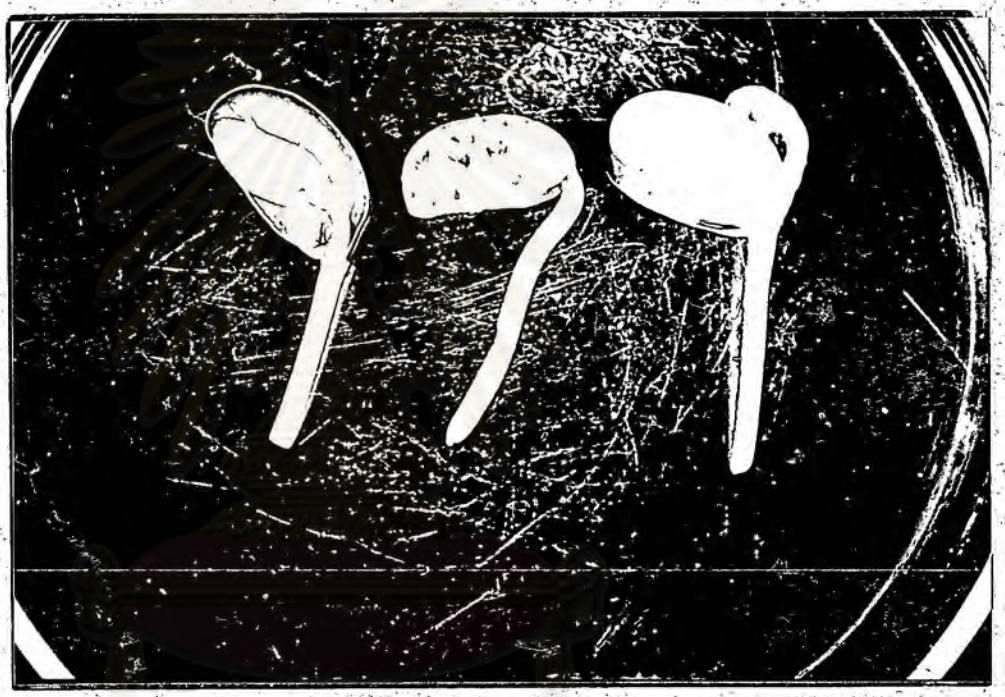
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนใบคู่แรกของถั่วเหลือง

3.1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากอาหารสามารถทำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิส และ ออร์แกนโนเจเนซิส

จากการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนใบคู่แรก โดยใช้อาหาร 6 สูตรพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและลักษณะที่สังเกตพบและรวบรวมได้(ตารางที่ 2) โดยทั่ว ๆ ไป จะสามารถเห็นการเกิดแคลลัสเมื่อเลี้ยงไปได้ประมาณ 7 วันโดยจะเห็นได้ตรงบริเวณขอบใบ แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ดี แคลลัสในทุกสูตรอาหารส่วนใหญ่จะเป็นแบบ compact ยกเว้นสูตร 4 จะเป็นแบบ friable และจะออกเป็นสีเหลืองอ่อน ๆ ซึ่งแตกต่างจากแคลลัสที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่น แคลลัสทั่ว ๆ ไปจะมีผิวขรุขระ เมื่อทำการเลี้ยงไปจนครบ 30 วัน จึงทำการย้ายลงในอาหารสูตรเดิมแล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อ พบว่าในอาหาร สูตรที่ 6 คือ B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล.และ NAA0.15 มก./ล. มีแคลลัส 3 แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง กล่าวคือเมื่ออายุประมาณ 45 วันหลังจากเริ่มทำการเลี้ยง บริเวณผิวของแคลลัสเกิดเป็นปุ่มเล็ก ๆ (primodium)ซึ่งจะเจริญออกมาเป็นใบ และรากคิดเป็น %regenerationเท่ากับ 3 % โดยแต่ละแคลลัสมีลักษณะดังตารางที่3 เมื่อทำการเลี้ยงต่อไปโดยทำการย้ายแคลลัสทั้ง 3 ลงในอาหารชนิดเดิมพบว่าแคลลัสทั้ง 3 เจริญต่อไปเล็กน้อย คือ ใบจะใหญ่ขึ้น และรากยาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เพื่อเลี้ยงไปจนอายุประมาณ 90 วัน แคลลัสทั้ง 3 ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ โดยใบจะร่วงและแคลลัสจะเหลืองในเวลาต่อมา (รูปที่ 4,5)



รูปที่ 3 ลักษณะการงอกของเมล็ดถั่วเหลือง เมื่อเพาะเลี้ยงใน water agar ที่อายุประมาณ 7 วัน สังเกตการพัฒนาของใบคู่แรกและไฮโปคอทิล (ศรชี้)

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส และลักษณะของแคลลัสใบคู่แรกในอาหาร 6 สูตร

สูตร	เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส
1	93	compact สีเขียวเข้ม
2	95	compact สีเขียวเข้ม
3	95	compact สีเขียวเข้ม
4	91	friable สีเขียวเข้ม --> เขียวอ่อน
5	92	friable สีเขียวเข้ม --> เขียวอ่อน
6	95	compact สีเขียวเข้ม

หมายเหตุ อาหารสูตร 1 MS เสริมด้วย BA 0.1 มก./ล. NAA 1.0 มก./ล.

อาหารสูตร 2 MS เสริมด้วย BA 0.05มก./ล. NAA 10. มก./ล.

อาหารสูตร 3 MS เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.125 มก./ล.

อาหารสูตร 4 B5 เสริมด้วย2,4-D 2 มก./ล.. Kinetin 0.5 มก./ล.

อาหารสูตร 5 B5 เสริมด้วย BA 0.5 มก./ล. 2,4-D 2 มก./ล.

อาหารสูตร 6 B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล.

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะแคลลัสใบคู่แรกที่มีการเกิด regeneration ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล.

แคลลัสที่	ลักษณะ
1	เกิดเฉพาะราก 3 ราก และมีสีขาว
2 และ 3	เกิดทั้งใบและราก โดยที่ใบจะมีขนาดประมาณ 0.2-0.5 ซม. ใบงอกออกจากก้อนแคลลัส มีก้านสั้นมาก โดยที่แต่ละแคลลัสมีใบ 7 และ 15 ใบตามลำดับ ใบสีเขียวอ่อน แต่ละแคลลัส มีราก 1 ราก ยาวประมาณ 1 ซม.

หมายเหตุ ขนาดของใบและรากวัดเมื่ออายุประมาณ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงการเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกถั่วเหลืองในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. ภาพถ่ายเมื่ออายุ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 แสดงการเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกถั่วเหลืองในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. ภาพถ่ายเมื่ออายุ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

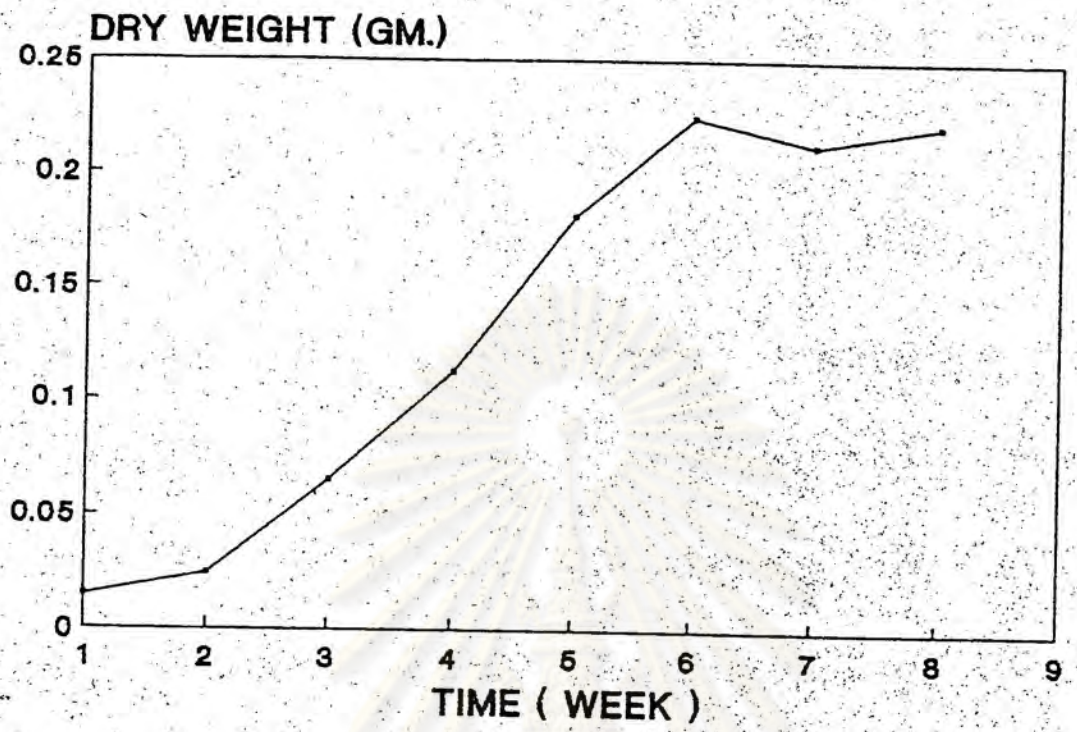
3.1.2 การศึกษาการเกิดแคลลัส และต้นในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล.

จากการที่อาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล., สามารถทำให้เกิด ออร์แกนเจเนซิสได้ จึงนำมาศึกษารายละเอียดลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาของแคลลัสไปสู่การเกิดอวัยวะผล การทดลอง (รูปที่ 6) พบว่าการเจริญของแคลลัสจะมีการเจริญที่ดี เข้าสู่ระยะการเจริญ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และจะเข้าสู่ stationary phase เมื่อสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นจะเข้าสู่ decline phase ในสัปดาห์ที่ 7 เมื่อแคลลัสไม่ได้รับการย้ายลงสู่อาหารใหม่ภายใน 8 สัปดาห์ แคลลัสจะเริ่มเหลืองและตายในที่สุดช่วงที่เหมาะจะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ จะอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 5

สำหรับการทดลองนี้พบว่ามีแคลลัสอยู่ 3 แคลลัสที่มีการพัฒนาของอวัยวะเกิดขึ้นคือมีใบและรากเกิดขึ้นคิดเป็นเปอร์เซนต์การเกิด regeneration เท่ากับ 5% โดยมี 2 แคลลัสที่เกิดเฉพาะใบอยู่ 5 ใบ ขนาดประมาณ 0.25 -0.5 ซม. เมื่อทำการย้ายอาหารและเลี้ยงต่อไป แคลลัสที่มีเฉพาะราก รากจะสามารถเจริญและยาวได้ ต่อไปเรื่อย ๆ แต่แคลลัสที่มีเฉพาะใบจะตายในเวลาต่อมาในเวลาประมาณ 3 เดือน

3.1.3 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหารที่เสริมด้วยแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)

จากการตรวจเอกสารพบว่าถั่วเหลืองต้องการไนโตรเจนในปริมาณที่สูงในการเจริญเติบโตและในอาหาร B5 เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น เช่น MS แล้วพบว่ามีไนโตรเจนอยู่น้อย จึงทำการเติม แอมโมเนียมไนเตรตลงในอาหาร B5 เท่ากับ 1650 มก./ล. ให้เท่ากับในอาหาร MS พบว่า



รูปที่ 6 กราฟแสดงการเจริญของแคลลัสใบคู่แรกของถั่วเหลือง ที่เลี้ยงในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 20-25 ^{0}C และให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของแคลลัสใบคู่แรกที่มีการเกิด regeneration ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล., NAA 0.15 มก./ล. และ NH_4NO_3 1,650 มก./ล.

แคลลัสที่	ลักษณะ
1	มีใบ 8 ใบ ขนาดประกอบ 0.2-0.5 สี เขียวอ่อน ก้านใบสั้นมาก ติดกับแคลลัสไม่พบราก
2	มีใบ 3 ใบ ขนาดประมาณ 0.2-0.3 ซม. สีเขียวอ่อน
3	มีใบ 14 ใบ ขนาดประมาณ 0.2-0.5 ซม. สีเขียวอ่อน
4	มีใบ 5 ใบ ขนาดประมาณ 0.2-0.5 ซม. มีราก 1 ราก ยาวประมาณ 1.5 ซม.
5,6,และ 7	มีเฉพาะราก โดยแต่ละแคลลัสมีราก 4,6 และ 13 รากตามลำดับ รากสีขาวใสขนาดยาวประมาณ 1-3 ซม.

หมายเหตุ ขนาดของใบและรากวัดเมื่ออายุประมาณ 60 วัน

เมื่อทำการเลี้ยงไปครบ 30 วัน พบว่ามีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสประมาณ 93% แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นแคลลัสแบบ compact และมีสีเขียวเข้มมีการเจริญเติบโตที่ดี (vigourous) มีขนาดประมาณ 1-2 ซม. เมื่อทำการย้ายลงในอาหารชนิดเดิมพบว่าหลังจากนั้นประมาณ 15 วัน จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้ชัดเจนโดยมีแคลลัสอยู่ 7 แคลลัส สามารถเกิดใบและรากได้ คิดเป็นเปอร์เซนต์การเกิด regenerationเท่ากับ 8.5 % โดยแคลลัสที่เปลี่ยนแปลงแต่ละแคลลัสมีลักษณะ ดังตารางที่ 4

หลังจากสังเกตผลแล้ว จึงทำการย้ายแคลลัสที่เกิด regeneration ทั้งหมดลงในอาหารชนิดเดิม เพื่อเลี้ยงต่อไป พบว่าผลออกมาแบบเดิมคล้ายกับการทดลองในข้อ 3.1.2 คือแคลลัสที่มีเฉพาะราก รากจะยังคงงอกยาวออกไป แต่ที่มีใบ ใบจะร่วงและตาย ส่วนแคลลัสที่มีทั้งรากและใบนั้น ใบจะร่วงส่วนรากยังคงเจริญต่อไปได้ภายในระยะเวลาประมาณ 3 เดือน

3.1.4 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสและต้น

จากการทดลอง (ตารางที่ 5 และรูปที่ 7,8)พบว่าใบคู่แรกของถั่วเหลือง สามารถเกิดแคลลัสได้ดีทุกอัตราส่วนของฮอร์โมนโดยมีขนาดประมาณ 1.5-2.5 ซม. แต่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA 4 มก./ล. พบว่าจะให้แคลลัสที่มีขนาดเล็กกว่าในสูตรอื่นๆ โดยมีขนาดประมาณ 1 ซม. แต่ลักษณะทั่วๆไป จะเหมือนในสูตรอื่น ๆ แคลลัสที่ได้เป็นแคลลัสแบบ compact ทั้งหมด

เมื่ออายุครบ 30 วัน จึงทำการย้ายลงในอาหารชนิดเดิมและสังเกตดูการเกิด regeneration พบว่า มีอาหารอยู่ 5 สูตรจากการทดลอง 15 สูตร ที่มีการเกิด regeneration เกิดขึ้นโดยมีจำนวนการเกิด regeneration ดังตารางที่ ในอาหารที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล.

ลักษณะของแคลลัสที่เกิด regeneration นั้นจะมี ลำต้น (shoot) ยาวประมาณ 3 ซม. กว้างประมาณ 0.1 ซม. มีใบ 9 ใบโดยจะมี 3 กิ่งแต่ละกิ่งจะยาวประมาณ 1 ซม.มีใบกิ่งละ 3 ใบ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาพธรรมชาติคือ เป็นใบที่เรียกว่า trifoliate และที่โคนต้นจะมีใบงอกออกมาจากแคลลัสอีก 3 ใบ(รูปที่ 9)

ในอาหารที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. ลักษณะแคลลัสที่เกิด regeneration จะไม่มีลำต้นแต่จะมีใบงอกออกมาจากแคลลัส มีใบแคลลัสละ 8 และ 10 ใบตามลำดับโดยมีขนาดประมาณ 0.2-0.5 ซม. ในแคลลัสที่มีใบ 10 ใบ จะมีราก 3 ราก ยาวประมาณ1-1.5 ซม.(รูปที่ 10)

ในอาหารที่มี BA 3 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล., BA 3 มก./ล.NAA 0.20 มก./ล., BA 4 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล., และ BA 4 มก./ล. NAA 0.20 มก./ล. จะแคลลัสที่มีเฉพาะรากโดยแต่ละแคลลัสจะมีรากประมาณ 4-20 เส้น สีขาวใส ยาวประมาณ 1-2 ซม.(รูปที่ 11)

3.1.5 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหาร B5 สูตรดัดแปลง (Modified B5)

จากการทดลองใช้อาหาร B5 สูตรดัดแปลง (CS23; Wright 1987) โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนแตกต่างกัน 3 สูตรพบว่าทั้ง 3 สูตรมีการเจริญเติบโตที่ดีลักษณะคล้าย ๆ กัน โดยมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสและลักษณะ ดังตารางที่

หลังจากนั้นเมื่ออายุครบ 30 วัน จึงทำการย้ายลงอาหารชนิดเดิมพบว่ามีอาหารเพียง 2 สูตรเท่านั้นที่สามารถทำให้เกิด regeneration ได้คือ อาหารสูตรที่ 1 คือ CS23 เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. และในอาหารสูตรที่ 3 คือ CS23 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล.และBA 2 มก./ล.โดยที่ทั้ง

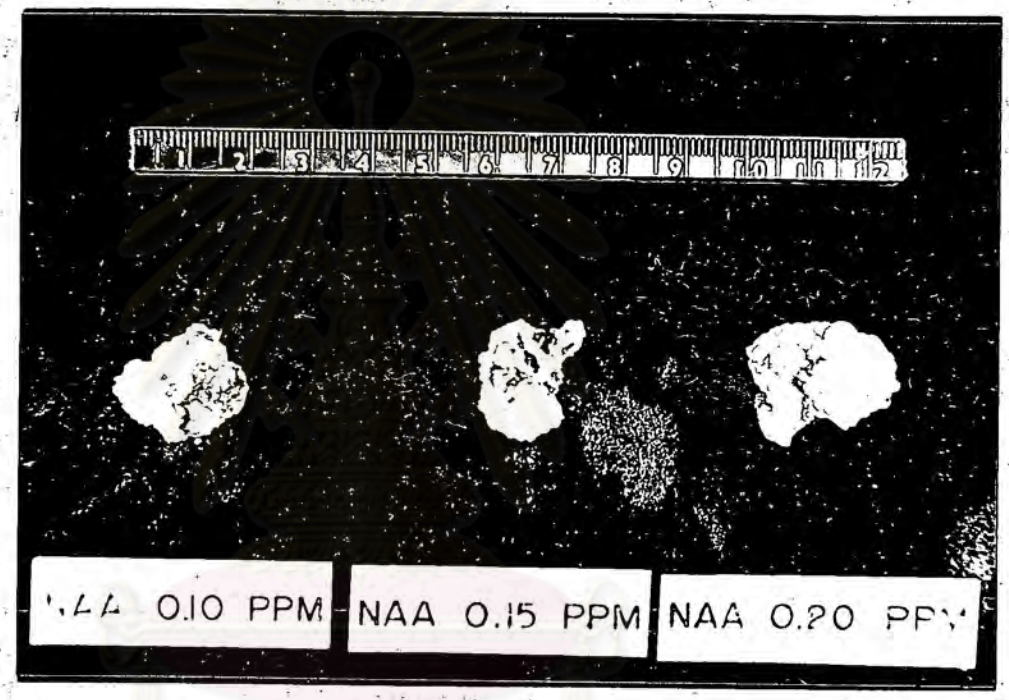
ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสใบคู่แรกในอาหาร B5 ที่มีอัตราส่วนของ BA และ NAA ต่าง ๆ กัน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน(มก./ล.)		เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส
BA	NAA	
1	0.10	80
	0.15	90
	0.20	96
2	0.10	90
	0.15	85
	0.20	90
3	0.10	95
	0.15	90
	0.20	98
4	0.10	97
	0.15	95
	0.20	95

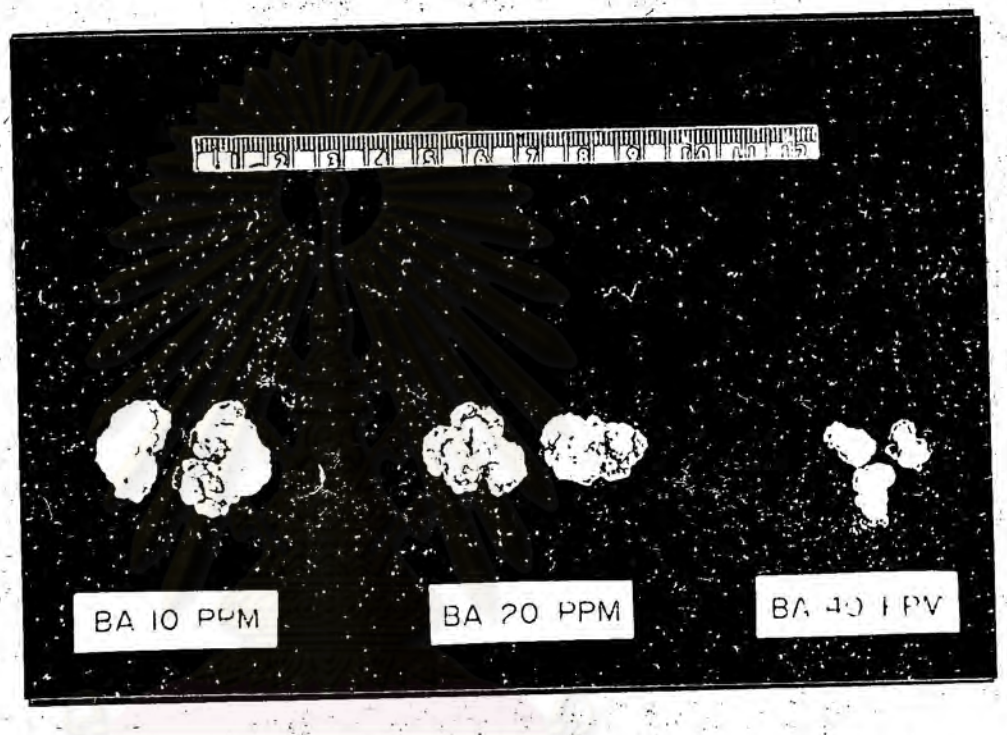
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงจำนวน แคลลัสใบคู่แรกที่เกิด regeneration ในอาหาร B5 ที่มีอัตราส่วนของฮอร์โมนต่าง ๆ กัน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน(มก./ล.)		จำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration	% regeneration
BA	NAA		
1	0.10	0	0
	0.15	1	3
	0.20	0	0
2	0.10	0	0
	0.15	2	5
	0.20	0	0
3	0.10	0	0
	0.15	8	20
	0.20	6	15
4	0.10	0	0
	0.15	9	23
	0.20	4	10



รูปที่ 7 ลักษณะแคลลัสใบคู่แรกที่เกิดขึ้นในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.10, 0.15, และ 0.20 มก./ล. แคลลัสมีอายุ 30 วัน สังเกตลักษณะของแคลลัสเป็นแบบ compact สีเขียวเข้ม



รูปที่ 8 ลักษณะแคลลัสใบคู่แรกที่เกิดขึ้นในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1,2,และ 4 มก./ล. แคลลัสอายุ 30 วัน สังเกต ที่ BA 4 มก./ล. จะให้แคลลัสที่มีขนาดเล็ก

รูปที่ 9 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นต้นในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. สังเกตจะพบใบแบบ trifoliate เหมือนกับต้นที่ปลูกในธรรมชาติ ในภาพเป็นต้นที่อายุประมาณ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นต้นในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล.และ NAA 0.15 มก./ล. สังเกตจะเห็นว่าใบจะเกิดออกมาจากแคลลัส และไม่มีลำต้นเหมือน ในภาพเป็นต้นที่อายุประมาณ 60 วัน

รูปที่ 11 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นรากในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 3-4 มก./ล. และ NAA 0.15-0.20มก./ล. สังเกตจะเห็นว่า รากจะมีขนาดเล็กสีขาวใส ยาวประมาณ 1-2 ซม. ในภาพเป็นต้นที่อายุประมาณ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 สูตร ให้เปอร์เซนต์การเกิด regeneration เท่ากันแต่มีลักษณะและรูปแบบของ regeneration แตกต่างกันดังตารางที่ 7,8,9 และรูปที่ 12-16

3.2 การเกิดแคลลัสและการกลับคืนเป็นต้นจากส่วนไฮโปคอทิล (hypocotyl)

3.2.1 การเกิดแคลลัสและต้นจากส่วนไฮโปคอทิลและอีพิคอทิล

จากการเลี้ยงส่วนของไฮโปคอทิลส่วนที่ต่ำกว่าข้อใบเลี้ยง 2, 4 และ 6 มม. และอิพิคอทิล 2 มม. พบว่าสามารถเกิดแคลลัสได้ทุกส่วนในอาหาร 3 สูตร โดยมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสดังตารางที่

ลักษณะภายนอกที่สังเกตุได้ของแคลลัสส่วนต่างๆในอาหารทั้ง 3 สูตรมีลักษณะคล้ายกันมากคือเป็นแคลลัสแบบ compact สีเขียวอ่อนจนถึงเขียวเข้ม มีขนาดประมาณ 0.5-1 ซม. เมื่อเทียบกับการเจริญของแคลลัสจากใบคู่แรกแล้วจะเจริญช้ากว่า

หลังจากเลี้ยงไปได้ 45 วัน สังเกตุการเปลี่ยนแปลงพบว่ามีเพียงส่วนไฮโปคอทิลที่ 2 มม. เท่านั้นที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร 3 สูตร ส่วนอื่น ๆ ไม่เกิดแม้ว่าจะทิ้งไว้และทำการย้ายลงอาหารใหม่ โดยส่วนไฮโปคอทิลที่ 2 มม.มีจำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration และเปอร์เซนต์การเกิด regeneration ได้สูงสุดคืออาหารสูตร 2 ถึง 11% (ตารางที่ 10)

สำหรับลักษณะของการเกิด regenerationในอาหารทั้ง 3 สูตรนั้น ส่วนใหญ่จะคล้ายกันคือให้ผลเป็น ลำต้น และใบเกิดขึ้นไม่พบรากยกเว้นในอาหารสูตรที่ 1คือ RV-5 เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. พบแคลลัสที่มีรากอยู่ 2 แคลลัส อาหาร 2 สูตรหลังคือ RV-5 เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล.จะให้แคลลัสที่มีการเกิด regeneration

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และจำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration ของใบคู่แรกในอาหาร CS23 3 สูตร

อาหารสูตรที่	เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส	ลักษณะ	จำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration
1	93	compact สีเขียว>เขียวอ่อน	6(7.5%)
2	95	compact สีเขียวเข้ม	0
3	80	compact สีเขียวเข้ม	6(7.5%)

หมายเหตุ สูตรที่ 1 CS23 เสริมด้วย 2,4 -D 0.5 มก./ล.

สูตรที่ 2 CS23 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล.และ BA 1 มก./ล.

สูตรที่ 3 CS23 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะของแคลลัสใบคู่แรกที่เกิด regeneration ในอาหารสูตร CS23 เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล.

แคลลัสที่	ลักษณะ
1,2	เกิดเฉพาะราก โดยจะมี 3 และ 6 รากตามลำดับและในรากแต่ละรากที่แตกต่างออกมาจากแคลลัสสามารถที่จะแตกออกมาเป็นรากย่อย ได้อีก
3,4	เกิดใบงอกออกมาจากแคลลัสมีต้นสั้นโดยมีใบ 7 และ 8 ใบ ใบ มีสีเขียวอ่อน ขนาดประมาณ 0.3-0.5 ซม.
5	เกิดลำต้นยาวประมาณ 1.5 ซม. มีใบลักษณะเรียวยาว 5 ใบ ขนาด 0.2-0.5 ซม. สีเขียวอ่อน โดยที่ลำต้นจะแตกออกมาตรงโคนต้นอีก 2 กิ่ง แต่ละกิ่งมีใบ 2 และ 3 ใบตามลำดับ และมีรากยาวประมาณ 3 ซม. 1 ราก งอกออกมาจากแคลลัส
6	เกิดลำต้น(Shoot) สั้น ๆ 3 ต้น ยาวประมาณ 0.5 ซม. แต่ละยอดจะมีใบประมาณ 5-6 ใบ ใบหนาประมาณ 0.2-0.5 ซม. และมีราก 1 เส้นยาวประมาณ 2-3ซม.

* หมายเหตุ ความยาวของใบลำต้นและรากวัดเมื่ออายุ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. สังเกตจะเห็นว่าการเกิดต้นและรากในแคลลัสเดียวกัน ในภาพเป็นต้นที่อายุประมาณ 60 วัน

ตารางที่ 9 แสดงลักษณะของแคลลัสที่เกิด regeneration ในอาหารสูตร CS23 เสริมด้วย BA 2 มก./ล.และ NAA 0.15 มก./ล.

แคลลัสที่	ลักษณะ
1,2,3,4	มีใบงอกออกมาจากแคลลัสโดยมีก้านสั้น ๆ มีใบประมาณ 6-15 ใบ ต่อแคลลัส ใบขนาดประมาณ 0.2-0.5 ซม.
5	มีลำต้น ยาวประมาณ 6-7 ซม. แตกออกมาเป็น 3 กิ่ง โดย 2 กิ่ง จะอยู่ข้างล่าง มีใบ 3 ใบต่อกิ่ง ที่ปลายยอดจะมีใบ 3 ใบ ใบมีขนาดประมาณ 0.3 -0.5 ซม. มีราก 1 รากงอกออกมาแคลลัสและแตกเป็นเส้นย่อยอีก 4 รากยาวประมาณ 2-3 ซม.
6	มีลำต้นยาวประมาณ 5-6 ซม. มีใบทั้งหมดประมาณ 15 ใบ โดยอยู่ที่ยอด 3 ใบ ตรงกลางลำต้น 3 ใบ และที่โคนต้นประมาณ 6 ใบ ใบมีขนาดประมาณ 0.2-0.5 ซม. ไม่พบราก

* หมายเหตุ ขนาดของใบ ลำต้น และรากวัดเมื่ออายุ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นรากในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. สังเกตจะเห็นว่าการเกิดราก สีขาวจำนวนมาก ที่แตกออกมาจากแคลลัส ในภาพเป็นแคลลัสที่อายุประมาณ 60 วัน

รูปที่ 14 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล.และ NAA 0.15 มก./ล. สังเกตจะเห็นว่า การเกิด ใบ ลำต้น และรากในแคลลัสเดียวกันในภาพเป็นต้นที่อายุประมาณ 60 วัน

รูปที่ 15 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. สังเกตจะเห็นว่าการเกิดใบจะงอกออกมาจากแคลลัสไม่มีลำต้น ในภาพเป็นต้นที่อายุประมาณ 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มากที่สุด รองลงมาคือสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 ดังมีลักษณะของการเกิด regeneration ในอาหารแต่ละสูตร(ตารางที่ 11-14 และรูปที่ 16-18)

3.2.2 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนไฮโปคอทิล

จากการทดลองพบว่าสามารถเกิดแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตร โดยมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสได้ดีไม่แตกต่างกันมากนักแต่ดูเหมือนว่าที่มี BA สูงถึง 3 มก./ล. หรือมากกว่านี้จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง(ตารางที่ 15)แคลลัสทั่ว ๆ ไป ในทุกสูตรมีลักษณะคล้าย ๆ กันโดยจะมีสีเขียวเข้ม เป็นแคลลัสแบบ compact ขนาดทั่ว ๆไปของแคลลัสอยู่ระหว่าง 0.5 - 1 ซม.

หลังจากทำการเลี้ยงไปได้ 45 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง พบว่ามีอาหารเพียง 4 สูตรที่สามารถทำให้เกิด regeneration ได้คือ

1. RV-5 เสริมด้วย BA 0.5 มก./ล.IAA 0.2 มก./ล.
2. RV-5 เสริมด้วย BA 0.5 มก./ล.IAA 0.3 มก./ล.
3. RV-5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล.IAA 0.1 มก./ล.
4. RV-5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล.IAA 0.2 มก./ล.

โดยจะมีจำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration ได้ดีที่สุดในอาหารสูตร RV-5 ซึ่งเสริมด้วย BA 0.5 มก./ล. กับ IAA 0.1 มก./ล.(17%)และ RV-5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. กับ IAA 0.1 มก./ล. (7%)(ตารางที่ 16 และรูปที่ 19)หลังจากนั้นจึงนำยอดที่เกิดขึ้นไปชักนำให้เกิดรากต่อไป

3.2.3 ผลการใช้อาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากไฮโปคอทิลไปชักนำให้เกิดต้นในเนื้อเยื่อใบคู่แรก

จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้แคลลัสไฮโปคอทิล

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของส่วนไฮโปคอทิล ที่ 2,4 และ 6 มม. และส่วนอีพิคอทิล ในอาหาร RV-5 สูตร 3 สูตร

อาหารสูตรที่	เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส			
	ไฮโปคอทิล			อีพิคอทิล
	2 มม.	4 มม.	6 มม.	
1	90	87	93	78
2	92	90	90	85
3	90	85	95	80

หมายเหตุ อาหารสูตรที่ 1 RV-5 เสริมด้วย IAA 1.10 มก./ล. BA 0.4 มก./ล.

อาหารสูตรที่ 2 RV-5 เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. BA 0.4 มก./ล.

อาหารสูตรที่ 3 RV-5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. BA 1 มก./ล.

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนแคลลัสของส่วนไฮโปคอทิล ที่เกิด regeneration และเปอร์เซนต์ regeneration ในอาหาร RV-5 3 สูตร

สูตรที่	จำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration	% regeneration
1	4	5
2	9	11
3	2	3

หมายเหตุ อาหารสูตรที่ 1 RV-5 เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล. BA 0.4 มก./ล.

อาหารสูตรที่ 2 RV-5 เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. BA 0.4 มก./ล.

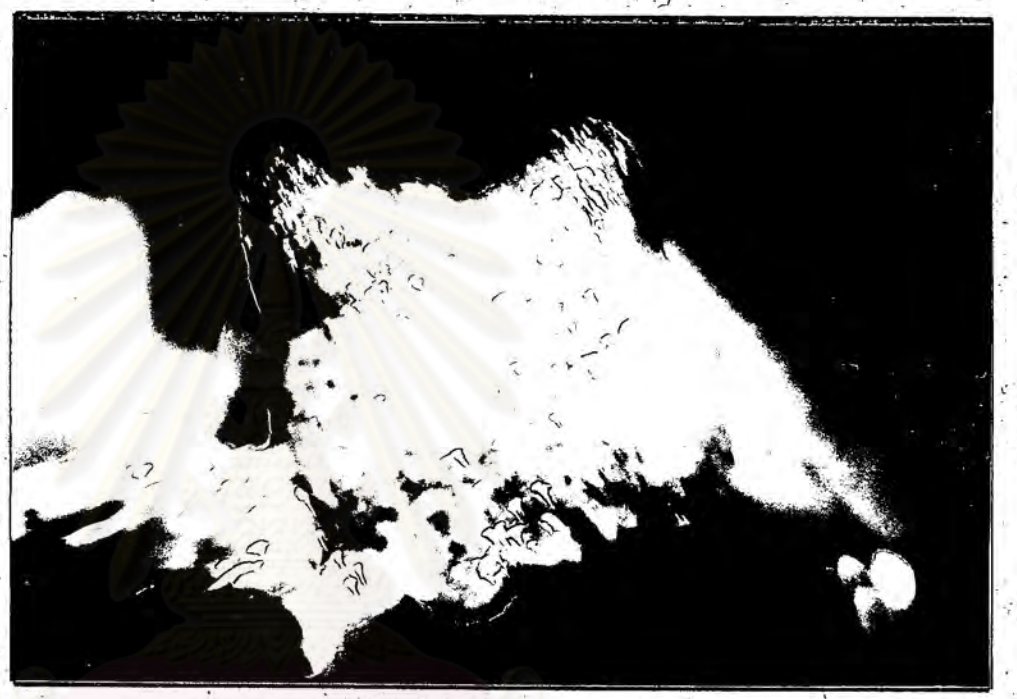
อาหารสูตรที่ 3 RV-5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. BA 1 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะของแคลลัสไฮโปคอทิลที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร RV-5 เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล.และ BA 0.4 มก./ล.

แคลลัส	ลักษณะ
1,2	มีใบ 2 ใบ ขนาดประมาณ 0.2 ซม. งอกออกมาจากแคลลัส และมีลำต้นขนาดประมาณ 2-3 ซม. มีใบที่ยอด 2-3 ใบ ใบมีขนาดประมาณ 0.3 ซม. มีรากสีขาวยาวประมาณ 2-3 มม. 1 เส้น
3,4	ที่ผิวของแคลลัสมีลักษณะการรวมตัวกันของเนื้อเยื่อคล้ายกับ เอมบริออยด์ ในระยะ globular stage และระยะ heart stage ขนาดแต่ละอันประมาณ 1 มม. โดยจะพบรอบ ๆ แคลลัส

หมายเหตุ ขนาดของลำต้นใบ ราก วัดเมื่ออายุประมาณ 45 วัน



รูปที่ 16 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิล ที่เป็นเอมบริออยด์ในระยะ heart-stage ในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. ที่อายุประมาณ 30 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะของแคลลัสไฮโปคอทิลที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร RV-5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล.และ BA 1 มก./ล.

แคลลัส	ลักษณะ
1	มีลำต้นยาวประมาณ 1 ซม. มีใบที่ยอด 3-4 ใบ และที่รากต้นตรงบริเวณติดกับแคลลัสจะมีใบ ประมาณ 5 ใบ ใบมีขนาดประมาณ 0.3-0.5 ซม.
2	มีลำต้นยาวประมาณ 2 ซม. มีใบ 3 ใบ ขนาดประมาณ 0.3 ซม. ที่บริเวณยอด ไม่พบราก

หมายเหตุ ขนาดของใบและลำต้นวัดเมื่ออายุประมาณ 45 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย NAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. ที่อายุประมาณ 45 วัน สังเกตการเกิดลำต้น และใบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงลักษณะของแคลลัสไฮโปคอทิลที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร RV-5 เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล.และ BA 0.4 มก./ล.

แคลลัส	ลักษณะ
1	มีก้าน 1 ก้านยาว 1 ซม. มี 8 ใบ งอกออกมาจากแคลลัส ใบมีขนาดประมาณ 0.3 ซม.
2	มีลำต้น 3 ต้น ขนาดประมาณ 1-1.5 ซม.และมีใบ 3-5 ใบต่อ 1 ต้น ขนาดประมาณ 0.3 ซม.
3	มีลำต้นยาวประมาณ 5-6 ซม. 1 ต้นและมีใบ 3 ใบขนาดประมาณ 0.3 ซม. และมีโคนต้นจะมีลำต้นขนาด 1 ซม. อีก 1 ต้น งอกออกมามีใบ 3 ใบ
4	มีลำต้น 2 ต้น ยาวประมาณ 2 ซม. มีใบประมาณ 4-5 ใบ ขนาดประมาณ 0.3 ซม.
5	มีลำต้น 1 ต้น ยาวประมาณ 6-7 ซม. มีใบ 4 ใบ ขนาดประมาณ 0.3 ซม.
6	มีลำต้น 1 ต้น ยาวประมาณ 5 ซม. มีใบ 4 ใบ
7	เกิดลำต้นสั้น ๆ ยาวประมาณ 1 ซม. มีใบ 6 ใบในขนาดประมาณ 0.3 - 0.5 ซม.
8	เกิดลำต้น 3 ต้น ยาวประมาณ 0.5-1 ซม. แต่ละต้นมีใบ 2-3 ใบ
9	มีลำต้น 1 ต้น ยาวประมาณ 2 ซม. มีใบประมาณ 4-5 ใบ ขนาดประมาณ 0.3 ซม.

หมายเหตุ ขนาดของใบและลำต้นวัดเมื่ออายุ 45 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. ที่อายุประมาณ 45 วัน สังเกตลักษณะการเกิดลำต้น และใบ ที่มีขนาดและแบบต่างๆกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่มีอัตราส่วนของ IAA และ BA ต่าง ๆ กัน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน(มก./ล.)		เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส
BA	IAA	
0.5	0.1	82
	0.2	85
	0.3	79
	0.4	90
1	0.1	79
	0.2	78
	0.3	82
	0.4	89
2	0.1	80
	0.2	85
	0.3	77
	0.4	95
3	0.1	65
	0.2	70
	0.3	75
	0.4	72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงจำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration ในอาหาร RV-5 ที่มีอัตราส่วนของ IAA และ BA ต่าง ๆ กัน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน (มก./ล.)		จำนวนแคลลัส	% regeneration
BA	IAA	ที่เกิด regeneration	
0.5	0.1	0	0
	0.2	10	17
	0.3	2	3
	0.4	0	0
1	0.1	1	7
	0.2	3	5
	0.3	0	0
	0.4	0	0
2	0.1	0	0
	0.2	0	0
	0.3	0	0
	0.4	0	0
3	0.1	0	0
	0.2	0	0
	0.3	0	0
	0.4	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย IAA 0.1-0.3 มก./ล. และ BA 0.5-1 มก./ล. ที่อายุประมาณ 45 วัน สังเกตลักษณะการเกิดลำต้น และใบ ที่มีขนาดและแบบต่างๆกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกิดต้นจะมีคุณสมบัติในการชักนำให้ใบคู่แรกเกิดแคลลัสได้ทุกสูตร โดยลักษณะของแคลลัสทั่ว ๆ ไปจะมีลักษณะคล้าย ๆ กันกล่าวคือ ลักษณะของแคลลัสเป็นแบบ compact มีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม มีขนาดประมาณ 0.5-1.5 ซม. โดยมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสดังตารางที่ 17

หลังจากเมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน จึงทำการย้ายลงในอาหารชนิดเดิมและทำการเลี้ยงต่อไป พบว่าแคลลัสสามารถเจริญต่อไปได้ แต่ไม่พบการเกิด regeneration แม้ว่าจะเลี้ยงต่อไปให้ครบ 60 วันแล้วทำการย้ายลงในอาหารชนิดเดิม ก็ไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นต้นได้เลย

3.3 การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่เกิดขึ้น

จากการทดลองพบว่าในอาหารทั้ง 2 สูตรนั้นยังไม่สามารถที่จะชักนำให้เกิดรากได้ โดยเมื่อเริ่มต้นปักต้นลงไปนั้น ต้นถั่วเหลืองจะสามารถคงสภาพโดยลำต้นและใบยังอยู่ในสภาพปกติ โดยยังมีสีเขียวและลำต้นดูสดไม่เหี่ยวหลังจาก 7 วันใบของถั่วเหลืองจะค่อย ๆ เริ่มเหลืองแล้วร่วงในที่สุด แต่ว่าลำต้นยังคงเป็นสีเขียวอยู่และที่โคน

ต้นจะเกิดกลุ่มแคลลัสขึ้นมาในระยะเวลา 10 วัน ต้นถั่วเหลืองยังคงไม่ตาย ผลการวิจัยพบว่าการเปลี่ยนแปลงจะเหมือนกันในอาหารทั้ง 2 สูตร แต่ไม่สามารถที่จะเกิดรากได้(รูปที่ 20)

3.4 การเลี้ยงต้นถั่วเหลืองสมบูรณ์ที่เกิดขึ้นจากการกลับคืนเป็นต้นจากแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นและ

ตารางที่ 17 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อใบคูแรกในอาหาร RV-5 ที่ อัตราส่วนของ BAและ NAA ต่าง ๆ กัน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน(มก./ล.)		เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส
BA	NAA	
0.5	0.10	89
	0.15	90
	0.20	85
	0.25	80
1	0.10	95
	0.15	98
	0.20	90
	0.25	92
2	0.10	91
	0.15	89
	0.20	75
	0.25	83
3	0.10	85
	0.15	82
	0.20	87
	0.25	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิล ในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย IBA 5 มก./ล. โดยการตัดลำต้นและปักลงในอาหาร

รากสมบูรณ์ โดยทำการเพาะในขวดที่บรรจุ vermiculite และใส่อาหารชนิดเดิม (CS23) ที่สามารถทำให้เกิดต้นสมบูรณ์ได้ พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงต้นที่มีรากด้วยนั้น ขณะเริ่มแรก ต้นถั่วเหลืองยังดูแข็งแรง แต่เมื่อเลี้ยงไปได้ประมาณ 7 วัน ใบถั่วเหลืองจะเริ่มเหลืองโดยจะเหลืองจากขอบก่อน จากนั้นต้นถั่วเหลืองจะเริ่มเหี่ยวและตายในเวลาต่อมา แม้ว่าจะเติมอาหารและไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ตาม (รูปที่ 21)

3.5 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ใบเลี้ยง และไฮโปคอทิลของถั่วเหลือง

จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์ จากส่วนต่าง ๆ ของ ต้นถั่วเหลือง (วิธีข้อ 2.10.5)พบว่า

ใบ เมื่อใช้ใบอ่อนที่มีอายุประมาณ 7-10 วันหรือใบแก่ของต้นถั่วเหลืองอายุประมาณ 30 วัน ไม่สามารถที่จะแยกโปรโตพลาสต์ได้ แต่ว่าเอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสที่ใช้จะย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ได้ แต่ไม่สามารถจะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของเซลลูเลส จนถึง 4% หรือทำการแยกโดยใช้เวลานานถึง 24 ชั่วโมงก็ตามก็จะได้เฉพาะเซลล์ที่ถูกแยกออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆเท่านั้น(รูปที่ 22)

ใบเลี้ยง เมื่อใช้ใบเลี้ยงที่ได้จากการเพาะในสภาพปลอดเชื้อที่อายุ 10-14วัน ไม่สามารถที่จะแยกโปรโตพลาสต์ได้เช่นกัน แต่เอนไซม์สามารถที่จะแยกเซลล์ของใบเลี้ยงให้หลุดออกมาเป็นเซลล์ที่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ตั้งแต่ 2-3 เซลล์ขึ้นไปได้ เนื่องจากว่าเซลล์ของใบเลี้ยงเป็นเซลล์ขนาดใหญ่กว่าเซลล์ในใบพืชปกติทั่ว ๆ ไปเมื่อเซลล์ของใบเลี้ยงหลุดออกมาแล้ว จะสามารถเห็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายโปรโตพลาสต์อยู่ในเซลล์ที่หลุดออกมา แต่มีผนังเซลล์หุ้มอยู่ เมื่อเพิ่มความ

รูปที่ 21 การเพาะเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่เป็นต้นสมบูรณ์ ที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นของแคลลัสใบคู่แรก ใน ขวดที่บรรจุ vermiculite และอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นและนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เข้มข้นของเซลล์แคลลัสก็ไม่สามารถทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาได้ (รูปที่ 23)

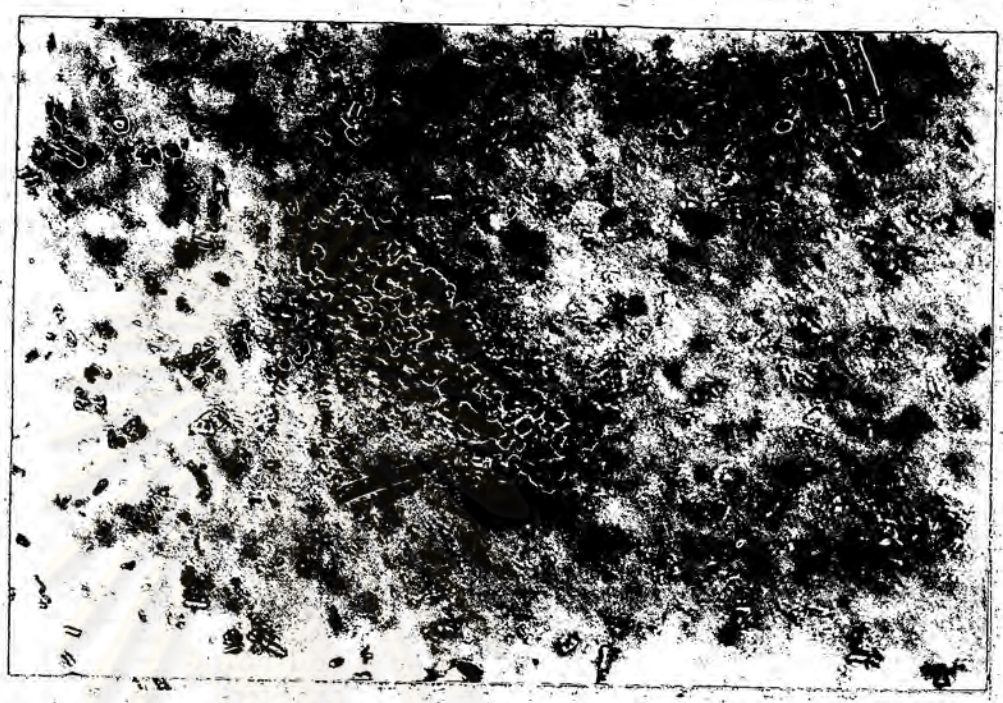
ไฮโปคอทิล เมื่อใช้ไฮโปคอทิลที่อายุ 10-14 วันสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้แต่ว่าได้ปริมาณน้อยมาก โปรโตพลาสต์มีขนาดประมาณ 40 ไมครอน ลักษณะใสไม่สามารถเห็นองค์ประกอบภายในของโปรโตพลาสต์ได้เนื่องจากโปรโตพลาสต์ใสมาก

3.6 การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส

3.6.1 การศึกษาแคลลัสที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของส่วนใบคู่แรกซึ่งมีลักษณะ 2 ชนิดคือแบบ compact ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. กับแบบ friable ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 2มก./ล.และ 2,4-D 2 มก./ล. พบว่าในแคลลัสแบบ compact ไม่สามารถที่จะแยกโปรโตพลาสต์ได้ โดยพบว่าเซลล์ที่จะถูกย่อยออกมานั้นมีน้อยมากส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มเซลล์ที่หลุดออกมาเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดตั้งแต่ 20-30 เซลล์ขึ้นไปแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณของมาเซโรไซม์จนถึง 2% และใช้เซลลูเลสถึง 4 % ก็ไม่สามารถที่จะแยกโปรโตพลาสต์ได้ ในขณะที่แคลลัสที่เป็นแบบ friable สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้โดยสามารถตรวจสอบดูได้จากการใช้สีย้อม fluorescent bitener พบว่าโปรโตพลาสต์จะไม่เรืองแสงเมื่อดูด้วยแสง UV เพราะเนื่องจากโปรโตาพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall)

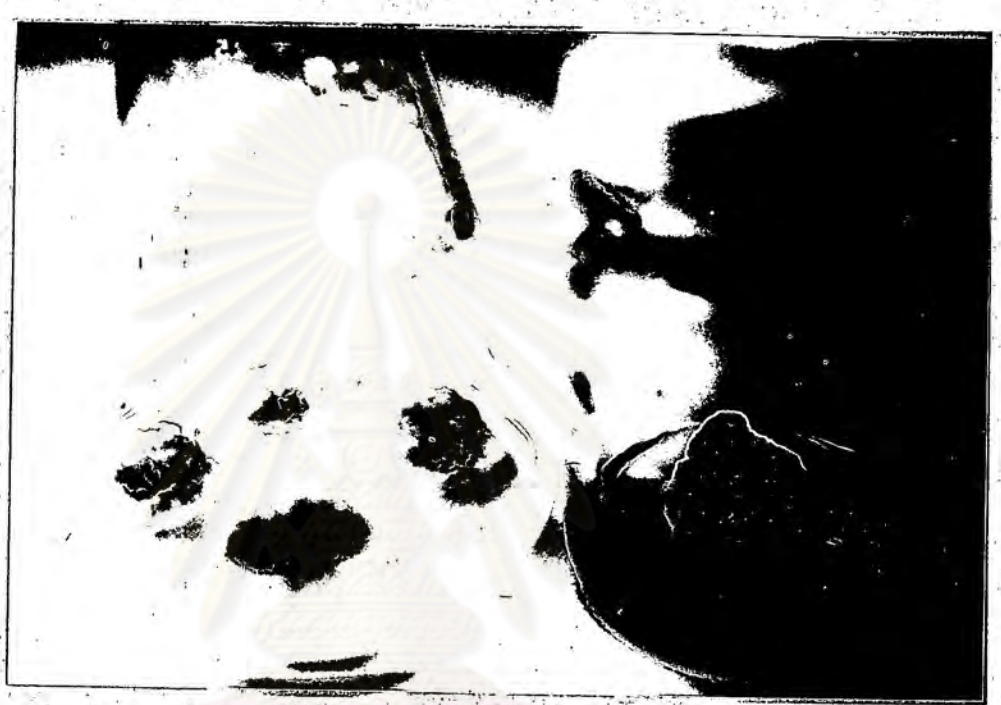
ดังนั้นในการศึกษาหาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการแยกโปร



รูปที่ 22 เซลล์เดี่ยวๆที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์ของใบ เมื่อย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:1 % นาน 18 ชั่วโมง (กำลังขยาย 280 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 ลักษณะของเซลล์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงของถั่วเหลือง เมื่อย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:1 % นาน 18 ชั่วโมง สังเกตการย่อยที่ไม่สมบูรณ์(กำลังขยาย 1200 เท่า)



รูปที่ 24 ลักษณะของแคลลัสใบคู่แรกแบบ friable ที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ 2,4-D 2 มก./ล. (ซ้าย) กับแคลลัสแบบ compact ที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล.และ NAA 0.15 มก./ล.(ขวา)

โตพลาสต์จึงจะใช้แคลลัสใบคู่แรก ชนิด friable เป็นแหล่งของเซลล์ในการแยกโปรโตพลาสต์

3.6.2 การหาความเข้มข้นเอนไซม์มาเซโรไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลองหาความเข้มข้นมาเซโรไซม์ที่เหมาะสม เพื่อที่จะให้แคลลัสใบคู่แรกแยกหลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวมากที่สุด (ข้อ 2.10.6.2) ผลการทดลอง (ตารางที่ 16) เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมงพบว่า ได้ผลใกล้เคียงกันคือ ที่ความเข้มข้นของมาเซโรไซม์ 0.1 % จะให้เซลล์เดี่ยว ๆ น้อยที่สุดแต่ว่าที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % จะให้ปริมาณเซลล์มากกว่า แต่เมื่อเปรียบเทียบกับที่มาเซโรไซม์ 2 % จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง

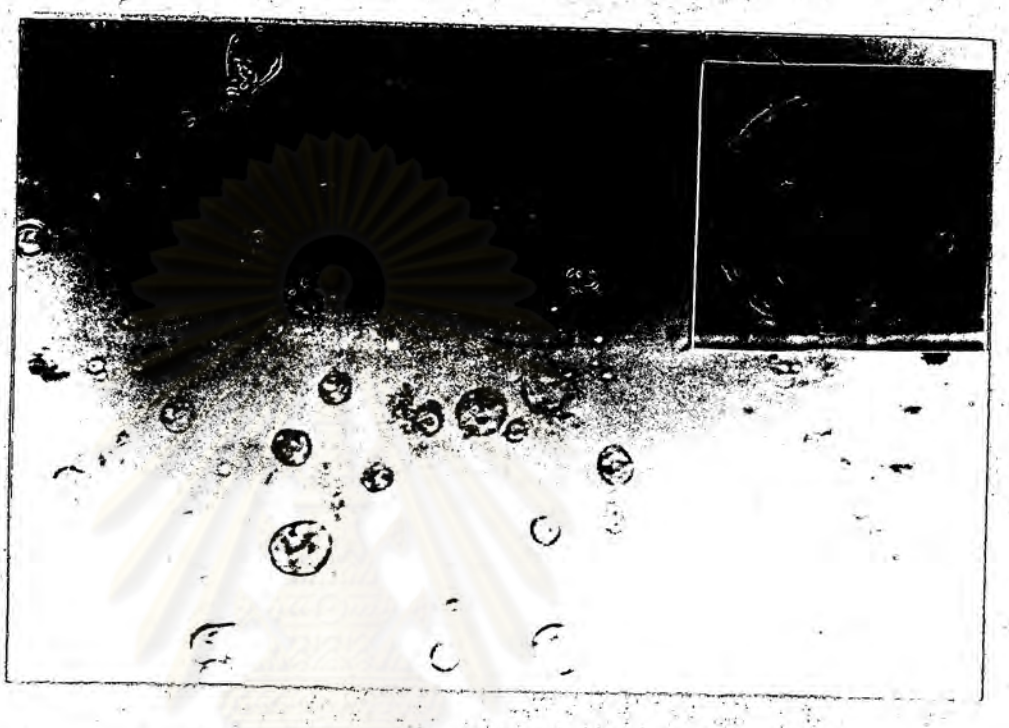
3.6.3 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

ผลการทดลองเมื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสม (ข้อ 2.10.6.3) จากการทดลองนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดในที่เวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 27) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดคือ 4:0.5 โดยจะให้โปรโตพลาสต์มากที่สุดมีปริมาณเฉลี่ยประมาณ 143,333 โปรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตประมาณ 67 % รองลงมา คือ 3:0.5, 2:0.5, 1:0.5 และ 0.5:0.5 ตามลำดับ โปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อศึกษาความมีชีวิตโดยย้อมด้วย fluorescein diacetate โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกัน (60-72%) (รูปที่ 28)

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น เมื่อถูกย่อยด้วยมาเซอเรไซม์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง

% มาเซอเรไซม์	ปริมาณเซลล์เฉลี่ย/มล.	
	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
0.1	265,000	250,000
0.5	325,000	310,000
1	350,000	350,000
2	340,000	315,000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

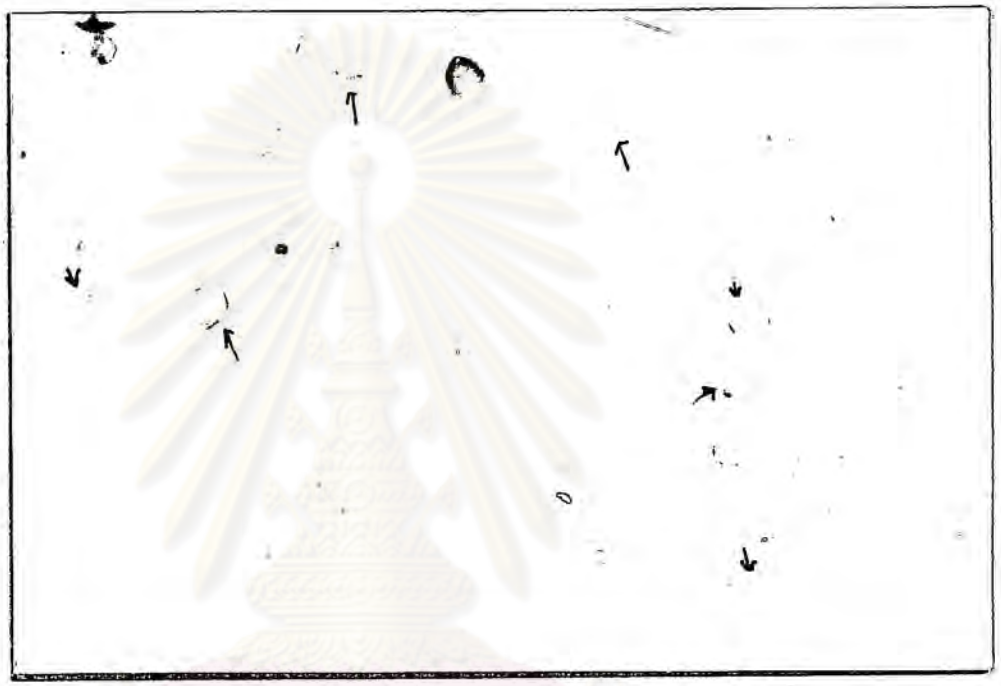


รูปที่ 25 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส

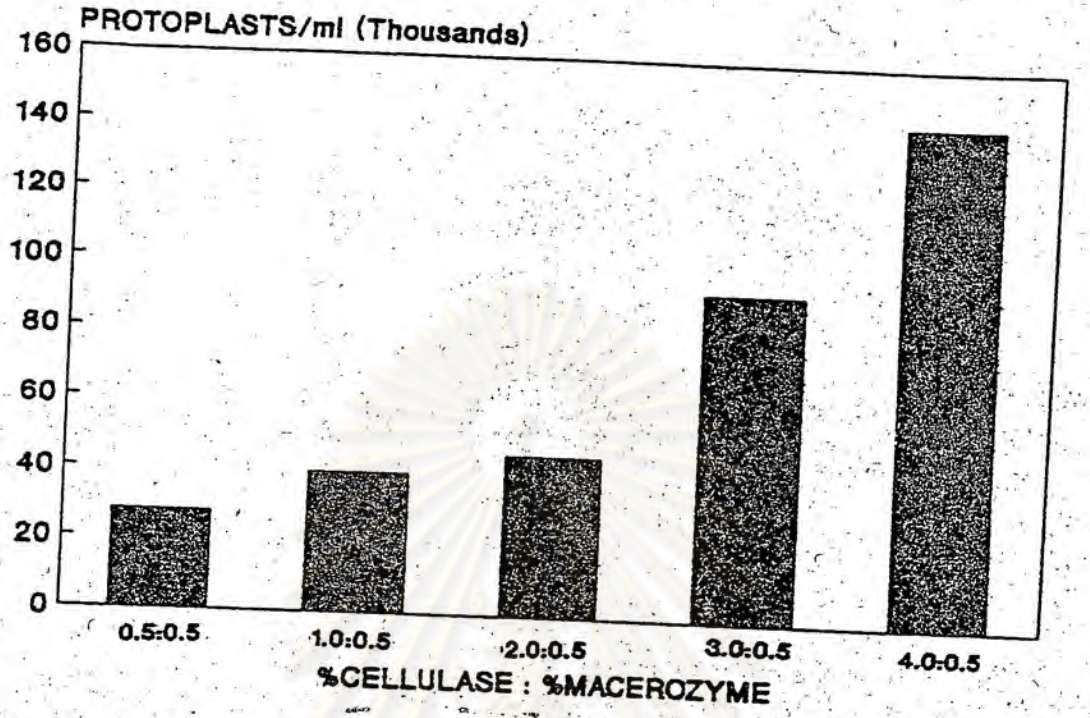
ภาพเล็ก กำลังขยาย 1200 เท่า

ภาพใหญ่ กำลังขยาย 2400 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

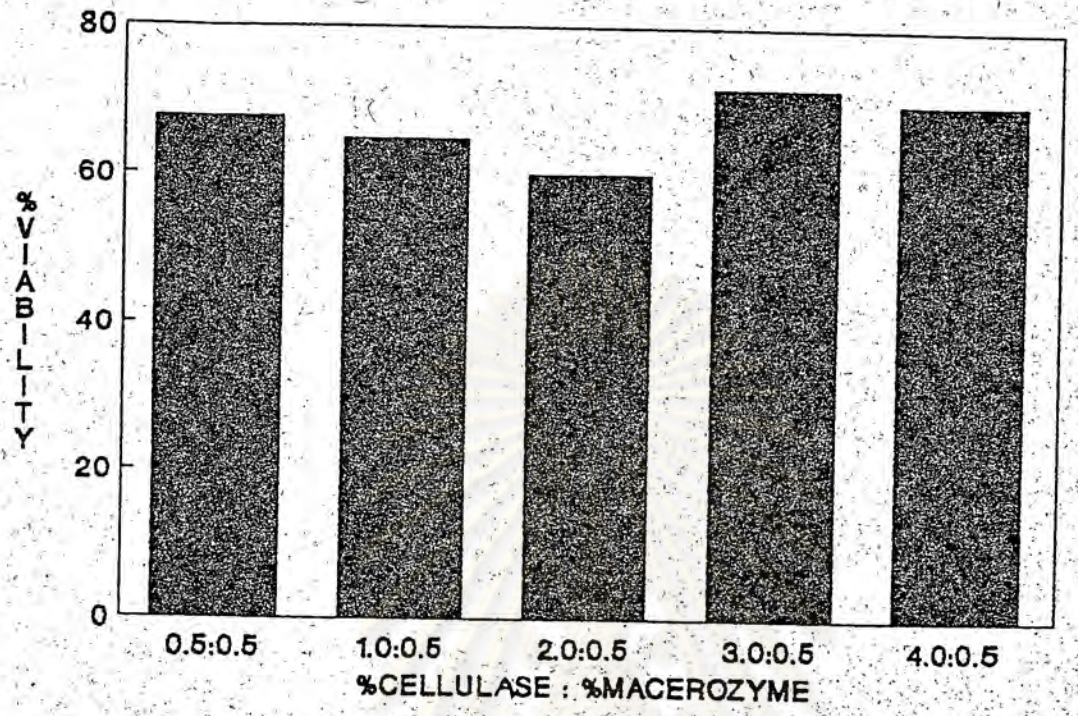


รูปที่ 26 แสดงการย้อมโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสถั่วเหลือง ด้วย fluorescent bitener เมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescense microscope โปรโตพลาสต์จะไม่เรืองแสง (ศรชี้) ส่วนเซลล์ปรกติที่มีผนังเซลล์จะเรืองแสง (กำลังขยาย 1200 เท่า)



รูปที่ 27 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอิรไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอโรไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.4 การศึกษาปริมาณแคลลัสที่เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

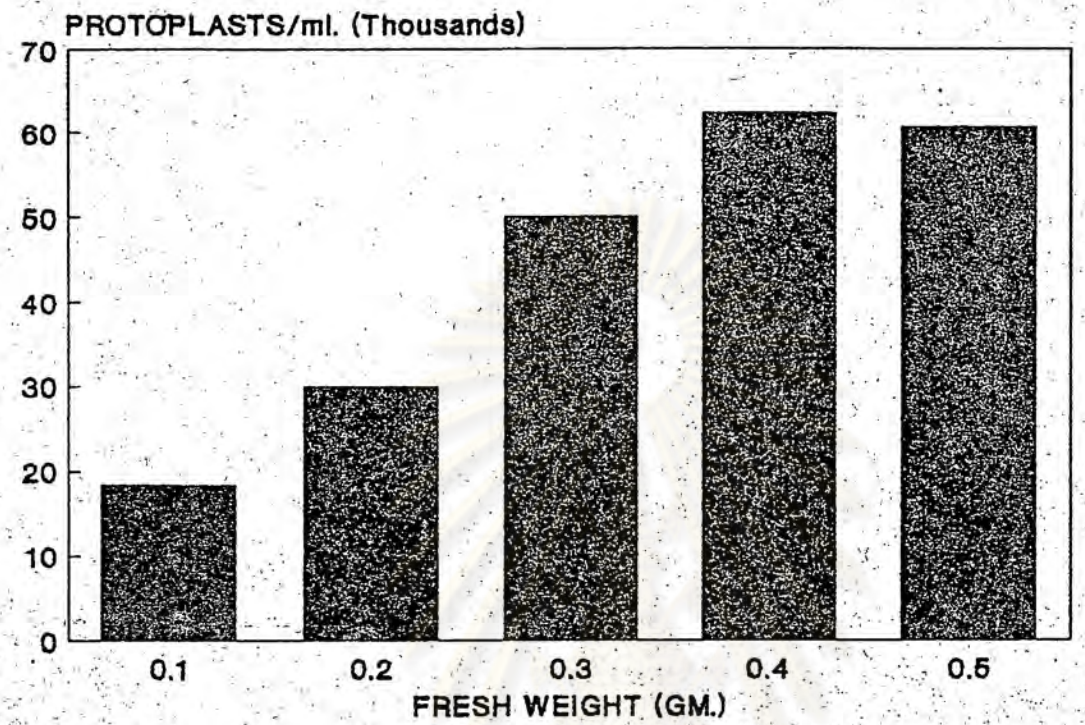
จากการทดลอง (รูปที่ 29)พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ 3 มล.อัตราส่วนเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์เท่ากับ 4:0.5แล้วแปรผันปริมาณแคลลัสที่เหมาะสมในการทดลองที่ได้โปรโตพลาสต์มากที่สุด คือใช้แคลลัส 0.4,0.5, และ 0.3 กรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้ค่าทางสถิติแล้วพบว่าผลผลิตโปรโตพลาสต์เมื่อใช้ปริมาณแคลลัสตั้งแต่ 0.3 กรัมขึ้นไปโปไม่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการทดลองต่อไปจะเลือกใช้ปริมาณแคลลัส 0.3 กรัมต่อเอนไซม์ 3 มล. เพราะว่าแคลลัสสามารถกระจายในเอนไซม์ได้ทั่วถึงในขณะที่มีการเขย่า

3.6.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลอง (รูปที่ 30)พบว่าเมื่อทำการอินคิวเบตสารละลายเอนไซม์กับแคลลัสในอัตราส่วนเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ปริมาณ 3 มล.กับแคลลัส 0.3 กรัม แล้วนับปริมาณโปรโตพลาสต์ที่เวลาต่างๆ พบว่าเมื่อแยกโปรโตพลาสต์ไปได้ถึงชั่วโมงที่ 2 จะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์มากที่สุด จากนั้นปริมาณโปรโตพลาสต์จะลดลงเรื่อย ๆ

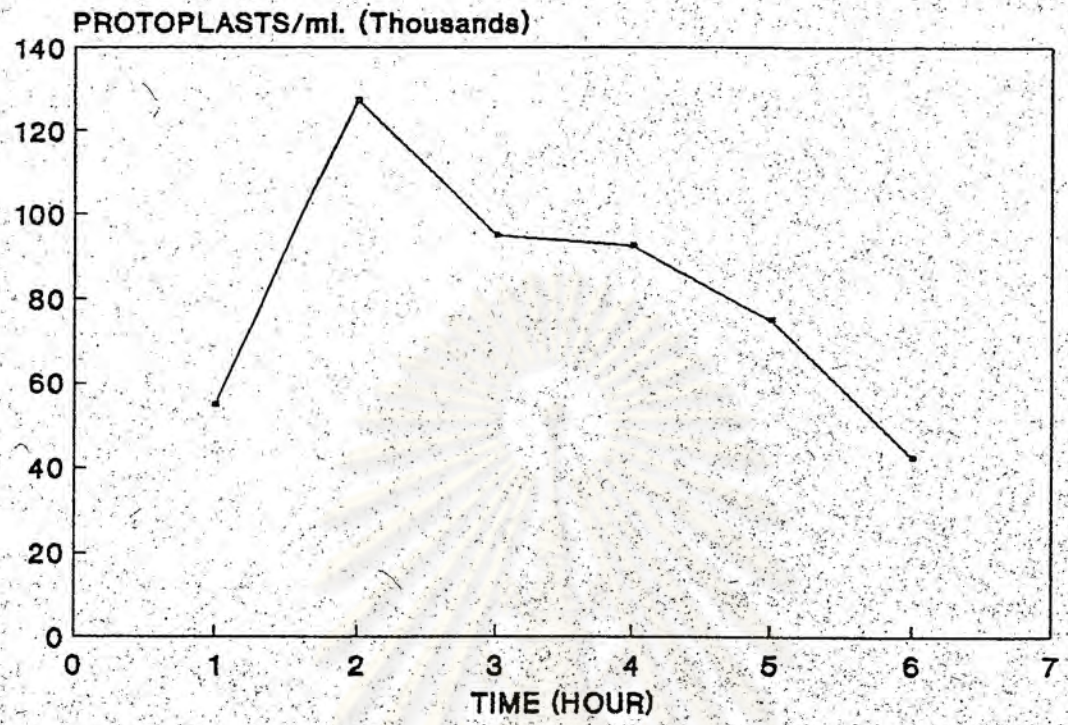
3.6.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลอง (รูปที่ 31)พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 และแปรผันความเข้มข้นของแมนนิทอล พบว่าที่ความเข้มข้นของแมนนิทอล 11 และ13 % จะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงสุดรองลงมาคือ 10% แต่จะเลือก 10%ในการทดลองเพราะว่าให้ผลใกล้เคียงกับที่ 11 และ 13% และจะเป็นการประหยัดการใช้แมนนิทอล



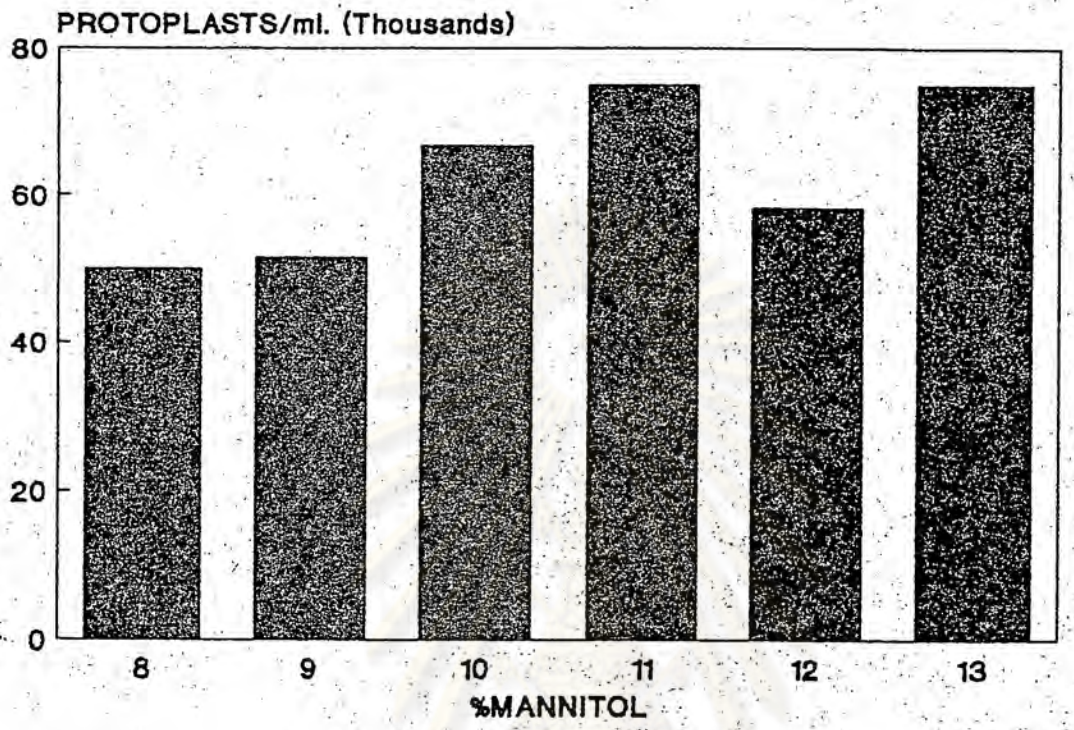
รูปที่ 29 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสที่แยกได้จากแคลลัส จากการแปรผันปริมาณแคลลัส โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักแคลลัส 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่เวลาต่างๆกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักแคลลัส 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่ความเข้มข้นแมนนิทอลต่างๆกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักแคลลัส 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

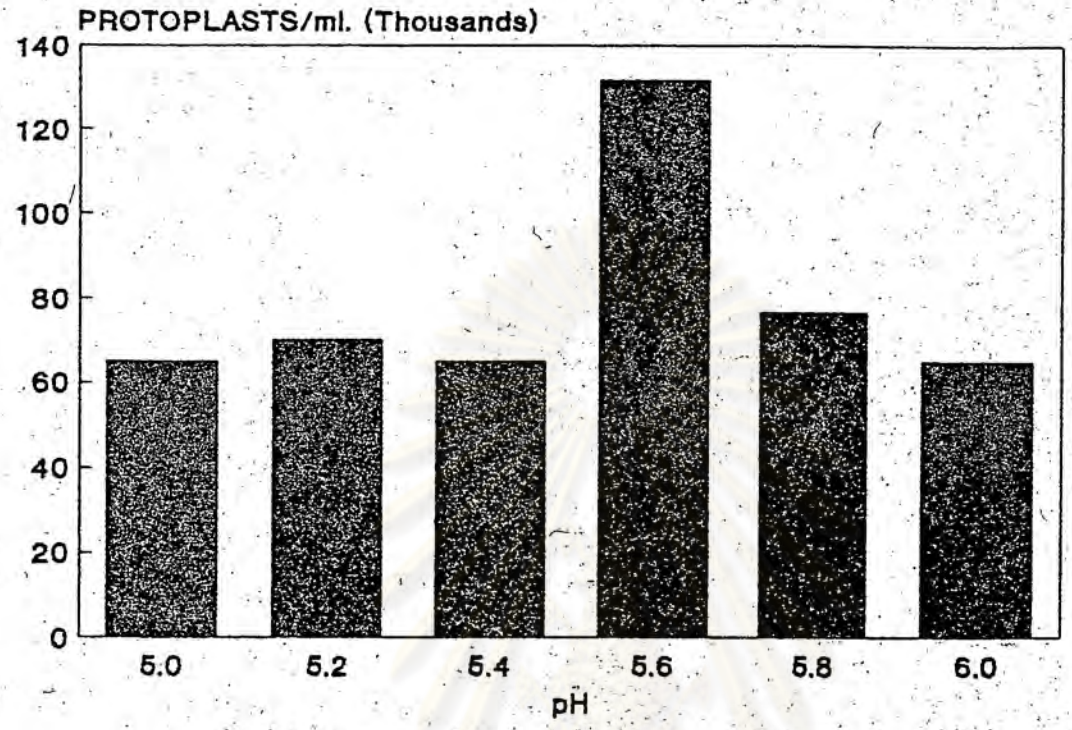
จากการทดลอง (รูปที่ 32)พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 และแปรผัน pH ตั้งแต่ 5.0–5.0พบว่า pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสคือ ประมาณ 5.6 ซึ่งจะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงสุด ส่วนที่ pH อื่น ๆ นั้นจะให้ประมาณ โปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกัน

3.6.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

เนื่องจากมีรายงานว่าการเพิ่มเกลือแร่บางชนิดคือ $CaCl_2$ และ $MgSO_4$ และบัฟเฟอร์คือ MES จะมีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ จากการทดลอง (รูปที่ 33)พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 และเพิ่ม $CaCl_2$,$MgSO_4$, MES อย่างละ 10 mM พบว่าเมื่อเพิ่ม $CaCl_2$ ลงไป 10 มิลลิโมลาร์ จะช่วยให้เกิดโปรโตพลาสต์มากขึ้นและมีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ควบคุม โดยไม่เติมอะไรเลย ส่วน $MgSO_4$ และ MES ไม่ได้ช่วยให้ผลผลิตดีขึ้นแต่มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกับกลุ่มที่ควบคุม (รูปที่ 34)

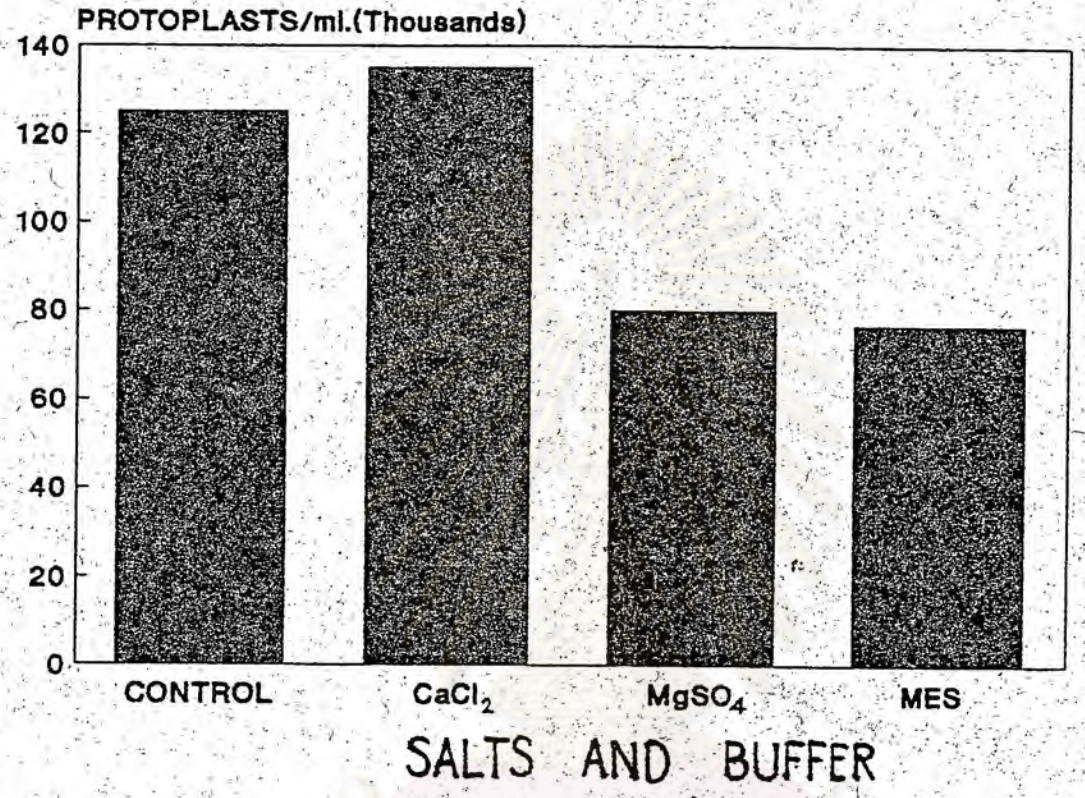
3.6.9 ผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage)ของเซลล์ต่อผลผลิตของโปรโตพลาสต์

จากการทดลองเมื่อใช้แคลลัสของถั่วเหลืองที่ช่วงการเจริญต่างๆมาแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 (รูปที่ 35)พบว่าเมื่อการเจริญของแคลลัสเข้าสู่ log phase ผลผลิตของโปรโตพลาสต์จะสูงขึ้นโดยช่วงอายุของเซลล์ที่จะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์ในปริมาณ

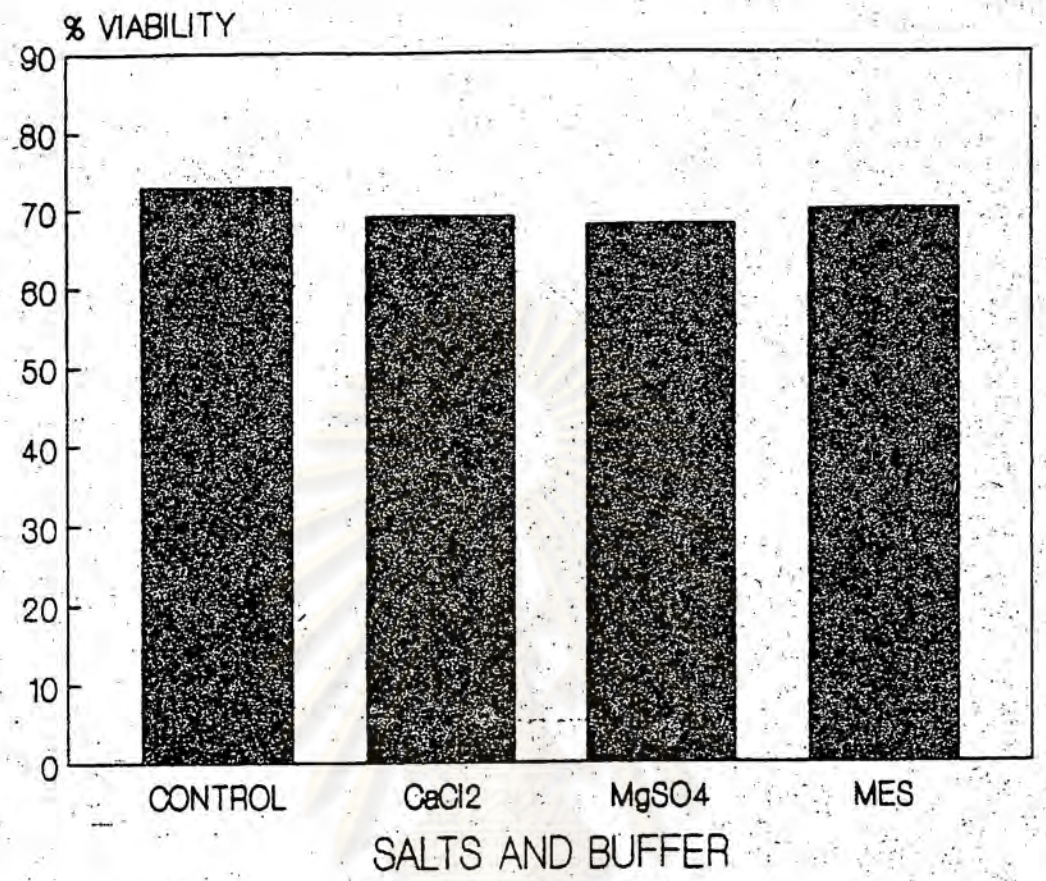


รูปที่ 32 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่ pH ต่างๆกันโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4 : 0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักแคลลัส 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสเมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักแคลลัส 0.3 กรัม



รูปที่ 34 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความมีชีวิต เมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4 : 0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักแคลลัส 0.3 กรัม

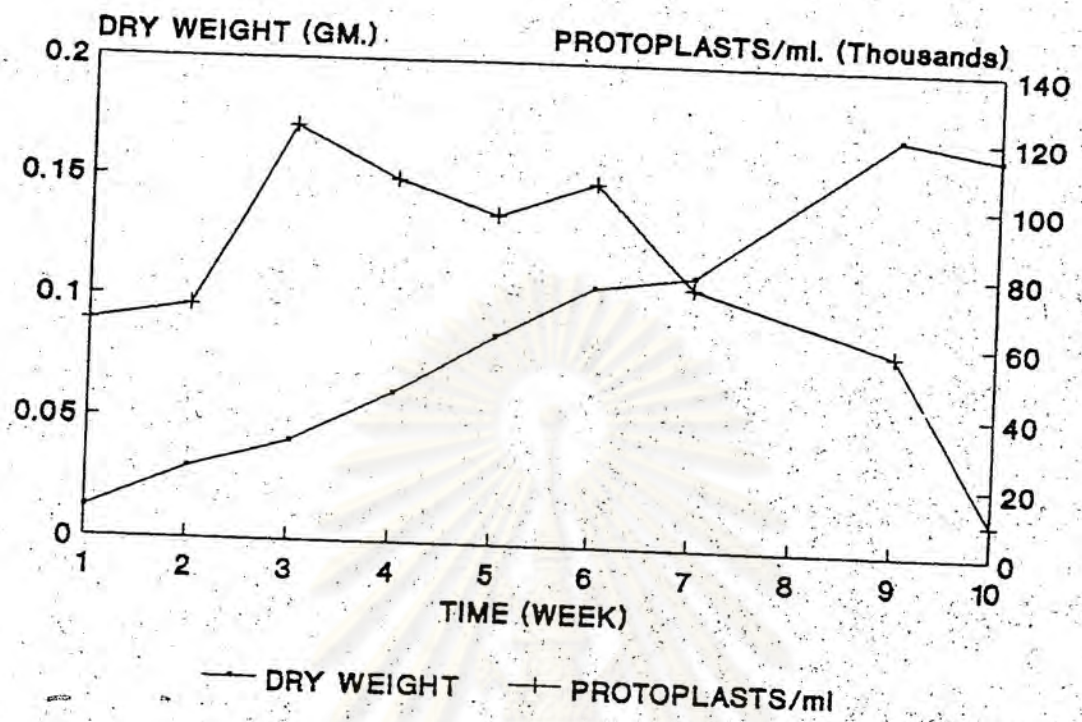
ที่สูง จะตกอยู่ในช่วงโดยช่วง การเจริญ log phase เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น (ในช่วงปลายของ log phase) ผลผลิตโปรโตพลาสต์จะลดลง และเมื่อเข้าสู่ stationary phase จะให้ประมาณโปรโตพลาสต์น้อยที่สุด เนื่องจากแคลลัสเริ่มจะเหลืองและใกล้ตาย

3.7 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

3.7.1 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอยเพื่อใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลอง (วิธีข้อ 2.10.7.1) พบว่าในอาหารสูตร MS B5 และ RV-5 สูตรที่ 1 ถึง 6 ซึ่งใช้ออกซิน คือ NAA และ IAA จะให้เซลล์แขวนลอยค่อนข้างมีการกระจายตัวน้อย ส่วนใหญ่แล้วเซลล์จะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนกลมสีเขียว (รูปที่ 36) เมื่อนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยจะนับด้วยกำลังขยาย 100 เท่า และนับเซลล์ใน 1 field ที่เห็นพบว่าส่วนใหญ่จะมีเซลล์ประมาณ 50-100 เซลล์ (รูปที่ 37) โดยจะมีเซลล์ที่เกาะกลุ่มตั้งแต่ 4-50 เซลล์เป็นส่วนใหญ่เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 7 คือ B5 ซึ่งใช้ 2,4-D พบว่าดูลักษณะภายนอกแล้วเซลล์จะออกสีเหลืองมีการกระจายตัวกันดี (รูปที่ 38) ไม่จับกันเป็นก้อนเหมือนในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย NAA และ IAA เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ทั่ว ๆ ไปจะมีการกระจายตัวดี มีเซลล์ที่จับกันเป็นกลุ่มตั้งแต่ 2-20 เท่านั้นเซลล์ เป็นส่วนใหญ่ โดยอาจเซลล์ที่อยู่เดี่ยว ๆ อยู่บ้าง และยังให้ผลผลิตเซลล์ที่มีปริมาณมากเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วย NAA และ IAA ที่อายุเท่า ๆ กันโดยมีเซลล์ต่อ 1 field ที่เห็นในกล้องประมาณ 200 เซลล์ขึ้นไป

3.7.2 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

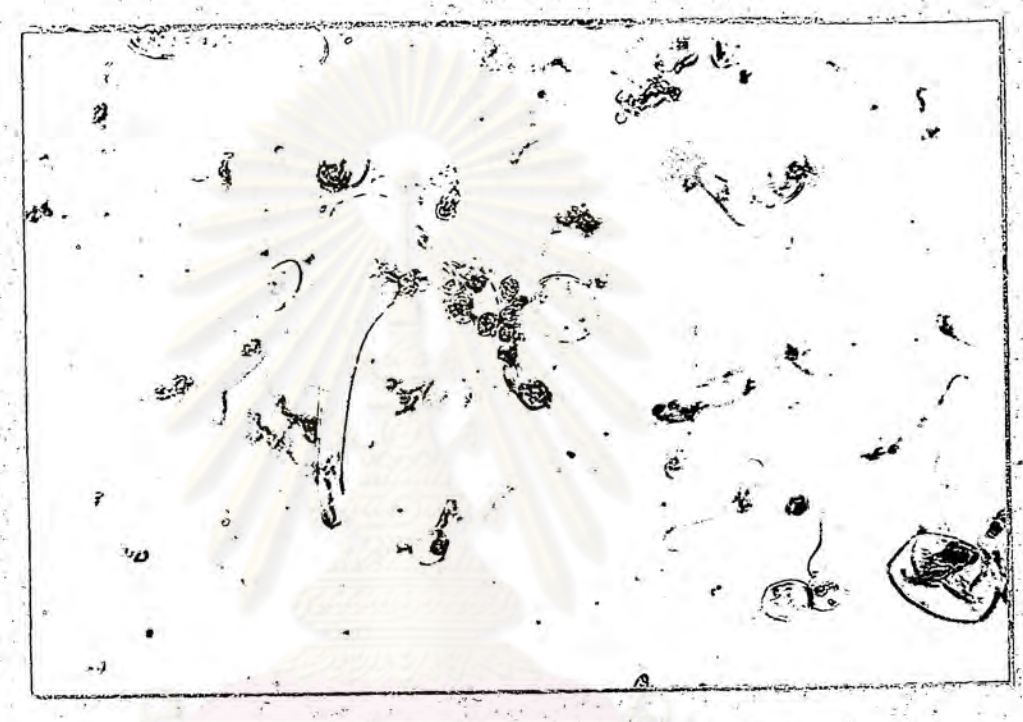


รูปที่ 35 ผลกระทบของระยะการเจริญของแคลลัสถั่วเหลืองต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์เมื่อทำการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสที่ช่วงการเจริญต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. (ซ้าย) และ NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. (ขวา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. สังเกตจะมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่น้อย

(กำลังขยาย 1200 เท่า)

รูปที่ 38 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. สังเกตจะมีความหนาแน่นของเซลล์มาก (กำลังขยาย 1200 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

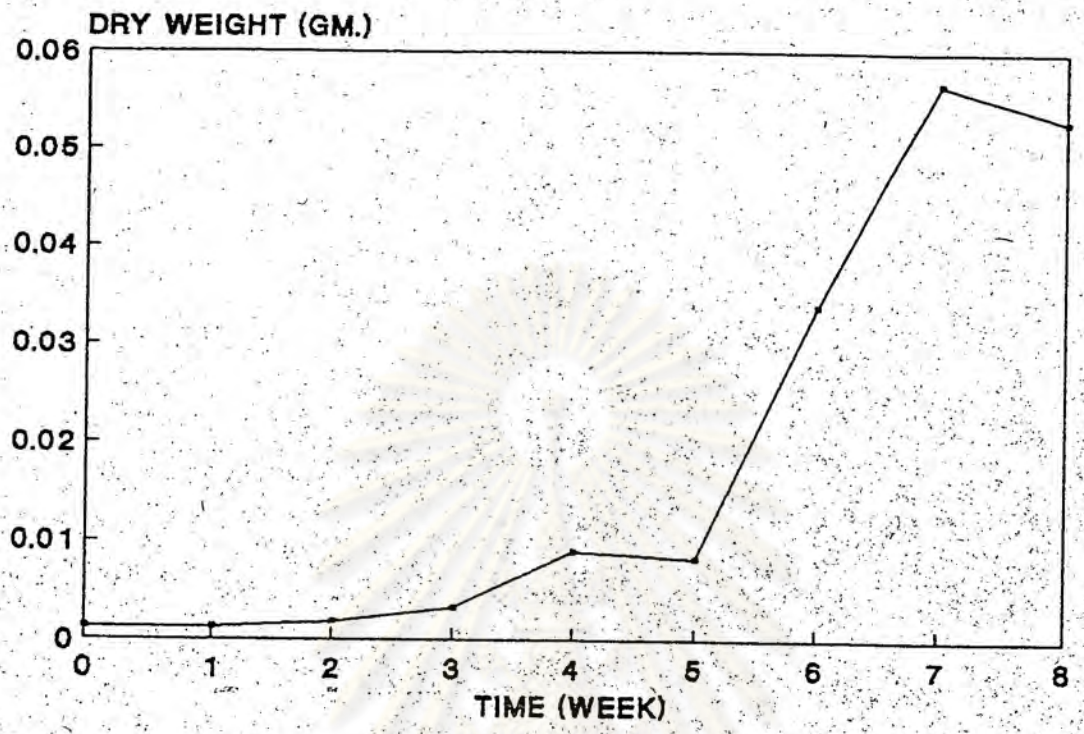
จากการทดลองติดตามการเจริญของเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. โดยใช้น้ำหนักแห้ง (รูปที่ 39)พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตที่ดี เซลล์จะเข้าสู่ log phase ที่อายุเพียงประมาณ 3 สัปดาห์ และจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยจะเข้าสู่ stationary phase เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 6 หลังจากนั้นอัตราการเจริญของเซลล์ถั่วเหลืองจะเริ่มลดปริมาณ สังเกตจากน้ำหนักจะลดลงเนื่องจากเซลล์ส่วนใหญ่เริ่มตาย

3.7.3 การศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นของถั่วเหลืองในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลองนี้เราจะทราบว่าถั่วเหลืองมีเซลล์เริ่มต้นประมาณเท่าไรและถูกย่อยไปเป็นโปรโตพลาสต์กี่เปอร์เซนต์จากการทดลองพบว่าเมื่อย่อยเซลล์แขวนลอยด้วยมาเซอเรไซม์ เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ พบว่ามีเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ 287,500 เซลล์ต่อ มล. จากการทดลอง 4 ซ้ำ

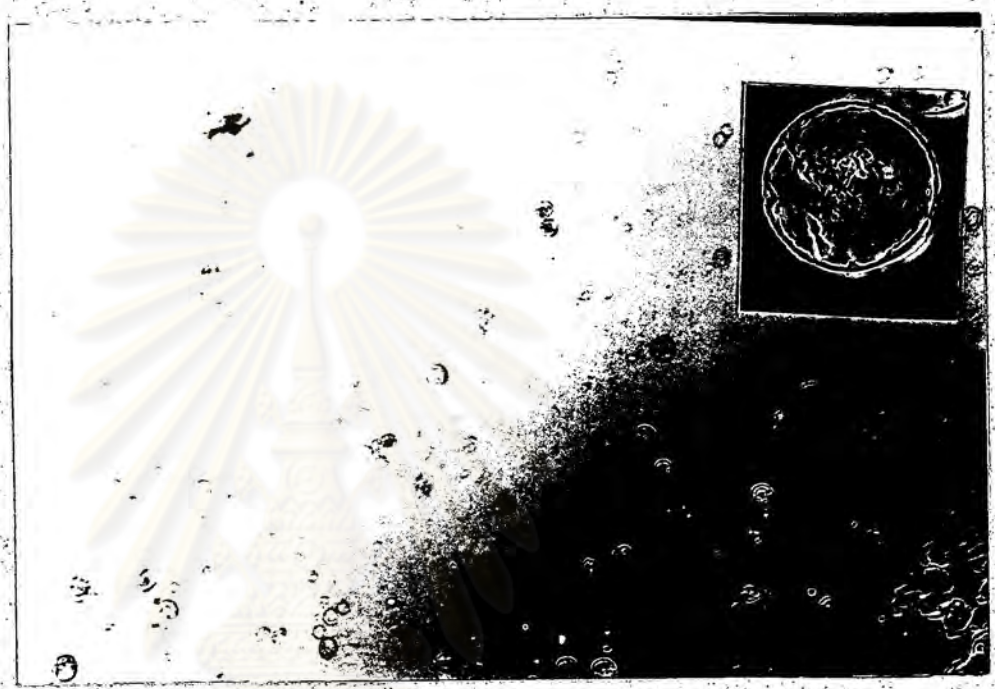
3.7.4 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลองศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสและมาเซอเรไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย (วิธีข้อ 2.10.7.4) ผลการทดลอง (รูปที่ 41,42)พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ % เซลลูเลสต่อ % มาเซอเรไซม์เท่ากับ 3: 0.5 โดยจะให้โปรโตพลาสต์เฉลี่ยมากที่สุด (116,250 โปรโตพลาสต์)โดยมีเปอร์เซนต์ความมีชีวิต 71% รองลงมาคือ 1: 0.5, 2: 0.5,4:0.5,และ 0.5:0.5 ตามลำดับโดยมีเปอร์เซนต์ความมีชีวิต 68-72%



รูปที่ 39 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

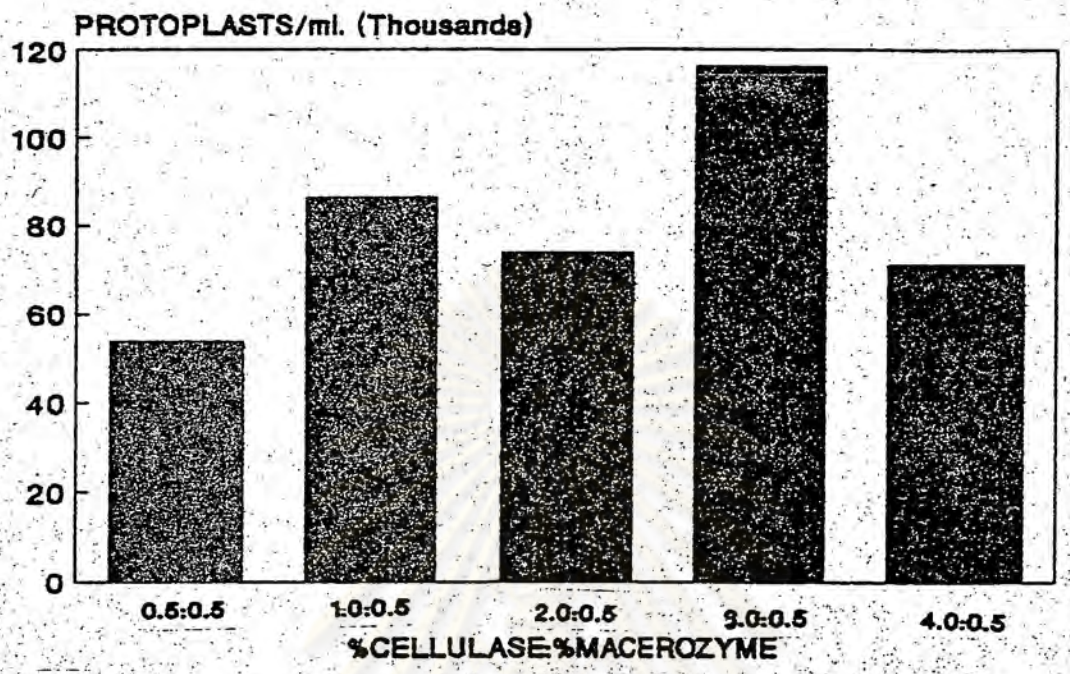


รูปที่ 40 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลือง

รูปเล็กกำลังขยาย 600 เท่า

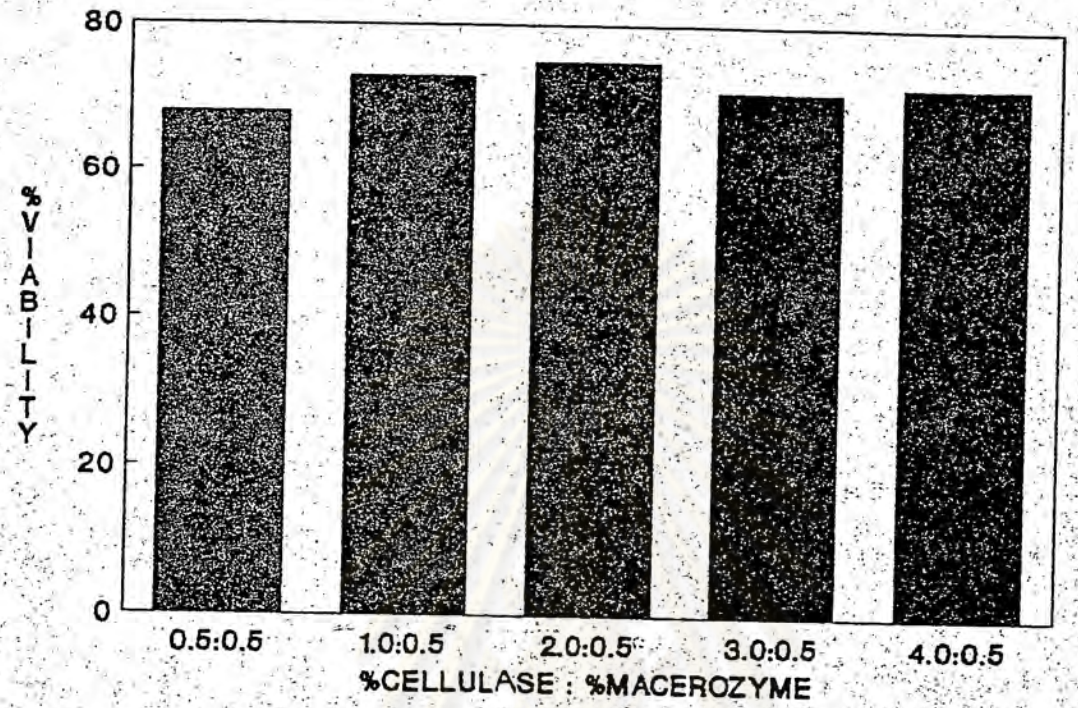
รูปใหญ่กำลังขยาย 2400 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 41 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอย จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอริไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 42 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอย จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอโรไซม์

3.7.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 และแปรผันเวลาพบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมงจะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงที่สุด จากนั้นปริมาณโปรโตพลาสต์จะลดต่ำลงเรื่อย ๆ โดยในชั่วโมงที่ 6 ให้ผลผลิตเพียง 20% เท่านั้น(รูปที่ 43)

3.7.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์

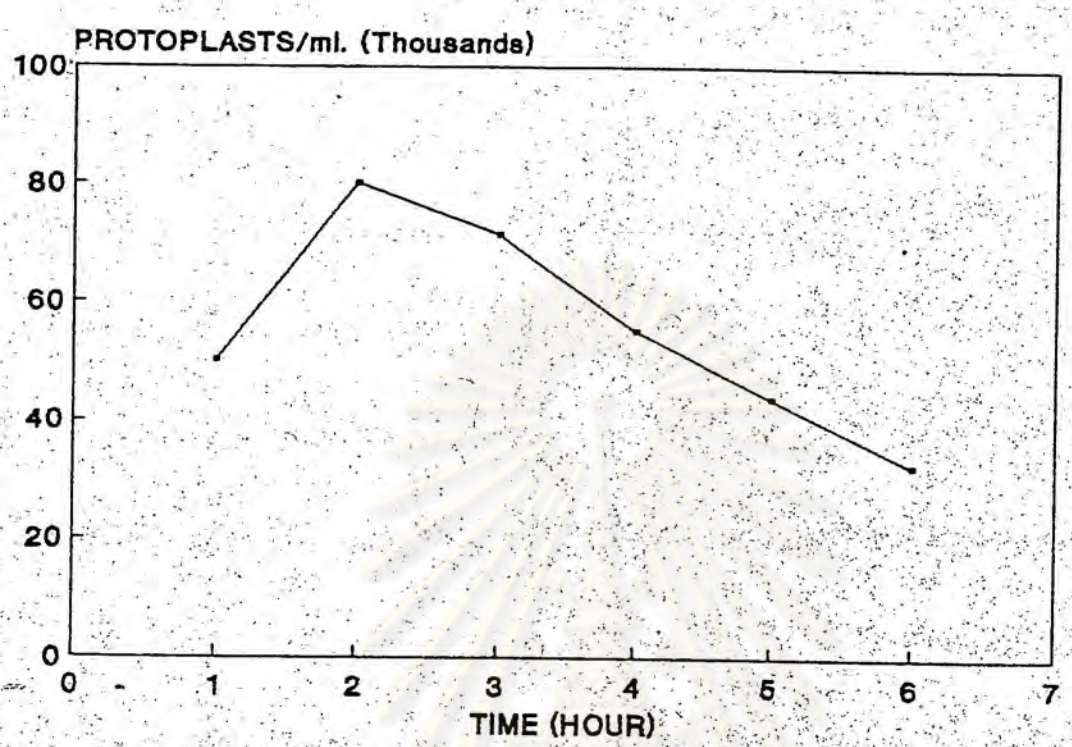
จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 และแปรผันแมนนิทอล(รูปที่ 44) พบว่าความเข้มข้นของแมมนิทอลที่เหมาะสมคือ 10% รองลงมาคือ 8 9 11 12 และ 13 ตามลำดับ เพราะฉะนั้นจึงเลือก ความเข้มข้น 10% ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

3.7.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอย

จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 และแปรผัน pH (รูปที่ 45) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยคือ ที่ 5.2 จะให้โปรโตพลาสต์สูงที่สุด รองลงมาคือ 5.6,6.0,5.8,5.0,และ 5.4 ตามลำดับ

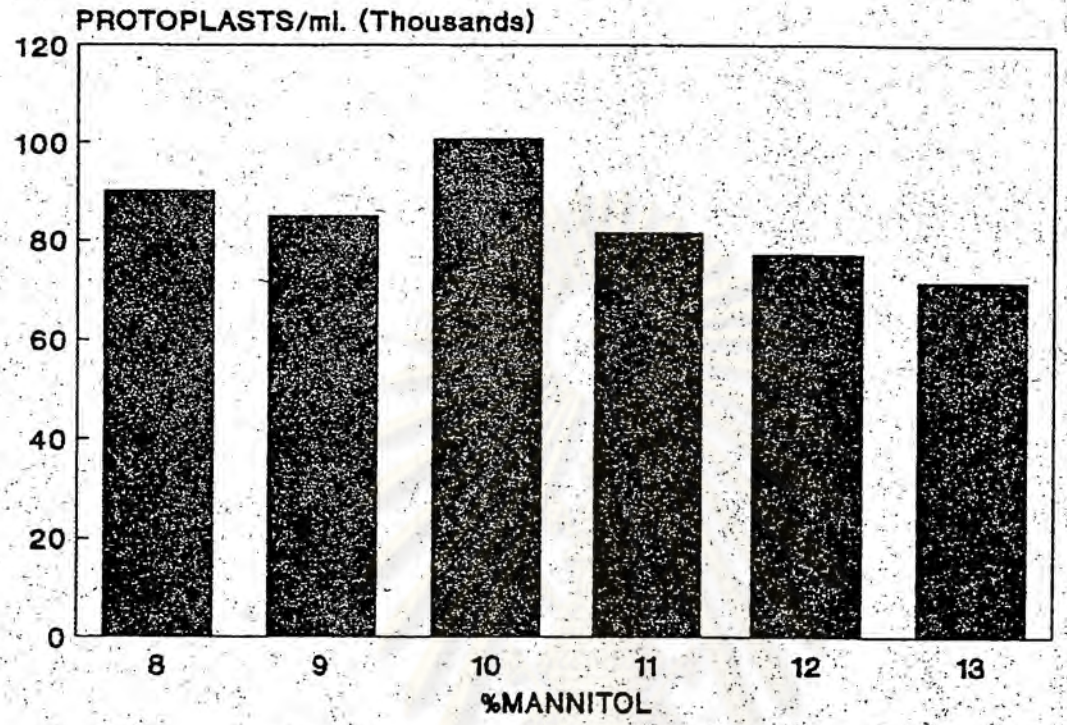
3.7.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ในการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอย

จากการทดลองจากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์



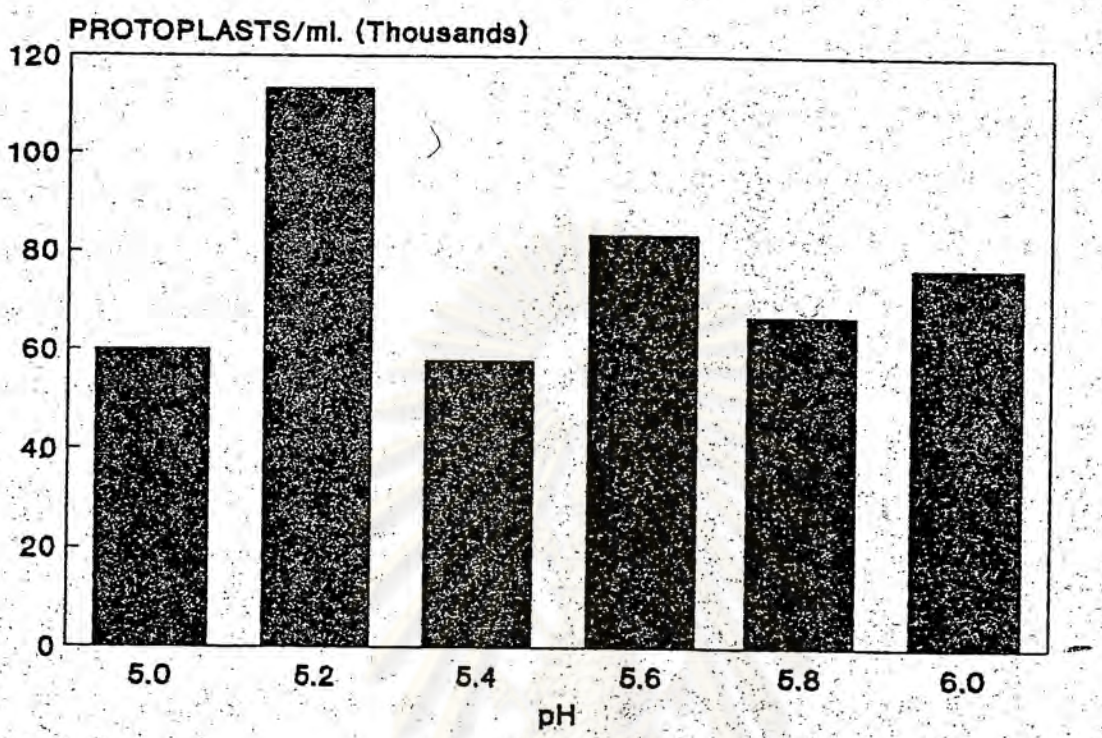
รูปที่ 43 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยที่เวลาต่างๆกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 44 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยที่ความเข้มข้นของแมนนิทอลต่างๆกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยที่ pH ต่างๆกัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แขวนลอยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 และเติมสาร $CaCl_2$, $MgSO_4$,และ MES อย่างละ 10 mM พบว่า สารที่เติมเข้าไปไม่มีส่วนในการช่วยเพิ่มปริมาณโปรโตพลาสต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) โดยจะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากัน และ $MgSO_4$ และ MES จะไม่ช่วยเพิ่มปริมาณโปรโตพลาสต์และสารที่เติมไม่ค่อยมีผลต่อเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเพราะว่า มีเปอร์เซนต์ใกล้เคียงกัน(รูปที่ 46,47)

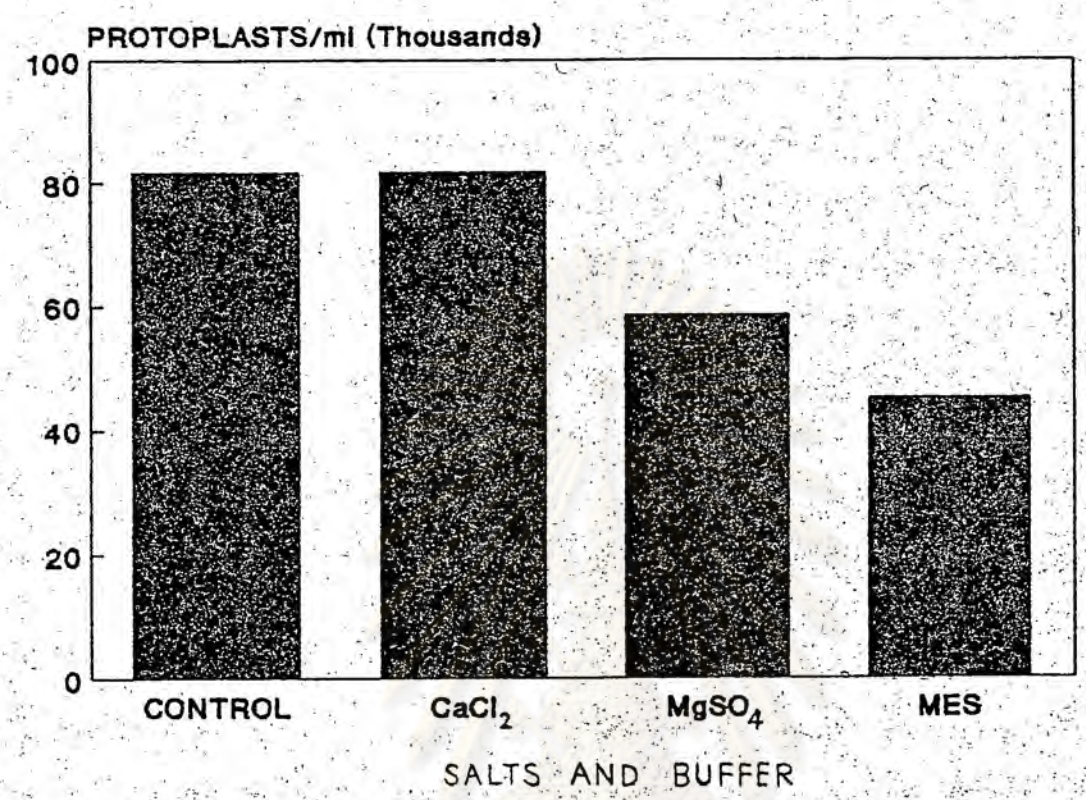
3.7.9 ผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์

จากการศึกษาอายุของเซลล์แขวนลอยที่มีผลกระทบต่อผลผลิตของโปรโตพลาสต์โดยใช้เซลล์แขวนลอยที่อายุต่างๆนำมาแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ผลการทดลองพบว่า(รูปที่48) เมื่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยเข้าส่ log phase การแยกโปรโตพลาสต์จะได้มากขึ้น โดยช่วงที่อยู่ใน mid log phase จะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงสุด และจะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase เนื่องจากว่าเซลล์แขวนลอยเริ่มที่จะมีการตาย

3.8 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

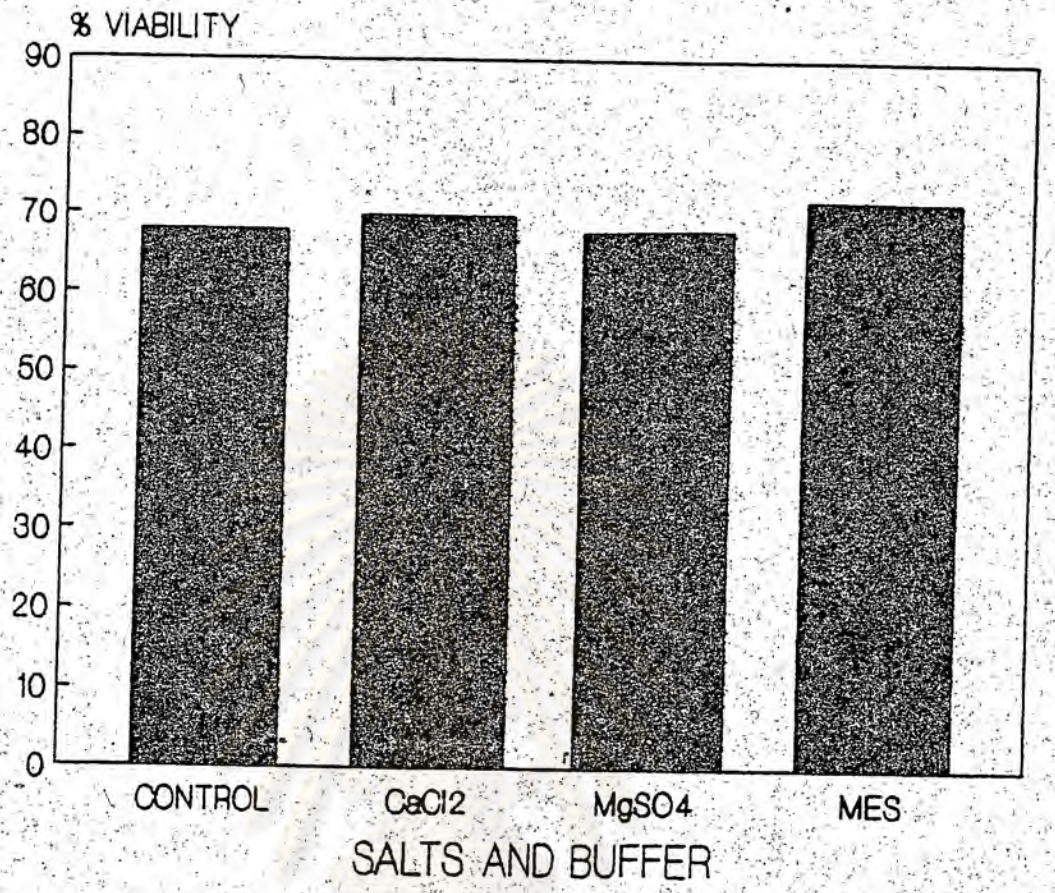
3.8.1 การทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์

จากการทำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยให้บริสุทธิ์ ผลการทดลอง(รูปที่ 49,50)แสดงให้เห็นว่าลักษณะทั่วๆไปของโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์แขวนลอย จะมีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยจะมีลักษณะกลมใสไม่มีสี แต่ถ้ารวมอยู่รวมกันมาก ๆ จะเห็นเป็นสีน้ำตาลอ่อน หรือเหลืองอ่อนมีขนาดตั้ง



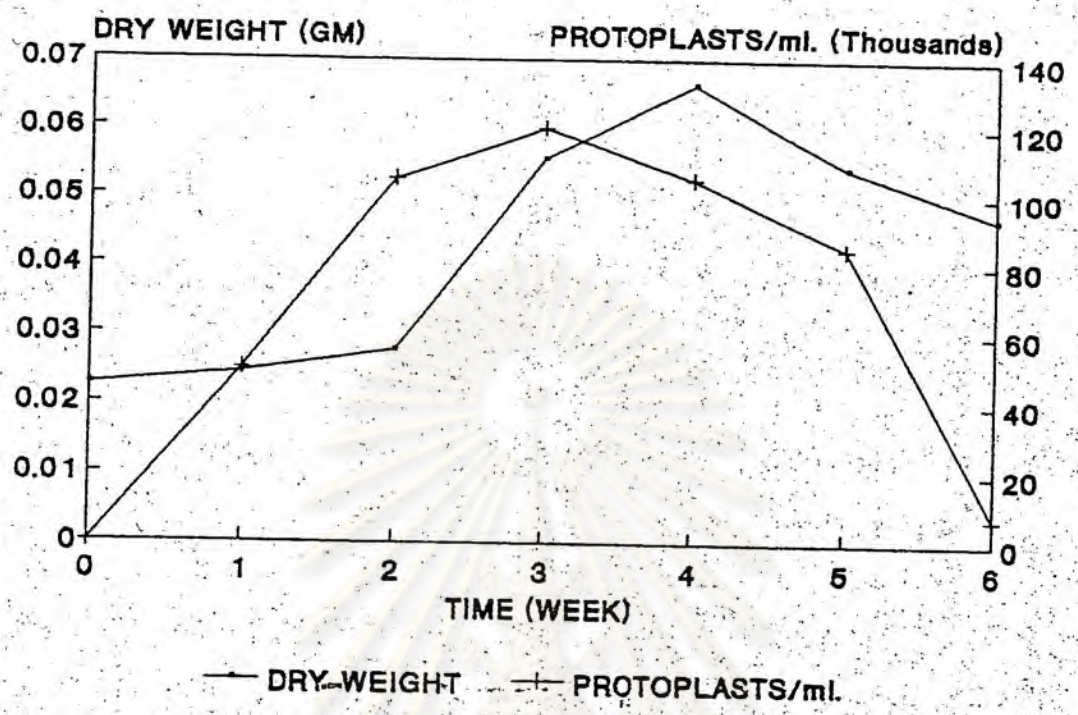
รูปที่ 46 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยเมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 47 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความมีชีวิต เมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3 : 0.5 ปริมาณ 3 มล. น้ำหนักเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 48 ผลกระทบของระยะการเจริญของเซลล์แขวนลอยถั่วเหลืองต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์เมื่อทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ช่วงการเจริญต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

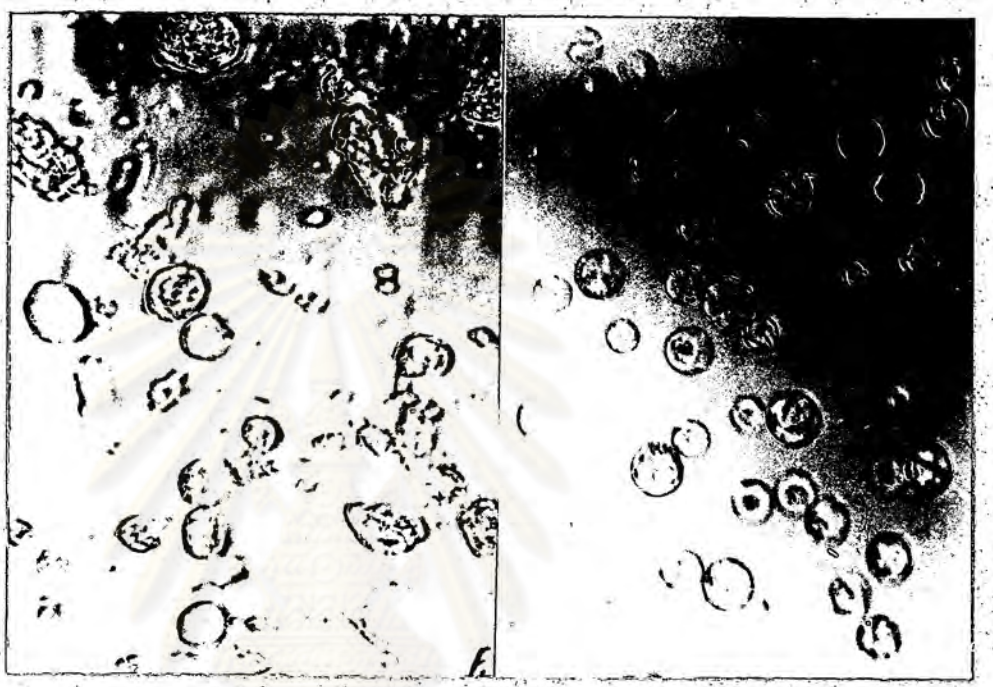
แต่ประมาณ 8 ถึง 20 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 16 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการหวลกลับมาสร้างผนังเซลล์และกลุ่มแคลลัสใหม่

3.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการทดลองศึกษาผลกระทบของแมนนิทอลซึ่งเป็นสารรักษาแรงดันออสโมซิสของเซลล์ที่มีต่อการเจริญและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ผลการทดลอง (ตารางที่ 19 และรูปที่ 51)พบว่า ในอาหารที่ K8P ที่ไม่เพิ่มแมนนิทอลลงไปเลยจะสามารถทำให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งตัวและสร้างหนังเซลล์ได้มากกว่าอาหารที่เพิ่มแมนนิทอลลงไป โดยจะมีการแบ่งตัวการสร้างผนังเซลล์ได้มากกว่าภายใน 3 วัน แต่ว่ามีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกัน(80-90%) โปรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์แล้วส่วนใหญ่พบว่า ไม่มีการแบ่งตัวต่อ เมื่อพยายามเติมอาหารใหม่พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งตัวเหล่านี้ต่อไปได้ แต่อย่างสูงที่สุดก็จะมีการแบ่งตัวจะแบ่งได้แค่เป็น 2 เซลล์ติดกัน และไม่มีการแบ่งตัวต่อไปสูงกว่านี้เลย

3.8.3 การศึกษาการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่แปรผัน zeatin

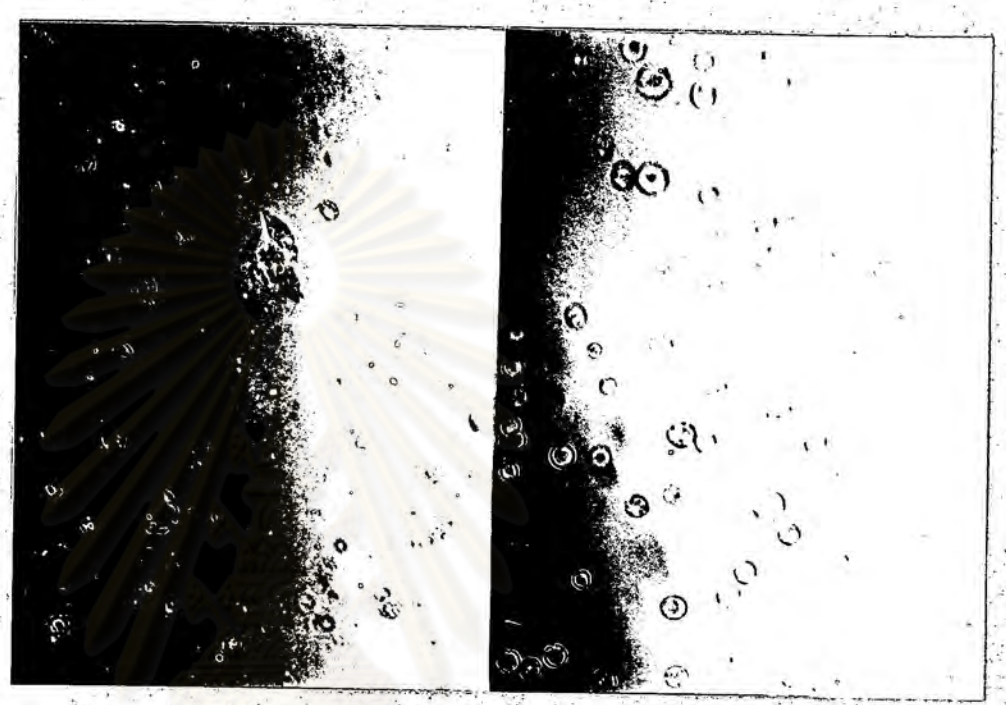
จากการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล. BA 0.5 มก./ล. NAA 1 มก./ล. และแปรผันความเข้มข้นของ zeatin เพื่อหาสภาวะในการแบ่งตัวและสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ zeatin ที่สามารถทำให้โปรโตพลาสต์มีการเจริญเติบโตคือ แบ่งเซลล์หรือสร้างผนังเซลล์มากที่สุดคือ 4



รูปที่ 49 การทำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสถั่วเหลืองให้บริสุทธิ์โดยใช้ซูโครส 21 %

A. ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (กำลังขยาย 1200 เท่า)

B. ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (กำลังขยาย 1200 เท่า)



รูปที่ 50 การทำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอยถั่วเหลืองให้บริสุทธิ์โดยใช้ซูโครส 21 %

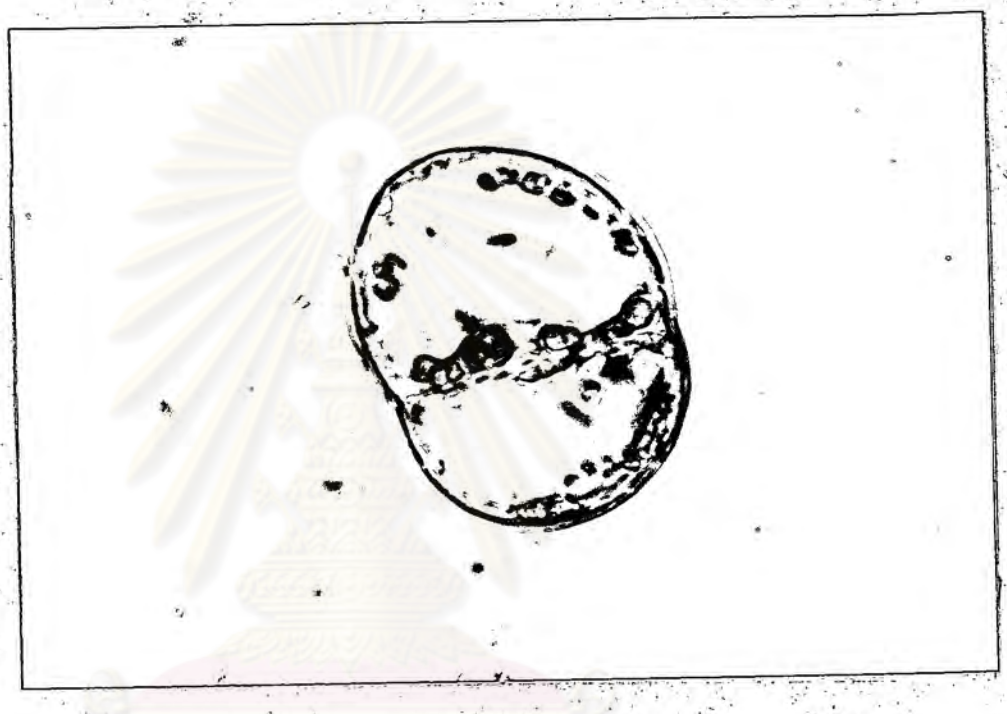
A. ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (กำลังขยาย 600 เท่า)

B. ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (กำลังขยาย 600 เท่า)

ตารางที่ 19 แสดงเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ สร้างผนังเซลล์และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่มีความเข้มข้นของแมนนิทอลต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของแมนทินอล (%)	% โปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์	% โปรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์	% ความมีชีวิต
0	6	8	90
2	0	5	86
4	0	5	80
6	0	0	88
8	0	0	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 51 การแบ่งเซลล์โปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหาร K8P ที่ไม่ได้เสริมด้วยฮอร์โมนและแมนนิทอล (กำลังขยาย 2400 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มก./ล.(เมื่อผ่านไป 3 วัน) หลังจากนั้นพบว่าไม่มีการแบ่งตัวแต่ว่ามีการสร้างผนังเซลล์บ้าง เมื่อศึกษาความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เหล่านี้พบว่ามีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตใกล้เคียงกัน(82-92%) โปรโตพลาสต์เหล่านี้ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มแม้ว่าจะเลี้ยงต่อไป และเติมอาหารใหม่ลงไป(ตารางที่ 20 และรูปที่ 32)

3.9 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

เนื่องจากการทดลองนี้ใช้แคลลัสแบบ friable และมีสีเหลืองซึ่งแตกต่างไปจากแคลลัสที่ใช้ในการ regenerate ให้กลับเป็นต้น ในการทดลองจึงได้พยายามที่จะชักนำให้แคลลัสเหล่านี้กลับเป็นต้นใหม่(วิธีข้อ2.11) จากการทดลอง(ตารางที่)พบว่ามีเพียงอาหารสูตรเดียวเท่านั้น คือ B5เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. ที่มีการเกิดออร์แกนเจเนซิส โดยจะมีแต่รากเกิดขึ้น ลักษณะการเกิดรากนั้น แต่ละแคลลัสจะมีรากตั้งแต่ 4-6 ราก สีขาวใส รากจะเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงไปได้ประมาณ 45 วันเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปรากที่เกิดขึ้น สามารถเจริญแตกออกเป็นรากย่อย ๆ ได้อีก

แคลลัสที่ย้ายจากอาหารที่เลี้ยงด้วย B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ2,4-D 2 มก./ล. เมื่อย้ายลงในอาหารที่แปรผันเปลี่ยนมาใช้ NAA แทน 2,4-D แคลลัสจะเปลี่ยนจากแคลลัสที่เป็นแบบ friable สีเหลืองอ่อนมาเป็นแบบ compact สีเขียวเข้ม ที่มีลักษณะเหมือนกับแคลลัสที่สามารถจะเกิด regeneration

3.10 การตรวจพบเซลล์ท่อลำเลียงในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ พบว่าแคลลัสแบบ friableที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย

ตารางที่ 20 แสดงเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์สร้างผนังเซลล์ความมีชีวิต ของโปรโตพลาสต์ใน อาหาร K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล. BA 0.5 มก./ล. NAA 1 มก./ล. ที่แปรผันความเข้มข้นของ Zeatin ต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของ zeatin (มก/ล.)	% โปรโตพลาสต์ ที่มีการแบ่งเซลล์	% โปรโตพลาสต์ ที่มีการสร้างผนังเซลล์	% ความมีชีวิต
0.5	0	0	90
1	0	5	88
2	0	0	92
4	6	6	82
8	0	0	86

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 52 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองในอาหาร K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล. BA มก./ล. NAA 1 มก./ล. และ zeatin 4 มก./ล. (กำลังขยาย 1200 เท่า)

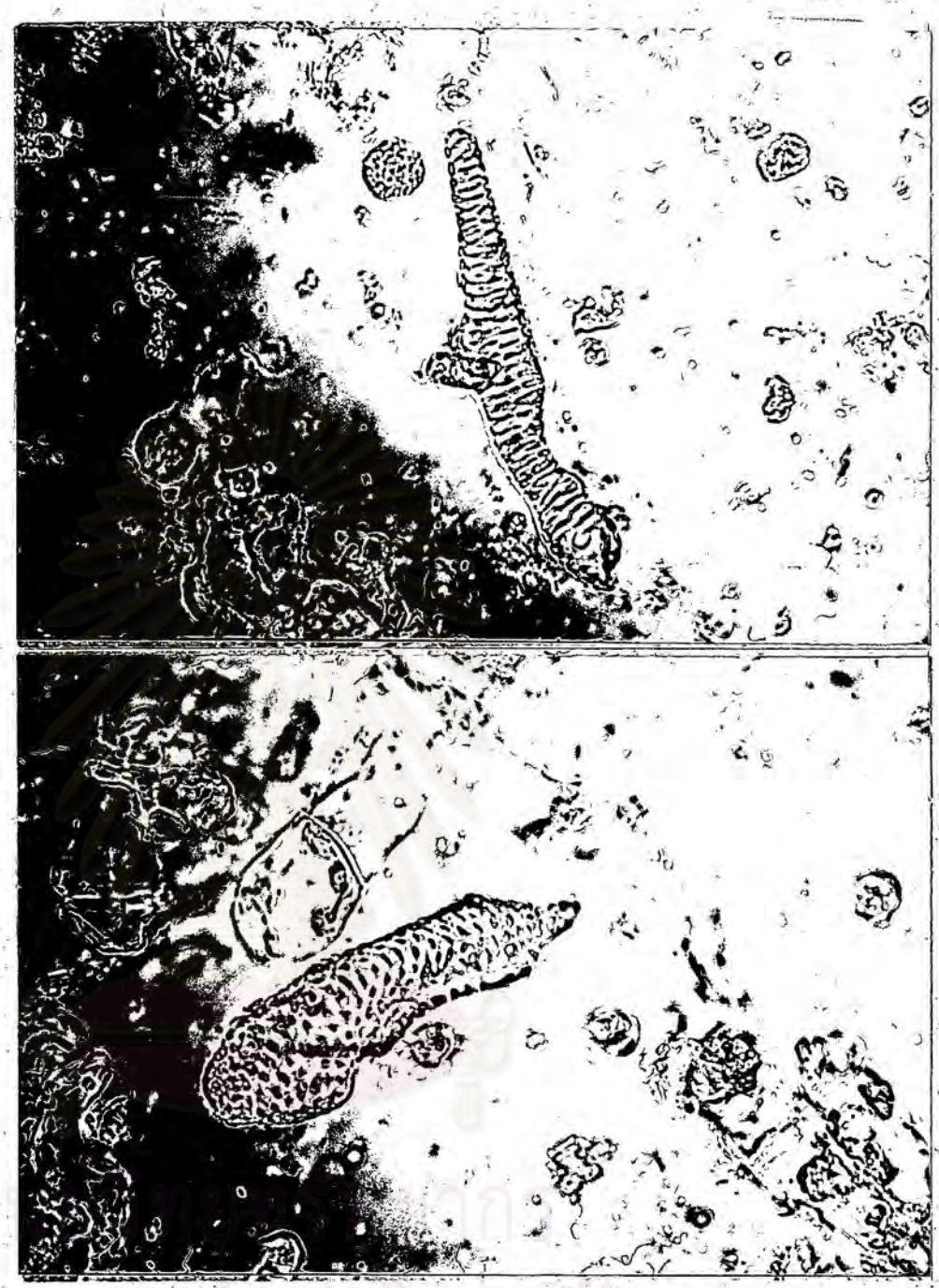
2,4-D 2 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. เหล่านี้ นอกจากจะได้โปรโตพลาสต์แล้ว ยังจะตรวจพบเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลักษณะโดยทั่ว ๆ ไป จะเหมือนกับลักษณะของเซลล์ที่เป็นท่อลำเลียงในพืชชั้นสูงทั่ว ๆ ไป ที่เรียกว่า vessel member(รูปที่ 53)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 แสดงปริมาณแคลลัสที่เกิดออร์แกโนเจเนซิส และ % regeneration ที่ชักนำให้เกิด regeneration ในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน(มก./ล.)		จำนวนแคลลัสที่เกิดออร์แกโนเจเนซิส	% regeneration
NAA	BA		
0.15	1	4	10
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
0.20	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 53 ลักษณะของเซลล์ท่อลำเลียง (vessel member) ที่เกิดขึ้นในแคลลัสของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ตรวจพบโดยแยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อมาเซอร์ไรซ์ 4:0.5 % (กำลังขยาย 1200 เท่า)