้นในไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS, E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 14 วัน (บาร์=SEM) หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 43. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS, E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 14 วัน โดยเทียบเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง (บาร์=SEM)
หมายเหตุ : ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p < 0.05$)



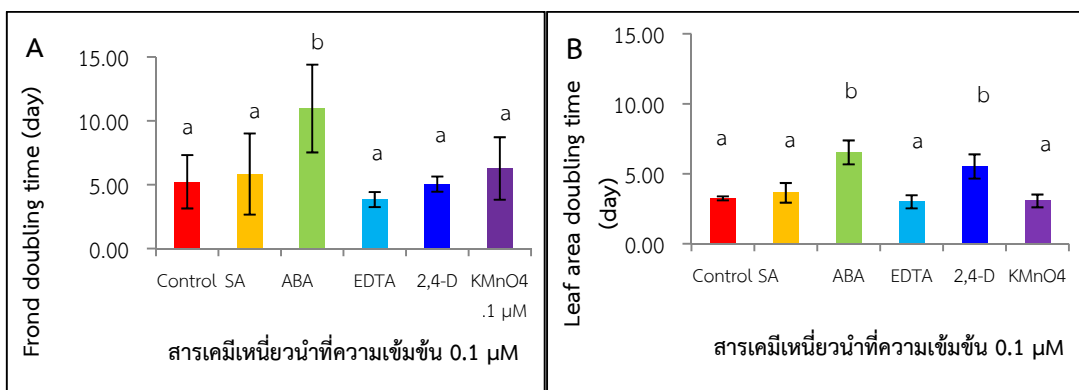
รูปที่ 44. ปริมาณโปรตีนในไขน้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารสูตร MS, E, E+ หรือ SH เป็นเวลา 14 วัน โดยเทียบเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง (บาร์=SEM)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p < 0.05$)

6.6. ผลของสารเคมีต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของแหวน

6.6.1. แหนใหญ่

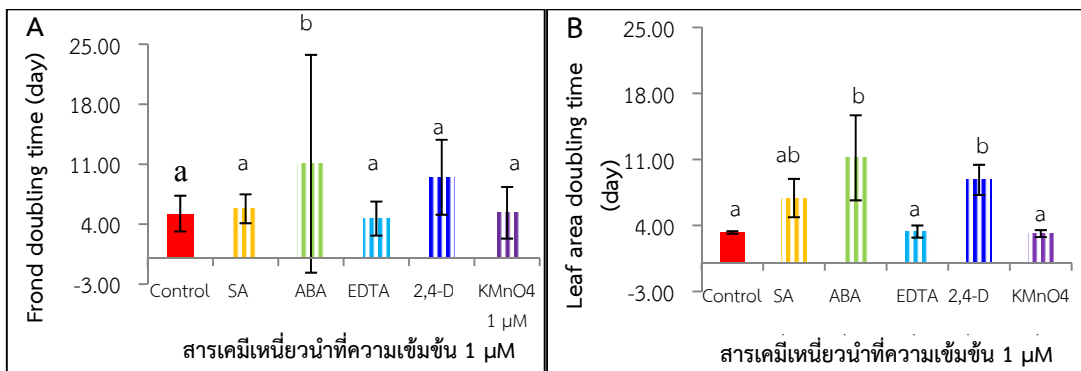
6.6.1.1. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS



รูปที่ 45. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 45, A) ของหน่อใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (10.97 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 45, B) ของหน่อใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (6.53 วัน) และอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (5.52 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ



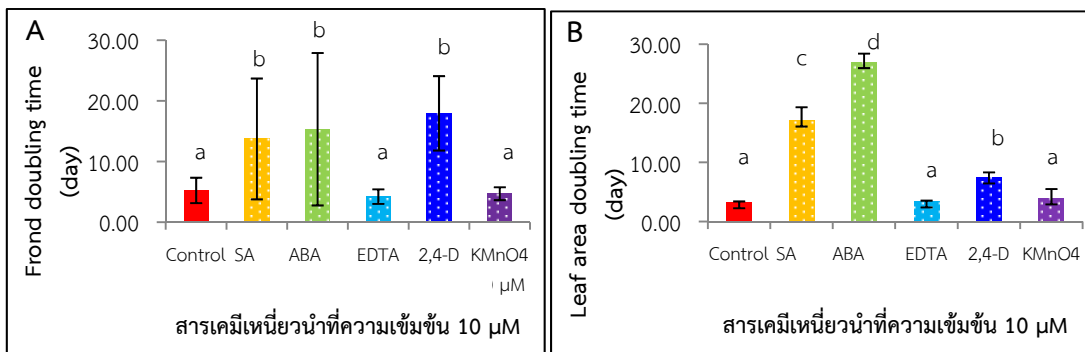
รูปที่ 46. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของหน่อใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ(ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 46, A) ของหน่อใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (11.05 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 46, B) ของหน่อใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (11.17 วัน) และอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (8.82 วัน) มากกว่าชุดควบคุม อาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติกและต่างทับทิม

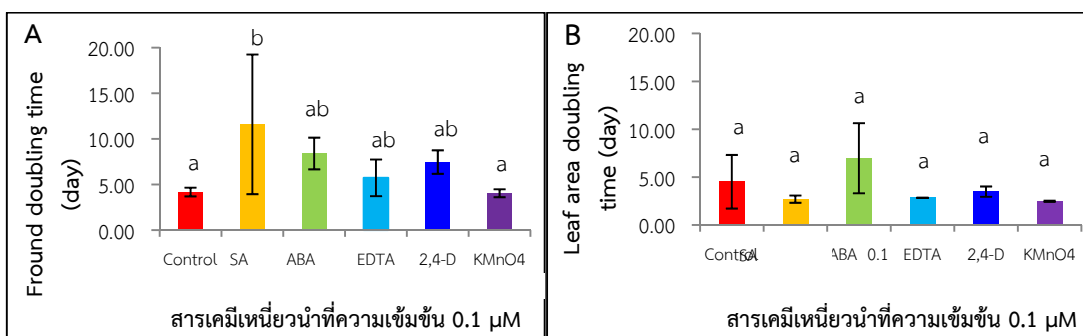
การทดสอบผลสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของ

ใบ (รูปที่ 47, A) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก (13.72 วัน) กรดแอสไซติก (15.31 วัน) และกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (17.94 วัน) มากกว่าชุดควบคุม อาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติกและต่างทับทิม ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 47, B) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซติก (26.94 วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก มากกว่าอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก และมากกว่าชุดควบคุม อาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติกและต่างทับทิม



รูปที่ 47. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

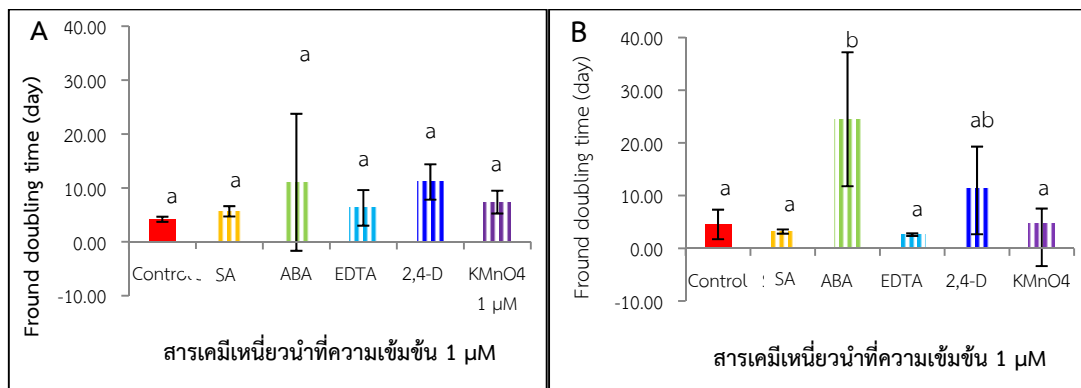
6.6.1.2. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS



รูปที่ 48. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร PS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก และต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 48, A) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก (11.60 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและต่างทับทิม ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 48, B) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในชุดควบคุมและอาหารที่มีต่างทับทิมทั้งสามความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร PS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 49, A) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 49, B) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (24.50 วัน) มากกว่าชุดควบคุม กรดซาลิไซลิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก และต่างทับทิม

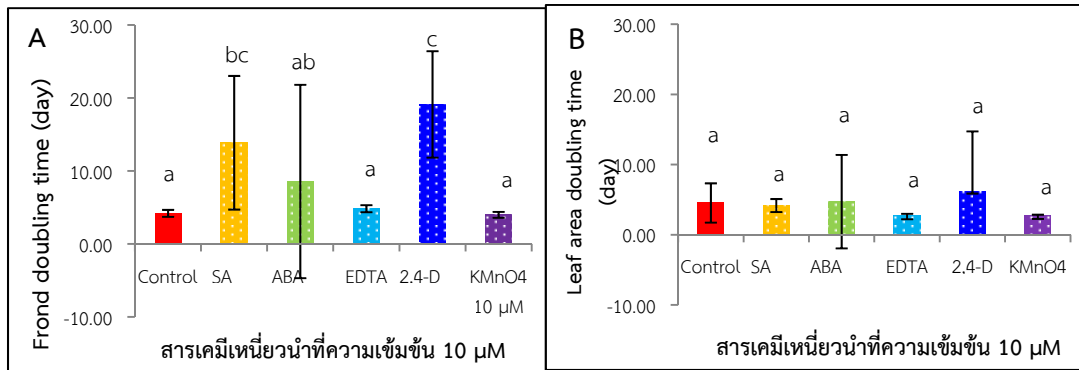


รูปที่ 49. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร PS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 50, A) ของแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (19.10

วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรดแอบไซซิก ชุดควบคุม กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก และต่างทับทิม ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 50, B) ของแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในชุดควบคุมและสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ ไม่แตกต่างกัน

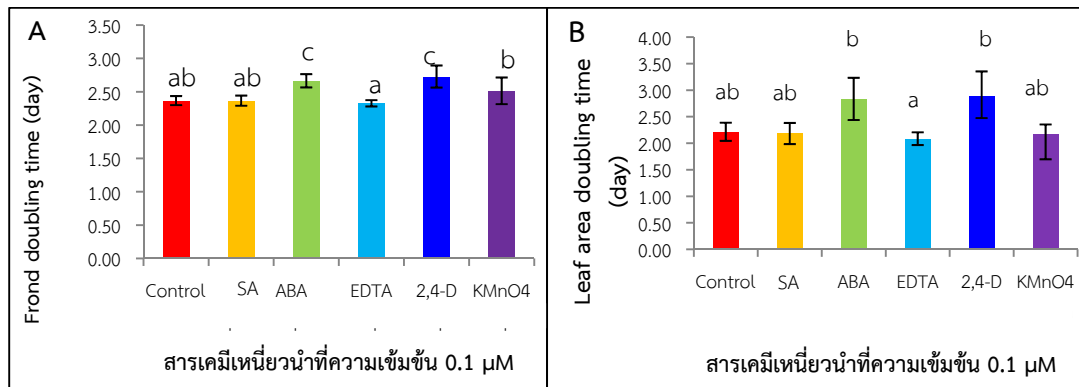


รูปที่ 50. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.6.2. แห่นเล็ก

6.6.2.1. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS



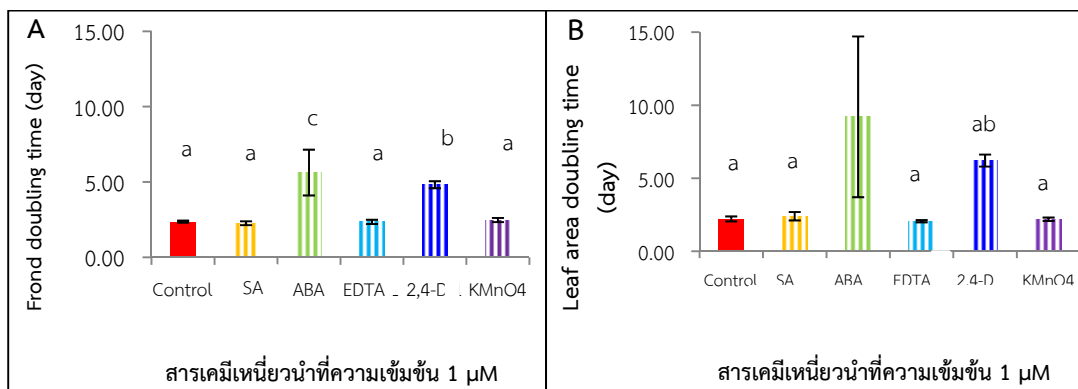
รูปที่ 51. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแห่นเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอบไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่ม

จำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 51, A) ของແຮນເລັກທີ່ເພາະເລີຍໃນอาหารที่มีกรดแอสไซค (2.66 วัน) และอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2.73 วัน) มากกว่าอาหารที่มีต่างทับทิม (2.51 วัน) และมากกว่าอาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (2.33 วัน) ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 51, B) ของແຮນເລັກທີ່ເພາະເລີຍໃນอาหารที่มีกรดแอสไซค (2.84 วัน) และอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2.89 วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (2.09 วัน)

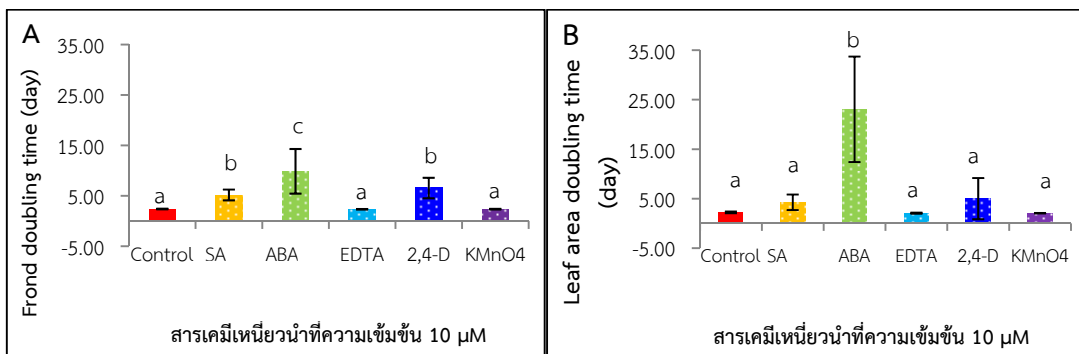
การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซค กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 52, A) ของແຮນເລັກທີ່ເພາະເລີຍໃນอาหารที่มีกรดแอสไซค (5.63 วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (4.81 วัน) และมากกว่าชุดควบคุม อาหารที่มีกรดซาลิไซลิก (2.26 วัน) กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (2.35 วัน) และต่างทับทิม (2.47 วัน) ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 52, B) ของແຮນເລັກທີ່ເພາະເລີຍໃນอาหารที่มีกรดแอสไซค (9.20 วัน) มากกว่าอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก (2.40 วัน) กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (2.06 วัน) และต่างทับทิม (2.19 วัน)



รูปที่ 52. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของແຮນເລັກທີ່ເພາະເລີຍໃນอาหารสูตร MS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 53, A) ของແຫນ່ລືກທີ່ພາະເລີຍในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (9.84 วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (6.53 วัน) และอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก (5.15 วัน) และมากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (2.33 วัน) และต่างทับทิม (2.33 วัน) ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 53, B) ของແຫນ່ລືກທີ່ພາະເລີຍในอาหารที่มีกรดแอสไซซิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (23.06 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ

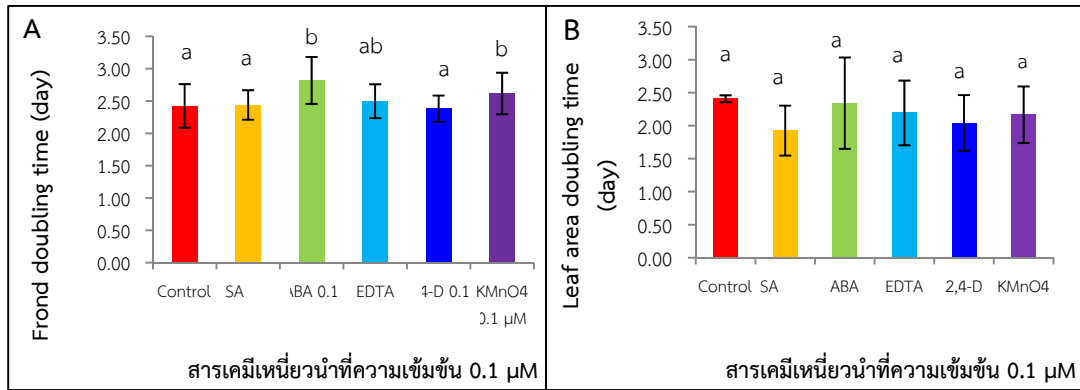


รูปที่ 53. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของແຫນ່ລືກທີ່ພາະເລີຍในอาหารสูตร MS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

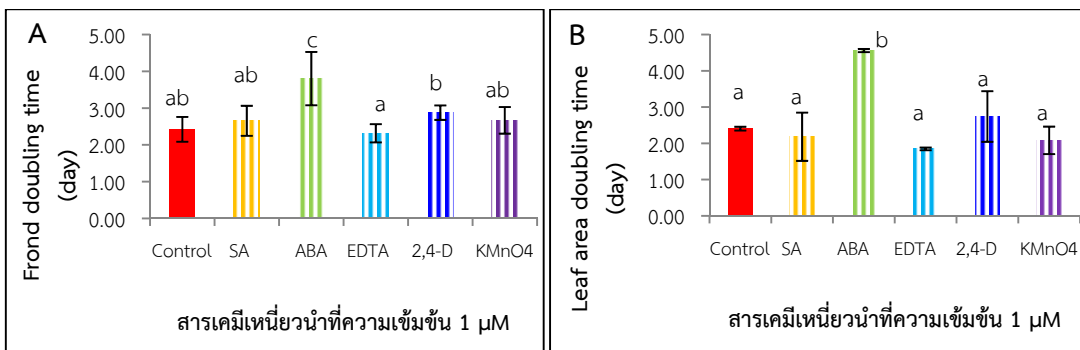
6.6.2.2 พะาะເລີຍในอาหารสูตร PS

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร PS ที่ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 54, A) ของແຫນ່ລືກທີ່ພາະເລີຍในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (2.82 วัน) และอาหารที่มีต่างทับทิม (2.62 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีกรดซาลิไซลิก (2.44 วัน) และกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2.38 วัน) ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 54, B) ของແຫນ່ລືກທີ່ພາະເລີຍในชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำไม่แตกต่างกัน



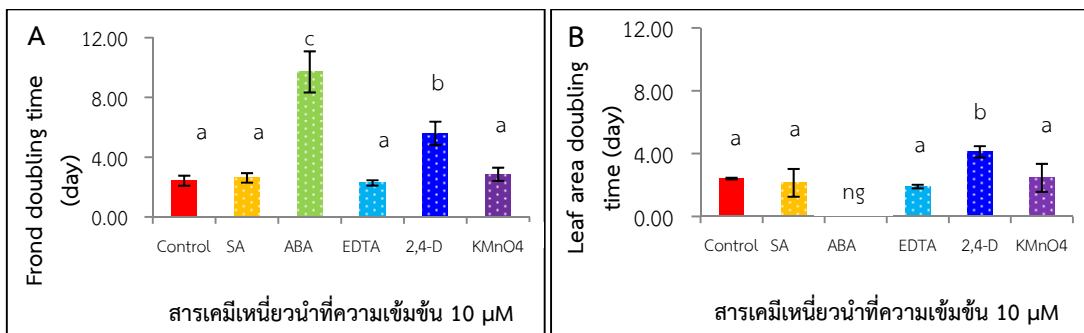
รูปที่ 54. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร PS ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ (ชุดควบคุม) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอบไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 55, A) ของหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอบไซซิก (3.80 วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2.88 วัน) และอาหารที่มีกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (2.32 วัน) ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 55, B) ในอาหารที่มีกรดแอบไซซิกมากกว่าชุดควบคุมและอาหารที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ



รูปที่ 55. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD)
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบผลของสารเคมีเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร PS ในชุดควบคุม (ไม่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ) และที่มีสารเคมีเหนี่ยวนำ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอสไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเต-ตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก และต่างทับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของใบ (รูปที่ 56, A) ของหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดแอสไซซิก (9.70 วัน) มากกว่าอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (5.59 วัน) และมากกว่าชุดควบคุมและสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ ในขณะที่ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของพื้นที่ใบ (รูปที่ 56, B) ในอาหารที่มีกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (4.11 วัน) มากกว่าชุดควบคุมและสารเคมีเหนี่ยวนำอื่นๆ

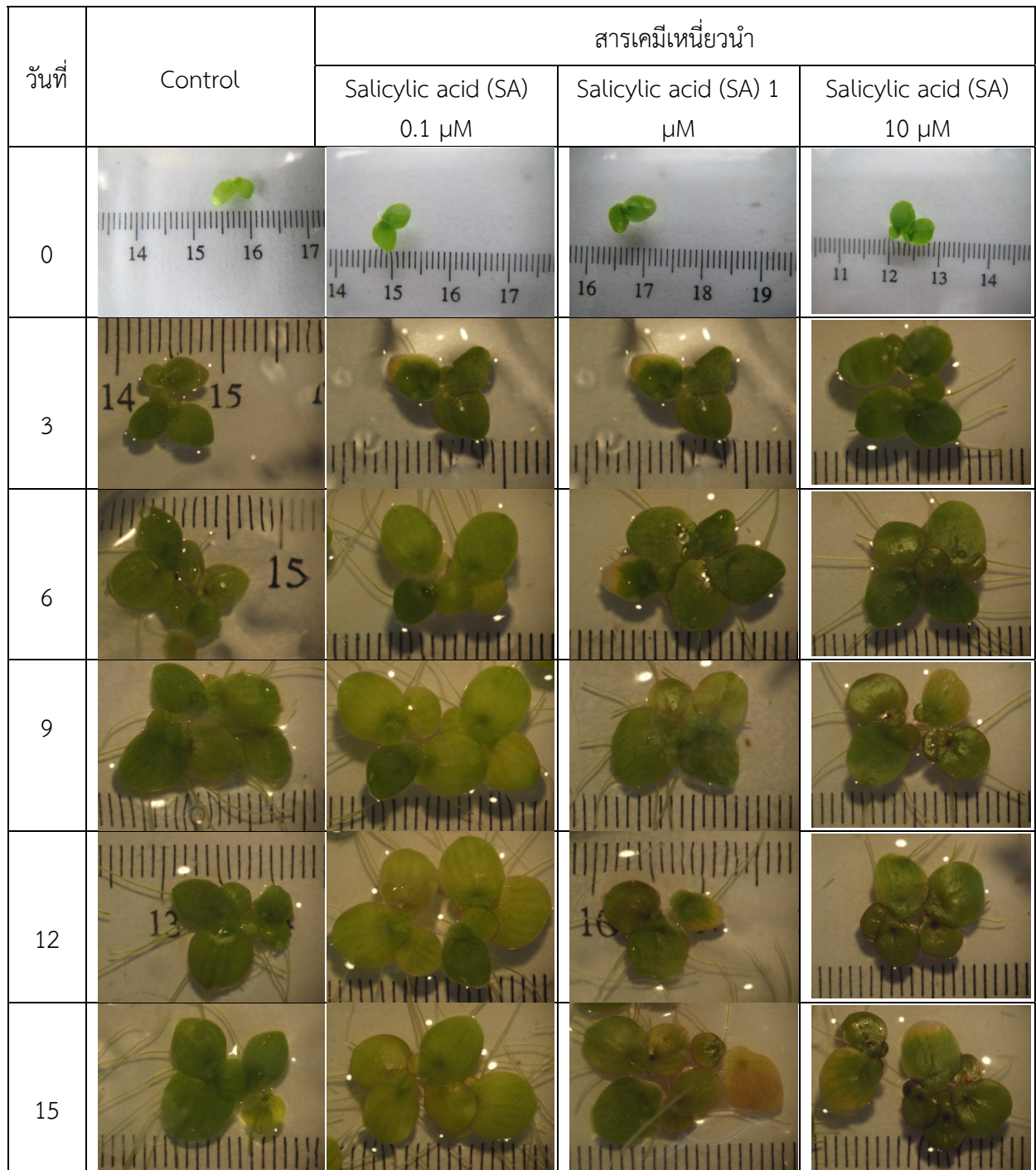


รูปที่ 56. ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของหน่อเล็กเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีสารเคมีที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณจาก A) จำนวนใบ, B) พื้นที่ใบ (บาร์=SD, ไม่พบการโต=ng)

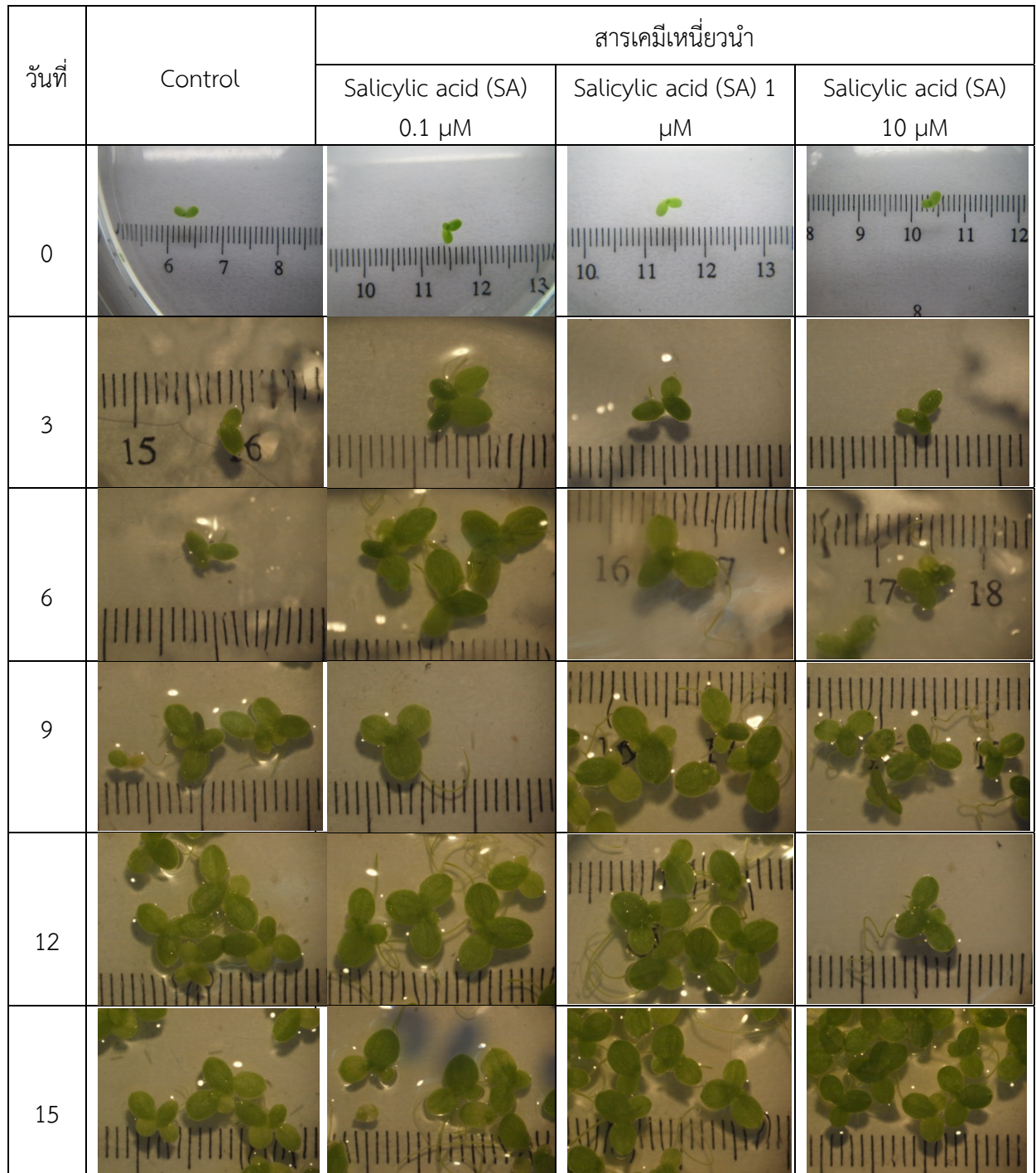
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6.6.3. การออกดอก

ในการพัฒนาเทคนิคการทำพันธุวิศวกรรมในหน่อใหญ่ ขั้นแรกคือการทำให้หน่อใหญ่ออกดอก จากการศึกษาการเหนี่ยวนำให้หน่อใหญ่และหน่อเล็กออกดอกโดยใช้กรดซาลิไซลิกเป็นสารเคมีในการเหนี่ยวนำโดยเพาะเลี้ยงหน่อในอาหารสูตร MS และในอาหารสูตร PS (Pirson-seidel; Krajncic and Nemeč, 1995) พบว่ากรดซาลิไซลิก 10 ไมโครโมลต่อลิตร ส่งผลให้หน่อใหญ่ที่เจริญในสองสูตรอาหารมีลักษณะใบใหญ่ หนา ใต้ใบมีสีแดงเข้ม (รูปที่ 57) ในขณะที่กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของหน่อใหญ่ทำให้หน่อใหญ่แคระแกรน ใบเหลือง และตาย ในส่วนของหน่อเล็กพบว่ากรดซาลิไซลิก 10 ไมโครโมลต่อลิตร ไม่ส่งผลต่อหน่อเล็กที่เจริญในอาหาร PS แต่ทำให้หน่อเล็กเจริญช้าลงในอาหาร MS และไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 58) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ยังไม่พบการออกดอกของหน่อเล็กและหน่อใหญ่



รูปที่ 57. ลักษณะหน่อใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีกรดซาลิไซลิกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีกรดซาลิไซลิก) เป็นระยะเวลา 15 วัน (สเกล = 1 มม.)



รูปที่ 58. ลักษณะหน่อเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่มีกรดซาลิไซลิกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีกรดซาลิไซลิก) เป็นระยะเวลา 15 วัน (สเกล = 1 มม.)

6.7. การตรวจสอบชนิดของแอนโดยใช้เทคนิค PCR

6.7.1. การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ถูกออกแบบด้วยโปรแกรม Vector NTI® Advance (Life Technologies, USA) โดยอาศัยข้อมูลคลอโรพลาสต์จีโนมของแอนแต่ละชนิดในการออกแบบ ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำเร็จจะมีลำดับเบส 20 – 22 bp, มีค่า Tm ในช่วง 50 – 60 องศาเซลเซียส และสัดส่วน GC 50 – 60 % ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ DNA ในช่วง 1000–1200 bp จากการวิเคราะห์พบว่าไพรเมอร์บางชิ้นที่ออกแบบมาสามารถเข้าคู่กับคลอโรพลาสต์จีโนมของแอนคนละชนิดได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแอนชนิดเดียวจะถูกเลือกไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการเข้าคู่กับจีโนมสิ่งมีชีวิตอื่นต่อไป

ตารางที่ 2. ข้อมูลของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Vector NTI® Advance

No.	Name	ลำดับเบสของไพรเมอร์	Tm	%GC	ขนาด ไพรเมอร์ (bp)	สกุลแอนที่ไพรเมอร์ สามารถเข้าคู่ได้
1	Lmchl1	TAATTAAGGGCGAACGACGG	54.4	50	20	แอนเล็ก
2	Lmchl2	AATTAAGGGCGAACGACGGG	55	50	20	แอนเล็ก
3	Lmchl3	CATCCGCCCTTACTTAAGC	53.7	56.3	21	แอนเล็กและไข่น้ำ
4	Lmchl1	CTTCTGCAGCGATTGGTTTG	53.4	50	20	แอนเล็ก
5	Lmchl2	CATGGCGGCTTGCTTGAGAT	54.2	50	20	แอนเล็กและไข่น้ำ
6	Lmchl3	TCGCCTTCATTGCTGCTCCT	54	50	20	แอนเล็ก
7	Wachl1	CGTCAACAGATGCTGCTTCCC	57	57.1	21	ไข่น้ำ
8	Wachl2	GCGCGTGGTGGATTCACAAT	56.8	55	20	ไข่น้ำและแอนใหญ่
9	Wachl3	GCGCGTGGTGGATTCACAATC	56.8	57.1	21	ไข่น้ำและแอนใหญ่
10	Wachl1	GCAAGCCAGTTTGGACCGAT	56.3	55	20	ไข่น้ำ
11	Wachl2	ATCGCCTTCATTGCTGCTCC	57	55	20	ไข่น้ำ
12	Wachl3	CGCCTTCATTGCTGCTCCTC	57.1	55	20	ไข่น้ำ
13	Spchl1	TCCTCTCCCAAGTCGCTACA	52.2	55	20	แอนใหญ่
14	Spchl2	ATATAGGGCGAACGACGGGA	52.2	55	20	แอนใหญ่และแอนเล็ก
15	Spchl3	TATAGGGCGAACGACGGGAA	52.5	55	20	แอนใหญ่และแอนเล็ก
16	Spchl1	CACTGGAAGAGCGTACGGAA	52.8	55	20	แอนใหญ่
17	Spchl2	CGTCCTTGGATTGCTGTTGC	52.2	55	20	แอนใหญ่
18	Spchl3	GCGTCCTTGGATTGCTGTTG	52.8	55	20	แอนใหญ่

6.7.2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์

เมื่อพิจารณาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเข้าคู่กับคลอโรพลาสต์จีโนมของແນแต่ละชนิดแล้วพบว่าทุกคู่มีความจำเพาะเจาะจงต่อແນชนิดนั้นๆมากที่สุด โดยอาจจะมีบางคู่ที่มีไพรเมอร์หนึ่งสามารถเข้าคู่ได้กับจีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น Lmchlr หรือ Wachlf แต่เมื่อพิจารณาเป็นคู่แล้วจะพบความจำเพาะเจาะจง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำได้โดยการนำไพรเมอร์แต่ละอันไปบลาสต์ (Blast) กับฐานข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตใน NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าคะแนนที่ได้ (Total score) และความเหมือนของลำดับ (Query cover) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ผลการบลาสต์ไพรเมอร์ที่ออกแบบในฐานข้อมูล NCBI (แสดงผล 5 อันดับแรก)

ชื่อ	ลำดับ	No.	สิ่งมีชีวิต	ชนิด	Total score	Query cover
Lmchlf	TAA-TTA-AGG-GCG-AAC-GAC-GG	1	ແນเล็ก	<i>L. minor</i>	40.1	100%
		2	พืช	<i>S. sp. nov. 'nanocephala'</i>	36.2	90%
		3	แบคทีเรีย	<i>A. cylindrica</i>	34.2	85%
		4	พืช	<i>S. actinophylla</i>	34.2	85%
		5	เห็ด	<i>T. Versicolor</i>	32.2	80%
Lmchlr	CTT-CTG-CAG-CGA-TTG-GTT-TG	1	หญ้าน้ำ	<i>R. rostratum</i>	40.1	100%
		2	ແນเล็ก	<i>L. minor</i>	40.1	100%
		3	แบคทีเรีย	<i>R. hominis</i>	64.4	95%
		4	หนอน พยาธิ	<i>B. Malayi</i>	36.2	90%
		5	เพลลีย์	<i>A. pisum</i>	34.2	85%
Wachlf	CGT-CAA-CAG-ATG-CTG-CTT-CCC	1	Chromalveolata	<i>B. pacifica</i>	42.1	100%
		2	ไข่น้ำ	<i>W. australiana</i>	42.1	100%
		3	ไข่น้ำ	<i>W. lingulata</i>	42.1	100%
		4	โลมาแม่น้ำจีน	<i>L. vexillifer</i>	40.1	95%
		5	แรดขาว	<i>C. simum</i>	40.1	95%
Wachlr	GCA-AGC-CAG-TTT-GGA-CCG-AT	1	ไข่น้ำ	<i>W. columbiana</i>	40.1	100%
		2	ไข่น้ำ	<i>W. australiana</i>	40.1	100%
		3	ไข่น้ำ	<i>W. lingulata</i>	40.1	100%
		4	ไข่น้ำ	<i>W. australiana</i>	40.1	100%
		5	ไข่น้ำ	<i>W. australiana</i>	40.1	100%

ตารางที่ 3. ผลการบลาสต์ไพรเมอร์ที่ออกแบบในฐานข้อมูล NCBI (ต่อ)

ชื่อ	ลำดับ	No.	สิ่งมีชีวิต	Species	Total score	Query cover
Spchlf	TCC-TCT-CCC-AAG-TCG-CTA-CA	1	แหวนใหญ่	<i>S. polyrhiza</i>	40.1	100%
		2	พีช	<i>C. rubella</i>	34.2	85%
		3	สาหร่าย	<i>Calothrix sp</i>	90.7	95%
		4	เห็ด	<i>T. melanosporum</i>	34.2	85%
		5	เชื้อรา	<i>P. brasiliensis</i>	34.2	85%
Spchlr	CAC-TGG-AAG-AGC-GTA-CGG-AA	1	แหวนใหญ่	<i>S. polyrhiza strain 7498</i>	40.1	100%
		2	แหวนใหญ่	<i>S. polyrhiza strain SJ PsbK</i>	40.1	100%
		3	แหวนใหญ่	<i>S. polyrhiza strain 8790 PsbK</i>	40.1	100%
		4	แหวนใหญ่	<i>S. polyrhiza strain 7498 PsbK</i>	40.1	100%
		5	แหวนใหญ่	<i>S. polyrhiza strain 7222 PsbK</i>	40.1	100%

ตารางที่ 4. ขนาดผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการทำ PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแหวนแต่ละชนิด คำนวณโดยใช้โปรแกรม Vector NTI® Advance

No.	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับ	ใช้ตรวจสอบ	ขนาด DNA ที่ได้
1	ไพรเมอร์แหวนเล็ก	Lmchlf TAA-TTA-AGG-GCG-AAC-GAC-GG	จีโนมของแหวนเล็ก	1,077 bp
		Lmchlr CTT-CTG-CAG-CGA-TTG-GTT-TG		
2	ไพรเมอร์ไข่น้ำ	Wachlf CGT-CAA-CAG-ATG-CTG-CTT-CCC	จีโนมของไข่น้ำ	1,175 bp
		Wachlr GCA-AGC-CAG-TTT-GGA-CCG-AT		
3	ไพรเมอร์แหวนใหญ่	Spchlf TCC-TCT-CCC-AAG-TCG-CTA-CA	จีโนมของแหวนใหญ่	1,190 bp
		Spchlr CAC-TGG-AAG-AGC-GTA-CGG-AA		

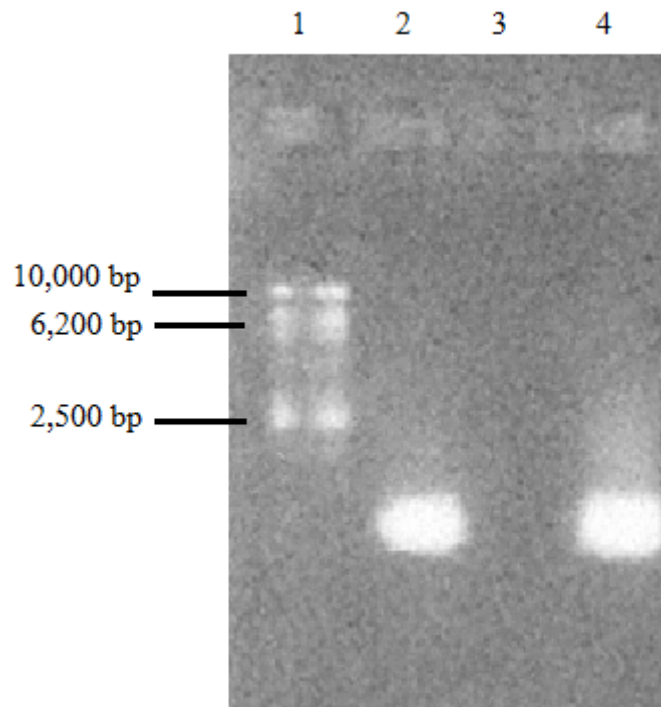
6.7.3. การประมาณขนาดผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้

จากการทำนายขนาดของผลิตภัณฑ์ DNA เมื่อใช้คูไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะต่อแทนแต่ละชนิดโดยใช้โปรแกรม Vector NTI® Advance พบว่าผลิตภัณฑ์ DNA ที่คำนวณได้มีขนาดอยู่ในช่วง 1000 – 1200 bp โดยเมื่อใช้คูไพรเมอร์แทนเล็กจะให้ขนาดขึ้น DNA 1,077 bp, คูไพรเมอร์ไข่น้ำจะให้ขนาดขึ้น DNA 1,175 bp และ คูไพรเมอร์แทนใหญ่จะให้ขนาดขึ้น DNA 1,190 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

6.7.4. การวิเคราะห์ชนิดของแทนด้วยเทคนิค PCR

6.7.4.1 คูไพรเมอร์ไข่น้ำ

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ไข่น้ำ และ DNA แม่พิมพ์จากแทนใหญ่ แทนเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบแถบ DNA ในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแทนใหญ่ และไข่น้ำตามลำดับ แต่ไม่พบแถบ DNA ในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแทนเล็ก (รูปที่ 59)



รูปที่ 59. Agarose Gel แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ไข่น้ำและ DNA แม่พิมพ์ที่สกัดจาก แทนใหญ่ (2) แทนเล็ก (3) และ ไข่น้ำ (4) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบขนาดแถบ DNA ที่ได้กับ 1 kb DNA ladder (1)

เมื่อวิเคราะห์ผลโดยการหาขนาดแถบ DNA โดยใช้โปรแกรม ImageJ (Schneider et al., 2012) พบว่าแถบ DNA ที่ปรากฏในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแห่นใหญ่และไข่น้ำ มีขนาด DNA เฉลี่ยเท่ากับ 1097 และ 1050 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5. ขนาดผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ ไข่น้ำและ DNA แม่พิมพ์ที่สกัดจากแห่นที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คำนวณโดยใช้โปรแกรม ImageJ (n=4)

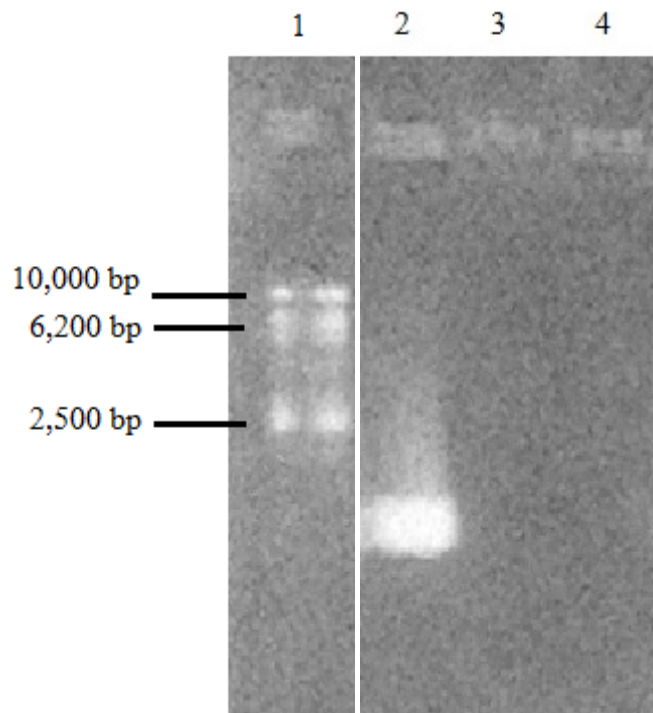
DNA แม่พิมพ์	ขนาด DNA	ค่าคลาดเคลื่อน
แห่นใหญ่	1097	±135
แห่นเล็ก	-	-
ไข่น้ำ	1050	±173

6.7.4.2 คูไพรเมอร์แห่นใหญ่

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์แห่นใหญ่และ DNA แม่พิมพ์จากแห่นใหญ่ แห่นเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบแถบ DNA ในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแห่นใหญ่ แต่ไม่พบแถบ DNA ในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแห่นเล็ก และไข่น้ำตามลำดับ (รูปที่ 60) เมื่อวิเคราะห์ผลโดยการหาขนาดแถบ DNA โดยใช้โปรแกรม ImageJ พบว่าแถบ DNA ที่ปรากฏในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแห่นใหญ่มีขนาด DNA เฉลี่ยเท่ากับ 1,140 bp (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6. ขนาดผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ แห่นใหญ่และ DNA แม่พิมพ์ที่สกัดจากแห่นที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คำนวณโดยใช้โปรแกรม ImageJ (n=4)

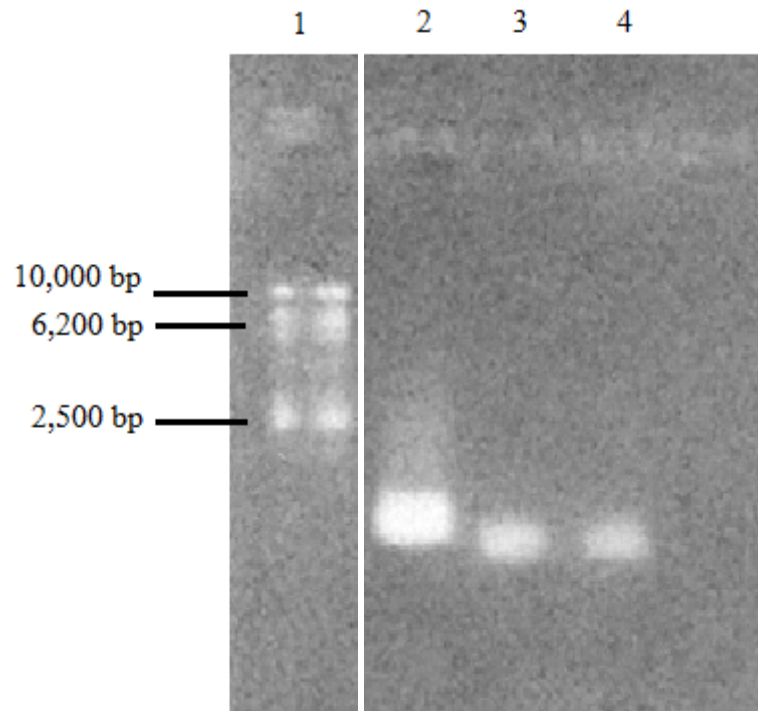
DNA แม่พิมพ์	ขนาด DNA	ค่าคลาดเคลื่อน
แห่นใหญ่	1140	±131
แห่นเล็ก	-	-
ไข่น้ำ	-	-



รูปที่ 60. Agarose Gel แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์แชนใหญ่และ DNA แม่พิมพ์ที่สกัดจาก แชนใหญ่ (2) แชนเล็ก (3) และ ไข่น้ำ (4) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบขนาดแถบ DNA ที่ได้กับ 1 kb DNA ladder (1)

6.7.4.3 คูไพรเมอร์แชนเล็ก

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์แชนเล็กและ DNA แม่พิมพ์จากแชนใหญ่ แชนเล็ก และไข่น้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบแถบ DNA ในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแชนทั้งสามชนิด (รูปที่ 61) และเมื่อวิเคราะห์ผลโดยการหาขนาดแถบ DNA โดยใช้โปรแกรม ImageJ พบว่าแถบ DNA ที่ปรากฏในช่องที่ใช้ DNA แม่พิมพ์จากแชนใหญ่ แชนเล็ก และไข่น้ำ มีขนาด DNA เฉลี่ยเท่ากับ 1,127 bp, 996 bp และ 943 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 7)



รูปที่ 61. Agarose Gel แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์แทนเล็กและ DNA แม่พิมพ์ที่สกัดจาก แหนใหญ่ (2) แหนเล็ก (3) และ ไข่น้ำ (4) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบขนาดแถบ DNA ที่ได้กับ 1 kb DNA ladder (1)

ตารางที่ 7. ขนาดผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คูไพรเมอร์แทนเล็กและ DNA แม่พิมพ์ที่สกัดจากแหนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คำนวณโดยใช้โปรแกรม ImageJ (n=4)

DNA แม่พิมพ์	ขนาด DNA	ค่าคลาดเคลื่อน
แหนใหญ่	1127	±154
แหนเล็ก	996	±212
ไข่น้ำ	943	±247

7. อภิปรายผลการวิจัย

7.1. การกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนในแทน

ตัวอย่างแทนใหญ่ แทนเล็ก และไข่น้ำจากแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพามีสิ่งมีชีวิตหลากหลายอาศัยอยู่ร่วมกัน เช่น หนอนน้ำ แมลงหลายชนิด สาหร่าย และจุลินทรีย์ เมื่อนำแทนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเข้มแสง พบว่ามีการปนเปื้อนของสาหร่าย และจุลินทรีย์ การปนเปื้อนดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ต่อไป ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยสารเคมีก่อนนำมาศึกษา

7.1.1. สารฟอกขาวเหมาะสมสำหรับใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแทนใหญ่และแทนเล็ก

จากการศึกษาพบว่าการใช้สารฟอกขาวในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแทนใหญ่และแทนเล็ก ส่งผลให้แทนใหญ่และแทนเล็ก มีร้อยละของการรอดชีวิตที่สูงที่สุด ในขณะที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยที่สุด ในขณะที่เมื่อใช้ทิงเจอร์ไอโอดีนกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนกลับไม่พบการรอดชีวิตของแทนใหญ่และแทนเล็ก แสดงให้เห็นว่าสารฟอกขาว เช่น ไฮเตอร์ มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายนอก ซึ่งสารฟอกขาวดังกล่าวมีราคาถูกจึงสามารถนำมาใช้ได้สะดวก โดยผู้วิจัยพบว่าสำหรับแทนใหญ่ การใช้ไฮเตอร์ความเข้มข้น 3% เป็นเวลา 5 นาที ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนและอัตราการรอดชีวิตที่ดีที่สุด ในขณะที่แทนเล็กจะไวต่อสารฟอกขาวมากกว่าแทนใหญ่ทำให้เวลาที่ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสั้นกว่าอยู่ในช่วง 1 – 3 นาที ที่ความเข้มข้นไฮเตอร์ร้อยละ 3 เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามที่เวลาและความเข้มข้นดังกล่าว แทนเล็กมีความแตกต่างระหว่างร้อยละการรอดชีวิตกับร้อยละการปนเปื้อนอยู่ประมาณ 30% ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปได้ว่าสารฟอกขาวมีความเหมาะสมที่สุดในการใช้กำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแทนใหญ่และแทนเล็ก เพื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

7.1.2. โพรโอดินไอโอดีนเหมาะสมสำหรับใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในไข่น้ำ

เนื่องจากไข่น้ำเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดทำให้ไข่น้ำมีความบอบบางที่สุดเมื่อเทียบกับแทนชนิดอื่น การใช้สารฟอกขาวหรือทิงเจอร์ไอโอดีนในการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนทำให้ไข่น้ำตายทั้งหมด ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะใช้โพรโอดินไอโอดีน เช่น เบตาดีน® ซึ่งมีฤทธิ์ในการกำจัดจุลินทรีย์เช่นเดียวกับทิงเจอร์ไอโอดีนแต่ฤทธิ์จะอ่อนกว่า จากการศึกษพบว่าความเข้มข้นของเบตาดีนที่เหมาะสมในการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนในไข่น้ำคือที่ 10% เป็นระยะเวลา 30 วินาที ซึ่งเป็นสภาวะเดียวที่ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการปนเปื้อนที่ 5 - 10% อย่างไรก็ตามข้อเสียของการใช้โพรโอดินไอโอดีนคือราคาที่แพงกว่าสารฟอกขาว แต่ก็สามารถหาซื้อได้ง่าย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปได้ว่าโพวิโดนไอโอดีนมีความเหมาะสมที่สุดในการใช้กำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในไข่น้ำ เพื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

7.2. อาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห่น

7.2.1. เห่นเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร Hoagland E

การเพาะเลี้ยงเห่นภายนอกตัวอาคารในสภาวะปลอดเชื้อทำได้ยาก และควบคุมสภาวะแวดล้อมที่สามารถรบกวนผลการทดลองได้ยาก เช่น ความเข้มแสงและอุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละวัน ผู้วิจัยจึงเลือกทำการเพาะเลี้ยงเห่นใหญ่ในห้องปฏิบัติการควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงความเข้มแสง $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ในอาหารเหลว 4 สูตร เพื่อค้นหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห่นในห้องปฏิบัติการ โดยผลการศึกษาพบว่าเห่นเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร Hoagland E เนื่องจากเห่นที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Hoagland E มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของเห่นใหญ่ เห่นเล็ก และไข่น้ำ ในอาหาร Hoagland E อยู่ที่ 6.6, 2.7 และ 2.4 วัน ตามลำดับ

ในขณะที่เห่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารอาหาร Hoagland E⁺ จะมีอาการใบเหลืองหรือขาวซีดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบการสร้างทิวเรียนจำนวนมากในเห่นใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงในระยะยาว ซึ่งเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งสาเหตุอาจมาจากอาหาร Hoagland E⁺ มีธาตุอาหารบางชนิดมากเกินไปโดยสังเกตได้จากเห่นกลับเจริญเติบโตได้ดีกว่าในอาหาร Hoagland E⁺ ครึ่งสูตร ทั้งนี้อาหารเหลวสูตร E⁺ มีธาตุอาหารหลักมากกว่าสูตร E ถึง 2-10 เท่า ซึ่งธาตุอาหารที่มีมากเกินไปอาจส่งผลยังการเจริญเติบโตได้ และเมื่อพิจารณาอาหาร MS และ SH จะพบว่า อาหารทั้งสองชนิดส่งผลให้เห่นเจริญเติบโตได้ไม่ต่างกัน แต่ไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในระยะเวลานาน เพราะหาอาหารทั้งสองชนิดนี้มีปริมาณธาตุอาหารบางชนิดที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเห่นน้อยกว่าอาหาร Hoagland E โดยสังเกตได้จากการใช้ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของอาหารทั้งสองสูตรส่งผลให้การเจริญเติบโตของเห่นลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับอาหาร Hoagland E ครึ่งความเข้มข้นซึ่งไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตมากนัก ดังนั้นจากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า อาหาร Hoagland E เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงเห่นในห้องปฏิบัติการ

7.2.2. อาหาร Hoagland E+ กระตุ้นการสะสมคาร์โบไฮเดรตในแหวน

จากการเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแหวนพบว่าแหวนที่เจริญในอาหารเหลวสูตร Hoagland E⁺ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด ในขณะที่การเจริญเติบโตโดยรวมจะช้าที่สุด แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตที่ช้านั้นส่งผลให้แหวนสามารถสะสมคาร์โบไฮเดรตได้มากขึ้น โดยเมื่อแหวนอยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมจะชะลอกระบวนการเจริญเติบโตส่งผลให้คาร์โบไฮเดรตที่สร้างขึ้นจากการสังเคราะห์ด้วยแสงไม่ถูกนำไปใช้ในการสร้างโครงสร้างและเกิดการสะสมเพิ่มขึ้นตามลำดับ

7.3. แหวนเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในห้องปฏิบัติการ

7.3.1. แหวนใหญ่ใช้เวลาเจริญเติบโตเต็มที่ 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาแหวนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคปโดยเริ่มต้นที่ 1 พรอนต์ พบว่าพรอนต์แรกจะไม่มี การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากพรอนต์นั้นๆเจริญเติบโตเต็มที่อยู่ก่อนแล้ว หรือการผืนแยกพรอนต์แหวนใหญ่ออกจากกันเพื่อทำให้ได้พรอนต์เดี่ยวอาจทำให้แหวนใหญ่หยุดการเจริญเติบโต และเป็นผลให้เวลาที่ใช้ในการเตรียมตัวสืบพันธุ์ต่างกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของพรอนต์ที่แตกออกมาใหม่ใกล้เคียงกัน ทุกหน่วยทดลองพรอนต์จะเจริญเติบโตเต็มที่ในเวลา 72 ชั่วโมงโดยกำหนดเวลาที่เจริญเติบโตเต็มที่เมื่อพรอนต์หยุดการเปลี่ยนแปลง และจะแตกพรอนต์ใหม่ทันทีเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ในชั่วโมงที่ 72 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแหวนใหญ่เป็นพืชที่เจริญเติบโตที่รวดเร็ว และพร้อมขยายพันธุ์ได้ทันทีเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

7.3.2. แหวนเล็กใช้เวลาในการเจริญเติบโตเต็มที่ 24 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่าแหวนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวความเข้มข้นปกติสูตร MS, SH, E และ E⁺ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เริ่มมีการเจริญของพรอนต์ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยในอาหารเหลวความเข้มข้นครึ่งสูตรใช้เวลานานกว่าอาหารเหลวความเข้มข้นปกติและในอาหารเหลว SH แหวนเล็กมีการเจริญมากขึ้นเรื่อยๆ จนแตกพรอนต์ใหม่ที่เวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่แหวนเล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E และ E⁺ มีการแตกพรอนต์ใหม่ที่เวลา 108 ชั่วโมง แต่แหวนเล็กที่เพาะเลี้ยงในน้ำกลั่นและอาหารเหลว MS ยังไม่มีการแตกพรอนต์ใหม่ในระยะเวลาที่ทดลอง ทั้งนี้แหวนเล็กที่เจริญในอาหารเหลว Hoagland E มีอัตราการแตกพรอนต์เร็วกว่าอาหารเหลว MS ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Kittiwongwattana และ Vuttipongchaikij (2013)

7.4. การใช้แหวนเป็นพีชต้นแบบในการศึกษาทางชีววิทยา

เนื่องจากแหวนใหญ่มีขนาดเล็กและเจริญเติบโตได้เร็ว และมีองค์ประกอบต่างๆของพืชดอกสมบูรณ์ เราจึงสามารถพัฒนาแหวนมาใช้ในการเรียนการสอนทางชีววิทยาได้ โดยเฉพาะการศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อและเซลล์ต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น การศึกษาโครงสร้างของท่อลำเลียง, แอเรนโคมา (เซลล์ที่ทำหน้าที่เก็บอากาศ), หรือเซลล์ชั้นผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้แหวนยังมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า Idioblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่สะสมผลิตภัณฑ์ของเมตาบอลิซึมไว้ภายใน และสามารถมองเห็นได้โดยใช้เทคนิค Differential Interference Contrast (DIC) นอกจากนี้เนื่องจากแหวนตอบสนองต่อสภาวะภายนอกได้เร็ว จึงเหมาะสมที่จะใช้ทดสอบการปิดเปิดของปากใบ โดยไม่ต้องมีการลอกเซลล์ชั้นผิวหนังออกมาทำการศึกษามิเหมือนการใช้พีชต้นแบบชนิดอื่น

7.4.1. โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแหวนใหญ่ แหวนเล็ก และไข่น้ำ ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ความเข้มแสง และความชื้นสัมพัทธ์โดยนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะภายนอกของแหวนพบว่า แหวนใหญ่มีขนาดของฟรอนต์ใหญ่ที่สุด รองลงมาคือแหวนเล็ก และไข่น้ำ ส่วนความหนาฟรอนต์ของแหวนใหญ่จะหนามากกว่าแหวนเล็ก แต่มีจำนวนปากใบและขนาดปากใบที่เล็กกว่าแหวนเล็ก และไข่น้ำ ดังตารางที่ 8 จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นทำให้สามารถจำแนกชนิดของแหวนเบื้องต้นได้ตามองค์ประกอบทางสัณฐานวิทยาดังกล่าว

ตารางที่ 8. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแหวน

ลักษณะที่ศึกษา	แหวนใหญ่	แหวนเล็ก	ไข่น้ำ
ความกว้างฟรอนต์แม่ (mm.)	3.95	1.37	0.45
ความยาวฟรอนต์แม่ (mm.)	5.38	2.41	0.56
ความหนาของฟรอนต์ (mm.)	0.21	0.16	-
จำนวนปากใบ (คู่/mm ²)	88.06	134.68	78.08
ความกว้างปากใบ (μm.)	12.57	13.67	23.55
ความยาวปากใบ (μm.)	19.98	22.51	30.49

7.4.2. ไข่น้ำเหมาะสมในการใช้ศึกษาการทำงานของปากใบ

เนื่องจากไข่น้ำมีขนาดปากใบที่ใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับแห่นเล็กและแห่นใหญ่ ซึ่งจะทำให้การสังเกตการปิดเปิดของปากใบทำได้ง่าย นอกจากนี้เนื่องจากไข่น้ำมีขนาดเล็กที่สุดทำให้ในแต่ละครั้งที่ทำการสังเกตจะได้ข้อมูลมาจากจำนวนตัวอย่างของไข่น้ำจำนวนมากเมื่อเทียบกับแห่นเล็กและแห่นใหญ่

7.5. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในแห่น

7.5.1. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรนมีความน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีฟินอล

ซัลฟิวริก

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรนและวิธีฟินอลซัลฟิวริกแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 อาทิเช่นแห่นใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเฉลี่ย 72.36 เมื่่วัดโดยวิธีแอนโทรน และ 110.83 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อวัดโดยวิธีฟินอลซัลฟิวริก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้จากวิธีฟินอลซัลฟิวริกมีปริมาณมากกว่าและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง ซึ่งอาจเกิดจากฟินอลสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบชนิดอื่นที่สกัดได้จากแห่นและมีผลรบกวนการวิเคราะห์

วิธีแอนโทรนมีความจำเพาะต่อน้ำตาลสูงกว่าวิธีฟินอลซัลฟิวริก โดยสังเกตได้จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีแอนโทรนและวิธีฟินอลซัลฟิวริก ซึ่งวิธีแอนโทรนสามารถตรวจพบคาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าทั้งในตัวอย่างแป้งมาตรฐาน (85.9 และ 68.7 เปอร์เซ็นต์ ในวิธีแอนโทรน และวิธีฟินอลซัลฟิวริก ตามลำดับ; ข้อมูลที่ไม่ได้ตีพิมพ์) หรือน้ำตาลมาตรฐาน (104.1 และ 72.5 เปอร์เซ็นต์ ในวิธีแอนโทรน และวิธีฟินอลซัลฟิวริก ตามลำดับ; ข้อมูลที่ไม่ได้ตีพิมพ์) แสดงให้เห็นว่าวิธีแอนโทรนน่าเชื่อถือกว่าวิธีฟินอลซัลฟิวริกในการวัดน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตที่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ในสภาวะที่ร้อนและเป็นกรด

7.5.2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยกรดโบซินโคนิค วิธีลอร์รี และวิธีเจลดาเลห์ มี

ประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน

ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยกรดโบซินโคนิค วิธีลอร์รี และวิธีเจลดาเลห์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สังเกตได้ว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีเจลดาเลห์จะมากกว่าอีก 2 วิธี ซึ่งความแตกต่างเล็กน้อยนี้อาจมาจากปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างแห่นใหญ่ที่นำมาวิเคราะห์ด้วยกรดโบซินโคนิค และวิธีลอร์รี ยังไม่ใช้โปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง เพราะการสกัดนั้นไม่สามารถทำได้ 100% แต่จากการทดลองพบว่า เมื่อเทียบร้อยละของปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ โดยให้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีเจลดาเลห์

เป็น 100% ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนในแห้งใหญ่ด้วย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก อยู่ที่ประมาณ 86% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยสามารถปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยการสกัดซ้ำ (Casal et al., 1999) อย่างไรก็ตามข้อได้เปรียบของการวิเคราะห์โปรตีนด้วยกรดโบซินโคนิค หรือวิธีลอร์วี คือการใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ทำให้วิเคราะห์หลายตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน เมื่อเทียบกับวิธีเจลดาลท์ ซึ่งต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณมากกว่า นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากแห้งใหญ่ด้วยกรดโบซินโคนิค หรือวิธีลอร์วี ก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าวิธีลอร์วีเหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากแห้งใหญ่ที่สุด เพราะมีราคาถูกกว่าการวิเคราะห์ด้วยกรดโบซินโคนิค

7.5.3. แห้งใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีปริมาณโปรตีนสูงแต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำ

แห้งใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสามสูตรมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในรูปแป้งและน้ำตาลไม่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E+ ที่ 10.9 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งถือว่าน้อยเมื่อเทียบกับพืชพลังงาน โดยมีประมาณ 1 ใน 3 ของหัวมันสำปะหลัง (30.15%, Karim et al., 2009) และมีประมาณ 1 ใน 6 ของกากมันสำปะหลัง (64.6%, Oboh, 2006) และคิดเป็นครึ่งหนึ่งของถั่วเหลือง (20.3%, Stevenson et al., 2006) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับแห้งเล็กและไข่น้ำแล้วพบว่าแห้งใหญ่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุด (แห้งเล็ก 28.7% และไข่น้ำ 18.84%, งานวิจัยนี้) อย่างไรก็ตามปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้ส่วนใหญ่มาจากฟรอนด์ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้นช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างจึงมีความสำคัญเพราะพืชจะสะสมแป้งมากที่สุดในตอนเย็น และจะพบแป้งน้อยที่สุดในเวลาเช้า ทำให้ตัวอย่างที่เก็บในเวลาเช้าจะมีการสะสมของแป้งน้อยกว่าตัวอย่างพืชที่เก็บในตอนเย็น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแห้งใหญ่ใช้แป้งที่สร้างขึ้นอย่างรวดเร็วในการสร้างชีวมวล เช่น เซลลูโลส และ เพคติน ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีแอนโทรน ทำให้เมื่อวิเคราะห์แล้วมีปริมาณแป้งสะสมอยู่น้อยเมื่อเทียบกับน้ำหนักทั้งหมด และสามารถอธิบายได้ว่าในอาหารเหลว Hoagland E+ ซึ่งแห้งใหญ่เจริญเติบโตได้ช้าที่สุดกลับมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด เพราะแป้งที่สังเคราะห์ขึ้นถูกสะสมไว้ และไม่ได้นำไปใช้ในการสร้างชีวมวล

แห้งใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสามสูตรมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของแห้งใหญ่ และปริมาณโปรตีนที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 200.65 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือ 20.06 เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักแห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากแห้งเล็ก (16%, งานวิจัยนี้; 20%, Casal et al., 1999) และมีประมาณครึ่งหนึ่งของถั่วเหลือง (39.6%, Stevenson et al., 2006) แต่มีมากกว่ากากมันสำปะหลังประมาณ 2.5 เท่า (8.2%, Oboh,

2006) และมากกว่าไชน้ำ (7.5%, งานวิจัยนี้) ดังนั้นแทนใหญ่จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นพืชเพื่อการผลิตโปรตีนมากกว่าคาร์โบไฮเดรต ยกเว้นกรณีที่ต้องการชีวมวลในปริมาณมาก

7.5.4. แทนเล็กที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง

แทนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E+ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้สูงสุดเท่ากับ 28.7% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าแทนใหญ่ (10.9%, งานวิจัยนี้) และยังมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตใกล้เคียงกับหัวมันสำปะหลัง (30.15%, Karim et al., 2009) ซึ่งเป็นพืชพลังงาน อีกทั้งยังมีปริมาณมากกว่าถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชอาหารประมาณ 1.5 เท่า (20.3%, Stevenson et al., 2006) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากแทนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SH เท่ากับ 16.0% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงกับโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากแทนเล็ก (20%) ดังในรายงานวิจัยของ Casal และคณะ (1999) และแทนใหญ่ (20.06%, งานวิจัยนี้) และยังมีปริมาณโปรตีนมากกว่าสองเท่าของกากมันสำปะหลัง (8.2%, Oboh; 2006) ซึ่งเป็นพืชพลังงาน แต่มีปริมาณโปรตีนเกือบครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชอาหาร (39.6%, Stevenson et al., 2006)

7.5.5. ไชน้ำที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงแต่มีปริมาณโปรตีนต่ำ

ไชน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E+ และ E มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้สูงสุดเท่ากับ 18.84% และ 18.67% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าแทนใหญ่ (10.9%; งานวิจัยนี้) และมีปริมาณมากกว่าถั่วเหลือง (11.4%, Steven และคณะ, 2006) ซึ่งเป็นพืชอาหารแต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่าแทนเล็ก (28.7%, งานวิจัยนี้) และยังมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่ากับมันสำปะหลัง (25.00%, Sriroth และคณะ, 1998) ซึ่งเป็นพืชพลังงาน ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากไชน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E เท่ากับ 7.48% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าแทนใหญ่และแทนเล็ก (20.06%, 11.7%, งานวิจัยนี้) ทั้งนี้พบว่าไชน้ำสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากถั่วเหลืองได้ถึงร้อยละ 75 ในการเลี้ยงไก่ไข่ ซึ่งจะทำให้สีสันของไข่แดงเพิ่มมากขึ้นด้วย (Chantiratikul et al., 2010) แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าไชน้ำเป็นพืชน้ำที่มีการสะสมโปรตีนน้อยเมื่อเทียบกับแทนใหญ่และแทนเล็ก แต่ไชน้ำสามารถนำไปประกอบอาหารและใช้ทดแทนอาหารสัตว์ได้ ดังนั้นการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ให้ไชน้ำมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นอาจช่วยให้ไชน้ำกลายเป็นพืชอาหารทางเลือกต่อไป

7.6. สารเคมีเหนียวนำที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็บในห้องปฏิบัติการ

7.6.1. กรดซาลิไซลิกชะลอการเจริญเติบโตของเห็บเล็กและเห็บใหญ่

กรดซาลิไซลิกที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เห็บเล็กมีการเจริญช้าลง แต่ไม่ส่งผลต่อการเติบโต ในขณะที่กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลให้เห็บใหญ่มีการเจริญเติบโตช้าลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเห็บเล็กและเห็บใหญ่เกิดความเครียด เนื่องจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม จึงส่งผลให้การเจริญเติบโตช้าซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cleland และ Ben-Tal (1982) ที่ศึกษาผลของการให้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของเห็บ (*Lemna gibba* สายพันธุ์ G3) ในอาหารสูตร Hutner พบว่ากรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง

7.6.2. กรดแอสไซซิกยับยั้งการเจริญเติบโตของเห็บเล็กและเห็บใหญ่

กรดแอสไซซิกที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เห็บเล็กมีการเจริญช้าลงและยับยั้งการเติบโต และกรดแอสไซซิกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เห็บเล็กมีการเจริญเติบโตช้าลง ในขณะที่กรดแอสไซซิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เห็บใหญ่มีการเติบโตช้าลง แต่ไม่ส่งผลต่อการเจริญ เนื่องจากกรดแอสไซซิกสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุในใบ จึงส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตในเห็บ (Dekock et al., 1978)

7.6.3. กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 ไมโครโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็บเล็กและเห็บใหญ่

กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติกที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็บเล็กและเห็บใหญ่ เนื่องจากกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติกเป็นสารคีเลตที่สามารถช่วยรักษาเสถียรภาพของวิตามินในอาหาร ทำให้วิตามินในอาหารไม่สูญเสียไปได้ง่ายและช่วยให้อาหารเสื่อมคุณภาพน้อยลง ป้องกันการตกตะกอนของเหล็ก จึงไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต

7.6.4. กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกชะลอการเจริญเติบโตของเห็บเล็กและเห็บใหญ่

กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เห็บเล็กมีการเจริญเติบโตช้าลง ในขณะที่กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลให้เห็บใหญ่มีการเจริญเติบโตช้าลง ส่วนกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เห็บใหญ่มีการเติบโตช้าลง เนื่องจากกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกเป็นสารในกลุ่มออกซินที่มีคุณสมบัติเป็นสารกำจัด

พืชพืช ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงสามารถทำให้พืชตาย หากใช้ความเข้มข้นต่ำจะสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้จึงส่งผลให้การเจริญเติบโตช้า

7.6.5. ต่างหับทิมยับยั้งการเจริญของแหนใหญ่

ต่างหับทิมที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแหนเล็ก ในขณะที่ต่างหับทิมที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้แหนใหญ่มีการเจริญช้าลง แต่ไม่ส่งผลต่อการเติบโต เนื่องจากต่างหับทิมเป็นเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างแรง ซึ่งอาจจะเกิดปฏิกิริยากับธาตุอาหารตัวอื่นที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ส่งผลต่อการเจริญช้า

7.6.6. สารเคมีเหนี่ยวนำที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 10 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้แหนเล็กและแหนใหญ่ออกดอกได้

การเหนี่ยวนำแหนเล็กและแหนใหญ่ด้วยสารเคมี โดยนำแหนที่มีลักษณะเป็นกระจุก 2 ใบ ที่ปราศจากการปนเปื้อนอายุประมาณ 1 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ PS ที่เติมสารเคมีเหนี่ยวนำเร่งการออกดอก ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดแอบไซซิก กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกและต่างหับทิม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ มาเพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 24-25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า แहनเล็กและแหนใหญ่มีการเกิดความเครียด เนื่องจากการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมจากการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี จึงทำให้มีการลดลงหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มขนาดของใบ แต่สารเคมีเหนี่ยวนำให้เกิดการออกดอกที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้แหนเล็กและแหนใหญ่ออกดอกได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสูตรอาหาร อุณหภูมิ ความเข้มแสงและช่วงเวลาการให้แสงยังไม่เหมาะสม หรือมาจากแหนเล็กและแหนใหญ่ที่นำมาเพาะเลี้ยงมีกระจุกของใบไม่ถึง 4 ใบ เมื่อเทียบกับแหนเล็กและแหนใหญ่ที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติที่มีกระจุกของใบ 4 ใบ จึงทำให้ยังไม่พบการออกดอกของแหนเล็กและแหนใหญ่ ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากงานวิจัยของ Tanaka และ Cleland (1980) ที่ใช้แหน *Lemna gibba* สายพันธุ์ G3 ที่มีลักษณะกระจุกของใบ 4 ใบ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Hoagland ที่มีกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 6000-7000 ลักซ์ และให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกดอกในแหนได้ นอกจากนี้ยังแตกต่างจากงานวิจัยของ Cleland และ Ben-Tal (1982) ที่ใช้แหน *Lemna gibba* สายพันธุ์ G3 ที่มีกระจุกของใบ 4 ใบ

มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Hutner ที่มีกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 6000-7000 ลักซ์ และให้แสง 9 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 11 วัน พบว่า กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกดอกในแทนได้ และแตกต่างจากงานวิจัยของ Krajncič และ Nemeč (1995) ที่เพาะเลี้ยงแทนใหญ่ในอาหารสูตร Pirson-seidel ที่มีกรดจัสโมนิก (Jasmonic acid) ที่ความเข้มข้น $0.475-47.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ โดยเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3000 ± 100 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หรือให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า กรดจัสโมนิกที่ความเข้มข้น $0.475-47.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกดอกในแทนใหญ่ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารที่ใช้ อุณหภูมิ ความเข้มแสงและช่วงเวลาการให้แสงมีผลต่อการออกดอกของแทน ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่านอกเหนือจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีแล้วการควบคุมชนิดและปริมาณของแสงที่เหมาะสมจะช่วยให้แทนออกดอกได้

7.7. การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของแทนด้วยเทคนิค PCR

7.7.1. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำไปตรวจสอบแทนแต่ละชนิด

การจำแนกชนิดของแทนโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาอาจช่วยให้แยกแยะแทนแต่ละชนิดได้ แต่ต้องใช้เวลาจนถึงจะสามารถจำแนกชนิดได้ ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อช่วยในการตรวจสอบยืนยันชนิดของแทนได้รวดเร็วยิ่งขึ้น จากการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Vector NTI โดยใช้ข้อมูลลำดับคลอโรพลาสต์จีโนม ของแทนใหญ่ แทนเล็ก และไข่น้ำ จากฐานข้อมูล NCBI ในการออกแบบจะกำหนดค่า $T_m=50-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\%GC=50-60$ และขนาดของไพรเมอร์ 1000-1200 bp ไพรเมอร์ที่ออกแบบจะมีความจำเพาะเจาะจง ต่อแทนชนิดนั้นๆ เมื่อออกแบบไพรเมอร์สำเร็จจะได้ forward primers และ reverse primers ของแทนแต่ละชนิด และเมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาตรวจพบข้อมูลของพืชตระกูลแทนที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ยังพบสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ต้องการศึกษา ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงกันอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน และมีเปอร์เซ็นต์ที่มีคู่เบสเหมือนกันอยู่ในระดับสูง

7.7.2. ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อแทนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากแทนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งสามชนิด พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาตรวจสอบแทนใหญ่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแทนใหญ่ ในขณะที่ไพรเมอร์แทนเล็กและไข่น้ำที่ออกแบบมาตรวจสอบแทนเล็กและไข่น้ำ ไม่มี

ความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากไพรเมอร์ไข่น้ำสามารถจับกับลำดับจีโนมของแหนใหญ่ ทำให้ปรากฏแถบชั้นดีเอ็นเอขึ้นมา ส่วนไพรเมอร์แหนเล็กสามารถจับกับลำดับจีโนมของแหนใหญ่ และไข่น้ำทำให้ปรากฏแถบชั้นดีเอ็นเอขึ้นมาเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นสามารถใช้บ่งบอกชนิดของแหนใหญ่ได้ชัดเจน และสามารถใช้งานแกชนิดของแหนทั้งสามชนิดได้จากผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

7.7.3. ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อพืชสกุลแหน (ข้อมูลที่ไม่ได้ตีพิมพ์)

จากการสกัดดีเอ็นเอจากจอกซึ่งเป็นตัวแทนของพืชน้ำกับพริกซึ่งเป็นตัวแทนของพืชบก เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ไข่น้ำและไพรเมอร์แหนใหญ่พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในขณะที่เมื่อใช้ไพรเมอร์แหนเล็กปรากฏแถบชั้นดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ไข่น้ำและไพรเมอร์แหนใหญ่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชสกุลแหนเท่านั้น ส่วนไพรเมอร์แหนเล็กไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชสกุลแหน เนื่องจากไพรเมอร์แหนเล็กสามารถจับกับลำดับจีโนมของจอกทำให้ปรากฏแถบชั้นดีเอ็นเอขึ้นมา แสดงว่าไพรเมอร์แหนเล็กมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชตระกูล Araceae ซึ่งประกอบไปด้วยจอกและแหน เป็นต้น ซึ่งอาจมีลำดับจีโนมที่ใกล้เคียงกัน

7.7.4. การวิเคราะห์หาสาเหตุความไม่จำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์

ในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ ได้มีการทำการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยการบลาสต์จากฐานข้อมูล NCBI ผลจากการทำอเล็กโตรโพรริซิสปรากฏว่ามีเพียงไพรเมอร์ของแหนใหญ่เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแหนใหญ่ จึงมีการตรวจสอบไพรเมอร์ไข่น้ำและไพรเมอร์แหนเล็กว่าเพราะสาเหตุใดจึงไม่มีความจำเพาะเจาะจงโดยนำข้อมูลลำดับของไพรเมอร์ไข่น้ำและแหนเล็กมาทดสอบด้วยโปรแกรม Vector NTI ผลจากการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ของแหนเล็กและไข่น้ำที่ออกแบบมาไม่มีความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากลำดับข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ของแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำใช้ลำดับจีโนมที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ของแหนทั้งสามชนิด ซึ่งมีลำดับที่คล้ายคลึงกันมาก เมื่อนำมาตรวจสอบหาลำดับที่ไม่เข้าคู่พบว่าไพรเมอร์ของไข่น้ำสามารถจับกับลำดับจีโนมของแหนใหญ่ และไพรเมอร์แหนเล็กสามารถจับกับลำดับจีโนมของแหนใหญ่และไข่น้ำ โดยมีลำดับที่ไม่เข้าคู่ประมาณ 1-3 คู่เบสในแต่ละไพรเมอร์ แสดงให้เห็นว่าลำดับที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยไม่ส่งผลต่อการเข้าคู่ของไพรเมอร์กับลำดับจีโนมของแหนทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับลำดับจีโนมของแหนและปรากฏแถบชั้นดีเอ็นเอขึ้นมาหลังจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการทำอเล็กโตรโพรริซิส

7.8. การพัฒนาแห่นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ

ถึงแม้ว่าผู้วิจัยยังไม่สามารถเหี่ยวนำให้แห่นออกดอกได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากอายุของแห่นใหญ่ที่นำมาเพาะเลี้ยงน้อยและยังไม่สามารถออกดอกได้ หรือมาจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากในงานวิจัยที่รายงานผลการเหี่ยวนำให้แห่นใหญ่ออกดอกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิและให้แสงที่ความเข้มแสงสูงกว่าที่ผู้วิจัยใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งยังต้องมีการศึกษาวิจัยสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มขึ้นในอนาคต เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ และปรับปรุงพันธุ์แห่นใหญ่ให้สามารถตอบสนองต่อโจทย์วิจัยได้ นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมไปพร้อมๆกันได้ โดยการถ่ายยีนที่สนใจเข้าไปในแห่นใหญ่ เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรมของแห่นใหญ่ได้มีการเปิดเผยแล้ว แต่ยังไม่มีการตั้งชื่อยีนและทำฐานข้อมูลที่สามารถเข้าถึงได้โดยง่าย (<http://spirodelagenome.org/>)

8. สรุปผลการวิจัย

แหน (duckweed) ที่พบในแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาประกอบไปด้วย 3 สายพันธุ์คือ แหนใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แหนเล็ก (*Lemna minor*) และ ไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) ซึ่งสามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ โดยทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยสารฟอกขาวหรือสารโพวิโดนไอโอดีน จากการศึกษาพบว่าแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำสามารถจำแนกได้ด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ให้สอดคล้องกับคลอโรพลาสต์จีโนมของแหนแต่ละชนิด และได้ขนาดชิ้น DNA หลังจากการทำ PCR เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ประมาณ 1140, 996, และ 1050 คู่เบส ตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกับที่ประมาณการไว้ จากการเปรียบเทียบการเจริญของแหนทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลว 4 สูตรพบว่าแหนทั้ง 3 ชนิดเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลว Hoagland E และมีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนทวีคูณของแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำ อยู่ที่ 6.6, 2.7 และ 2.4 วัน ตามลำดับ โดยแหนใหญ่และแหนเล็กจะใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเพื่อแตกฟรอนต์ใหม่ 72 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำมีลักษณะเป็นรูปวงรี มีขนาดฟรอนต์ (กว้าง x ยาว) เฉลี่ย 3.95×5.38 , 1.37×2.41 และ 0.45×0.56 มม. ตามลำดับ โดยมีจำนวนปากใบเฉลี่ย 88, 135 และ 78 คู่/มม.² ตามลำดับ และขนาดของปากใบ (กว้าง x ยาว) เฉลี่ย 12.6×20.0 , 13.7×22.5 และ 23.6×30.5 ไมครอน ตามลำดับ จากการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในแหนทั้ง 3 ชนิดพบว่า แหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland E+ โดยวัดค่าได้ 10.9, 28.7 และ 18.8 %ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 20.5, 16.0 และ 7.48 %ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารเคมีและฮอร์โมนบางชนิดที่ความเข้มข้น 10 μM มีผลในการชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนดังนี้ กรดซาลิไซลิกและกรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกมีผลในการชะลอการเจริญเติบโตของแหนเล็กและแหนใหญ่ และกรดแอบไซซิกยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนเล็กและแหนใหญ่ ในขณะที่ต่างยับยั้งการเจริญของแหนใหญ่เท่านั้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังไม่พบสารเคมีชนิดใดที่สามารถเหนี่ยวนำให้แหนออกดอกภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยผู้วิจัยกำลังศึกษาผลของแสงต่อการออกดอกของแหน และพัฒนากระบวนการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แหนเพื่อใช้พัฒนาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์และการแปลงพันธุ์ในแหนต่อไป

9. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้งาน

- 9.1. สามารถเพาะเลี้ยงแทนใหญ่ แทนเล็ก และไข่น้ำที่ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ภายในห้องปฏิบัติการ
- 9.2. นำแทนที่เพาะเลี้ยงได้มาเป็นพืชต้นแบบในการศึกษาทางด้านชีววิทยา ชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ
- 9.3. งานวิจัยชิ้นนี้นำไปใช้ในการเรียนการสอน 5 รายวิชา ได้แก่
 - 307312 เทคนิคระดับโมเลกุลในเทคโนโลยีชีวภาพ (มคอ.3)
 - 307313 ข้อมูลทางชีวภาพ
 - 307332 การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (มคอ.3)
 - 307483 หัวข้อเลือกสรรทางเทคโนโลยีชีวภาพ
 - 307493 ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ
- 9.4. ผลงานวิจัยได้นำไปเผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับประเทศในงานวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 5
- 9.5. ผลงานวิจัยได้นำไปใช้ในการบริการวิชาการในงานสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์แห่งชาติภาคตะวันออกเฉียงเหนือครั้งที่ 29 และครั้งที่ 30 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา
- 9.6. ผลงานวิจัยบางส่วนได้ถูกตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับประเทศในงานวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 6 (ออนไลน์ และคณะ, 2557) โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะเก็บไว้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติต่อไป
- 9.7. สามารถพัฒนาการใช้แทนเพื่อผลิตโปรตีนต่างๆโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม หรือใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ หรือใช้ชีวมวลในการทำชีวพลังงานต่อไปในอนาคต

10. เอกสารอ้างอิง

1. Casal JA, Vermaat JE and Wiegman F. 1999. A test of two methods for plant protein determination using duckweed. *Aquatic Botany*. **67**: 61–67.
2. Chantiratikul A, Chinrasri O, Chantiratikul P, Sangdee A, Maneechote U and Bunchasak C. 2010. Effect of replacement of protein from soybean meal with protein from *Wolffia* meal (*Wolffia globosa* (L.) Wimm.) on performance and egg production in laying hens. *Int. J. Poult. Sci.* **9**: 283-287.
3. Cleland CF and Ben-Tal Y. 1982. Influence of giving salicylic acid for different time periods on flowering and growth in the long-day plant *Lemna gibba* G3. *Plant physiology*. **70(1)**: 287-290.
4. Cowgill UM and Williams LR. 1989. Eds. American Society for Testing and materials. Phila. pp. 379-391.
5. Cross J. Synthetic Media for Growing Duckweeds. The Charms of Duckweeds. Retrieved August 13, 2013 from <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/media.htm>
6. DeKock PC, Vaughan D and Hall A. 1978. Effect of abscisic acid and benzyl adenine on the inorganic and organic composition of the duckweed, *Lemna gibba* L. *New Phytologist*. **81(3)**: 505-511.
7. Edwards K, Johnstone C and Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*. **19(6)**: 1349.
8. Karim OR, Fasasi OS and Oyeyinka SA (2009). Gari Yield and Chemical Composition of Cassava Roots Stored Using Traditional Methods. *Pakistan Journal of Nutrition*. **8(12)**: 1830-1833.
9. Kittiwongwattana C and Vuttipongchaikij S. 2013. Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata* during in vitro and ex vitro cultivation. *Maejo International Journal of Science and Technology*. **7(1)**: 60-69.

10. Krajncic B and Nemeč J. 1995. The Effect of Jasmonic Acid on Flowering in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. J. Plant Physiol. **146**: 754-756.
11. Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15(3)**: 473-497.
12. Pirson A and Seidel F. 1950. Cellular and physiological investigations of *Lemna minor* root with special consideration to potassium and calcium lack. Planta **38**: 431-473.
13. Oboh G. 2006. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp solid media fermentation techniques. Electronic Journal of Biotechnology. **9(1)**.
14. Schenk RU and Hildebrandt AC. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Can. J. Bot. **50**: 199-204.
15. Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. **9(7)**: 671-5.
16. Stevenson DG, Doorenbos RK, Jane J and Inglett GE. 2006. Structures and Functional Properties of Starch From Seeds of Three Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Varieties. Starch/Stärke **58**: 509-519.
17. Tanaka O and Cleland CF. 1980. Comparison of the ability of salicylic acid and ferricyanide to induce flowering in the long-day plant, *Lemna gibba* G3. Plant physiology. **65(6)**: 1058-1061.
18. อรไพลิน ใจประเสริฐ, พัทธนันท์ ทาระ และ สลิล ชันโรจน์. 2557. ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการเติบโตและการผลิตสารชีวโมเลกุลของจอก. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 6 วันที่ 20-21 มีนาคม 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา. 101-106.