บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ของการชักนำให้เกิดต้นสมบูรณ์จากแคลลัสฝ้ายที่ชักนำมาจากเนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล ตลอดจนถึงการเตรียมเซลล์ไร้ผนังและการชักนำ ให้มีการสังเคราะห์ของผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์

เนื่องจากชิ้นส่วนของพืชประกอบไปด้วยเซลล์หลาย ๆ ชนิด ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ (meristem), เนื้อเยื่อผิว (epidermis), พาเรนไคมา (parenchyma), แคมเบียม (cambium) เป็นต้น การเลือกเนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์เป็นแบบเนื้อเยื่อเจริญ (merismatic cells) มาเพาะเลี้ยง จะมีโอกาสที่จะพัฒนาต่อไปได้ดี เนื่องจากมีการแบ่งเซลล์และเจริญได้ทันที (Murashige, 1974) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้ายที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์เพาะเลี้ยง ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้นจากการรายงานที่ผ่านมา ส่วนใหญ่เลือกส่วนของพืชที่ยังอยู่ในระยะการเจริญ เช่น ใบเลี้ยง ใบแท้ ไฮโปคอทิล petioles (Davidonis และ Hamilton, 1983; Gawel และคณะ, 1986) เพราะง่ายต่อการเพาะเลี้ยง และมีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการหวนคืนกลับเป็นต้นสมบูรณ์ได้สูง ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้เนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลมาทำการศึกษา

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยง และส่วนของไฮโปคอทิล

ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) และแหล่งคาร์บอน (carbon source)

ใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ของ Murashige and Skoog เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5ของ Gamborg ซึ่งมีสารจำพวก macroelements และ microelements ที่จำเป็นต่อพืช จากการศึกษา พบว่า อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนี้ สามารถชักนำการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อฝ้ายได้ทั้ง 2 ส่วน โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA, 2,4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน (kinetin, zeatin)

เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ ใช้ NAA ในระดับ 0, 1, 2, 3, 4, 5 มก./ล. ร่วมกับ kinetin และ zeatin ในระดับเดียวกัน คือ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 มก./ล. 2,4-D ในระดับ 0, 0.05, 0.1, 0.15 มก./ล. ใช้ร่วมกับ kinetin และ zeatin ความเข้มข้นในระดับเดียวกัน คือ 0, 0.1, 0.5 มก./ล.ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลของฝ้าย ทำการเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25$\pm$2 °ซ.ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า จะให้การเจริญของแคลลัสสูงสุด และได้ลักษณะแคลลัสที่มีลักษณะแตกต่างกัน

ในการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงในพันธุ์ศรีสำโรง 2 พบว่า การทำงานร่วมกันของ NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. จะชักนำการสร้างแคลลัสดีที่สุด 80% และแคลลัสที่ได้มีสีเขียวออกเหลือง เซลล์เกาะกันค่อนข้างแน่นเป็นแบบ semicompact callus

ส่วนแคลลัสจากชิ้นส่วนไฮโปคอทิลในพันธุ์ศรีสำโรง 2 เจริญได้ดีเมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. คิดเป็น 85 % แคลลัสที่มีสีเขียวอ่อน เซลล์เกาะกลุ่มค่อนข้างหลวม (semifriable callus)

สำหรับการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงในฝ้ายน้อย เมื่อใช้ NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. สามารถชักนำการสร้างแคลลัสที่ดีที่สุด (95%) แคลลัสที่มีสีเขียวสด เช่นเดียวกับส่วนใบเลี้ยง แต่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวมกว่า

สำหรับเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของพันธุ์ศรีสำโรง 2 นั้น พบว่า มีอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงค่อนข้างมาก เนื่องจากมีการปล่อยสารฟีนอลิค ทำให้ขอบชิ้นส่วนพืชมีสีน้ำตาลดำ รวมทั้งปล่อยออกมาในอาหารเพาะเลี้ยง ในส่วนไฮโปคอทิลพบบ้างเล็กน้อย ส่วนในฝ้ายน้อย ไม่พบการปล่อยสารฟีนอลิคนี้ Butenko (1985) รายงานว่า สารฟีนอลิคจะมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโต เนื่องจากมีผลไปกระตุ้นให้เซลล์พืชสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติไปขัดขวางการ oxidative phosphorylation

การปรับระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ zeatin หรือ 2,4-D ต่อ kinetin และ zeatin สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดี แต่ไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เนื่องจากให้แคลลัสที่ไม่สามารถรักษาสภาพของแคลลัสแบบต่อเนื่องได้ (การ subculture ไปเรื่อย ๆ) รวมทั้งสีของแคลลัส ลักษณะของแคลลัส สำหรับใน 2,4-D มีรายงานว่า พืชหลายชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส เช่น Cheema (1989) ใช้ 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสในพืช Populs ciliata และกระตุ้นให้เกิด embryoid ได้ดี ส่วนในฝ้ายเอง พบว่า เมื่อใช้ 2,4-D ได้แคลลัสมีลักษณะหลวม สีของแคลลัสค่อนข้างเหลือง และมักตายไปในที่สุด ผลของการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Smith และคณะ (1977) ที่ว่าการเสริมอาหารเพาะเลี้ยงด้วย zeatin มักทำให้แคลลัสมีสีแดง

ผลการทดลองให้ผลว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงในพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย บนอาหาร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5

ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ชักนำการเกิดแคลลัสได้ดี ส่วนการชักนำให้เกิดแคลลัสจากไฮโปคอทิลในฝ้ายทั้ง 2 ชนิด พบว่า อาหารที่เสริมด้วย NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และยังพบต่อไปอีกว่า แคลลัสส่วนไฮโปคอทิลเจริญได้ดีกว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในทั้ง 2 พันธุ์ เนื่องจากไม่มีอุปสรรคจากสารฟีนอลิค เมื่อเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสในพันธุ์ฝ้ายทั้งสอง พบว่า ฝ้ายน้อยจะให้การเจริญของแคลลัสสูงกว่าพันธุ์-ศรีสำโรง 2

ส่วนผลของแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่า ในอาหารสูตรมาตรฐานที่-ใช้ในการทดลอง MS เมื่อเสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เติมด้วยสารควบคุม-การเจริญที่เหมาะสมในแต่ละชิ้นส่วนของพืช แคลลัสที่เสริมในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ทั้งในแคลลัสที่เจริญมาจากใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล ให้ลักษณะแคลลัสมีสีเขียว มีการเกาะกลุ่มของเซลล์ค่อนข้างแน่นในทั้ง 2 พันธุ์ แต่ถ้าใช้น้ำตาลซูโครส แคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวมมากกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ส่วนแคลลัสจะเป็นสีเขียวเหลืองและเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองน้ำตาลเร็วกว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสในระยะเวลาเท่ากัน และไม่สามารถรักษาสภาพของแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงไว้ได้แบบต่อเนื่อง น่าจะมีผลมาจากการที่น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้การดูดซึมภายในเซลล์ได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ แต่ขึ้นกับความสามารถและชนิดของพืชนั้น ๆ ด้วย Smith และคณะ (1977) รายงานไว้ว่า น้ำตาลกลูโคสเหมาะต่อการพัฒนา-ของแคลลัสฝ้าย (Gossypium arboreum L.) เช่นกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การจำแนกชนิดของแคลลัส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเนื้อเยื่อพืชทั้ง 2 ส่วนบน อาหารสูตร MS เสริมด้วยส่วนวิตามินตามส่วน B5 แคลลัสที่เจริญในอาหารที่มี NAA กับ kinetin ที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยง และไฮโปคอทิลใน ทั้ง 2 พันธุ์ อายุ 4 สัปดาห์ เท่านั้น ที่เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์สามัญ พบว่า เซลล์มีรูปกลมเป็นส่วนใหญ่ องค์ประกอบในไซโตพลาสซึมเข้มข้น ซึ่งต่างไปจากแคลลัสที่เจริญบนอาหารที่เสริมด้วย NAA กับ zeatin หรือ 2,4-D กับ kinetin และ zeatin เซลล์จะมีรูปร่างยาวมากกว่าเซลล์กลม ไซโตพลาสซึมไม่เข้มข้น การมีองค์ประกอบภายในเซลล์หนาแน่น น่าจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ต่อไปได้ดี

ดังนั้น ในการวิจัยนี้ จะใช้สูตรอาหาร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. (สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของใบเลี้ยง) และ NAA 4 มก./ล.และ kinetin 1 มก./ล. (สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของไฮโปคอทิล) แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารสูตรมาตรฐาน เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป

4.3 การศึกษารูปแบบและลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส

จากการติดตามการเจริญของแคลลัสจากเนื้อเยื่อทั้ง 2 บนอาหารแข็งมาตรฐานที่เหมาะสมในแต่ละส่วนของพืช โดยการชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง พบว่า รูปแบบการเจริญคล้ายคลึงกัน และแคลลัสส่วนไฮโปคอทิลเจริญได้สูงสุดเกือบ 3 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น ในขณะที่แคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยงมีการเจริญได้ประมาณ 2 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น และน้ำหนักแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลสูงกว่าแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยง (รูปที่ 18,19) และฝ้ายน้อยเจริญเร็วกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 โดยเริ่มเข้าสู่ log phase พร้อมกันในสัปดาห์ที่ 1 ส่วน stationary phase ในฝ้ายน้อยใช้เวลา 3 สัปดาห์

ส่วนพันธุ์ศรีสำโรง 2 เข้าสู่ stationary phase ใน 4 สัปดาห์ การเจริญของเซลล์แขวนลอยเมื่อทำการหาน้ำหนักแห้งให้ผลการทดลอง เป็นทำนองเดียวกัน โดยมีระยะ stationary phase เดียวกันที่สัปดาห์ที่ 3 (รูปที่ 20) เซลล์แคลลัสเจริญในอาหารเหลวได้ดีกว่าอาหารแข็ง เนื่องจากเซลล์ได้รับการเขย่า โอกาสที่เซลล์สัมผัสกับอาหารจึงทั่วถึง มีการแลกเปลี่ยนแก๊สได้ดี รวมทั้งช่วยลดการตกตะกอนของเซลล์ (Butenko, 1985) รูปแบบการเจริญของเซลล์ที่เข้าสู่ stationary phase เมื่อมาเพาะเลี้ยงต่อไป ความมีชีวิตของเซลล์จะเริ่มลดลง รวมทั้งเซลล์มีอายุมาก จะเกิดการ lysis ช่วงที่เหมาะสม คือ ระยะ log phase

การติดตามรูปแบบการเจริญของแคลลัส ในสภาพของการเลี้ยงในอาหารแข็ง และอาหารเหลวนี้ ชี้ให้เห็นถึงผลของสารควบคุมการเจริญต่อแคลลัสจากเนื้อเยื่อ จากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลของพืชชนิดเดียวกัน จะมีผลต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งอาจมีกลไกควบคุมการเจริญต่อแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง และไฮโปคอทิลของพืชชนิดเดียวกันจะมีผลต่างกันอย่างชัดเจน และมีกลไกควบคุมการเจริญ และการแบ่งเซลล์ต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้

4.4 <u>การชักนำให้เกิดต้น</u>

จากการตรวจเอกสารเมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย โดยนำแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 น้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ย้ายลงบนอาหารสูตรเดิมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์แทนน้ำตาลกลูโคส เพื่อที่จะชักนำให้ได้ลักษณะของ embryogenic callus พร้อมที่จะพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ พบว่า ช่วงของ

การพัฒนาให้เกิดต้นพืชการเปลี่ยนมาใช้ซูโครสแทนกลูโคส มีผลช่วยให้เกิด embryogenic callus ในฝ้าย แต่อย่างไรก็ตาม ไม่มีคำอธิบายถึงว่า ซูโครสไปมีผลอย่างไรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ฝ้ายในระดับโมเลกุลที่แน่นอน

สำหรับผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า เมื่อนำเนื้อเยื่อแคลลัสส่วนหนึ่งเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มี NH_4NO_3 เป็นส่วนประกอบ แต่เพิ่ม KNO_3 ขึ้นเป็น 2 เท่า พร้อมกับเสริมด้วยกลูตามีน Gamborg (1970) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองโดยใช้ไนโตรเจนในรูปไนไตรทได้ดี ถ้ามี NH_4NO_3 มากไป จะมีผลต่อการใช้พลังงานและองค์ประกอบของเซลล์-ในกระบวนการ TCA ในเซลล์พืช โดยจะไปจำกัดการสร้าง ketoacid ที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ ยังทดสอบถึงการใช้กลูตามีนเสริมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า L-กลูตามีนช่วยให้การเจริญของเซลล์ดีขึ้น

Davidonis และ Hamilton (1983) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้าย Gossypium hirsutum L. พันธุ์ Coker 310 ลงในอาหารสูตร LS ที่ไม่มี NH_4NO_3 แต่เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่า สามารถทำให้เนื้อเยื่อแคลลัสของฝ้ายเจริญพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้าย embryo เรียกว่า embryoid โครงสร้างนี้สามารถเจริญต่อไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในภายหลังได้

การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม มีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาเป็นต้นพืช จากผลการทดลอง(ตารางที่ 8,9) เมื่อไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง แคลลัสจะไม่พัฒนาเป็นยอดและราก เมื่อเสริมด้วย kinetin ซึ่งเป็นไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป ทำหน้าที่ให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวและเสริมการสร้างยอดให้แก่แคลลัส (Murashige, 1974) จากการศึกษานี้กลับพบว่าเมื่อมี kinetin 0.5 มก./ล. แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากเท่านั้น ไม่มีการพัฒนาเป็นยอด

ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงใช้สูตรอาหารดัดแปลง MS ที่ไม่มี NH_4NO_3 แต่เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่า เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เติมสารกลูตามีนลงไป 15 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเพาะเลี้ยงเสริมด้วย kinetin 0.5 มก./ล. เป็นอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับพัฒนารากของฝ้ายในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อเปลี่ยนต้นตอของไนโตรเจนโดยการเติมเคซีนไฮโดรไลเซต ซึ่งเป็นสาร-อินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในรูปของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ มากมาย และเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบนี้จะมีส่วนช่วยเสริมให้ไซโตไคนินกระตุ้นการสร้างยอดได้ดีขึ้น (Bhojwani และ Razdan, 1983) แต่จากการทดลองพบว่าไม่มีผลในการชักนำให้แคลลัสของฝ้ายสร้างยอดขึ้นมาได้

สำหรับการชักนำให้เกิดต้นผ่านทาง embryogenesis โดยการชัก-นำแคลลัสให้เกิดโครงสร้างเป็น somatic embryo นั้น Shoemaker และคณะ (1986) รายงานไว้ว่า 2,4-D เป็นออกซินที่ช่วยให้เกิดลักษณะของ somatic embryo ในเซลล์ฝ้ายซึ่งพร้อมที่จะเกิดยอดและรากเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจากระยะการพัฒนาเป็นยอดและรากของ embryo ไม่จำเป็นต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากการทดลองเมื่อนำแคลลัสมาเจริญบนอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เสริมด้วย 2,4-D ระดับต่างๆ กัน พบว่า อาหารที่มี 2,4-D ระดับ 0.1 มก./ล. ทำให้แคลลัสยังคงมีสีเขียวในพันธุ์ฝ้ายทั้งสอง เมื่อย้ายลงอาหารแข็งสูตรเดิมไม่มีสารควบ-คุมการเจริญเติบโต แคลลัสก็ไม่สามารถจะพัฒนาเป็นยอดและรากได้ ในการ-ทดลองได้ลองเสริมด้วย kinetin และ เคซีนไฮโดรไลเซตที่ระดับต่าง ๆ ก็ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นฝ้ายที่สมบูรณ์

4.5 ระยะการแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซมในเซลล์รากฝ้าย

เนื่องจากการศึกษาระยะการแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซมจำเป็นต้องมีตัวอย่างเซลล์จำนวนมาก โดยมาก มักนำมาจากรากพืชที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ ในการวิจัยนี้ สามารถพัฒนาเซลล์แคลลัสให้สร้างรากขึ้นมาได้ในสภาวะที่ควบคุมได้คงที่ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ศึกษาระยะการแบ่งเซลล์แบบ mitosis และนับจำนวนโครโมโซม ที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพ in vitro มักมีรายงานว่า จะมีการเปลี่ยนแปลงแบบ somaclonal variation ซึ่งมีผลไปสู่การเปลี่ยนแปลงจำนวนและลักษณะโครโมโซมในเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อเลี้ยงไปเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงสนใจที่จะใช้เซลล์ที่พัฒนาได้ ประกอบกับสภาวะที่ได้ทำการทดลองนี้ เป็นตัวศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นตัวอย่าง เพื่อเป็นเครื่องมือในการศึกษาทดสอบสถานภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อทำการเตรียมเซลล์รากฝ้ายจากธรรมชาติและรากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส แล้วทำการศึกษาลักษณะการแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซม

จากการศึกษาลักษณะการแบ่งเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนำเซลล์รากมาย้อมสี จะพบช่วงระยะการเจริญของเซลล์ต่าง ๆ กัน ได้แก่ ระยะ prophase, ระยะ metaphase, ระยะ anaphase และทำการศึกษาภายในเซลล์ เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดย Gossypium hirsutum L. มีจำนวน 2N=4X=52 แท่ง และ G. arboreum L. 2N=2X=26 แท่ง (Barrow และคณะ, 1978) จากการทดลองหลายๆ ครั้ง พบว่า เซลล์รากฝ้ายทั้งจากธรรมชาติและที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (G. hirsutum L.) มีจำนวน 2N=4X=48-52 แท่ง และฝ้ายน้อย (G. arboreum L.) 2N=2X=26 แท่ง แสดงให้เห็นว่า เซลล์รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสยังมีโครโมโซมเหมือนกับเซลล์จากธรรมชาติ และใกล้เคียง

กับจำนวนโครโมโซมของต้นฝ้ายที่เคยมีรายงานไว้ และสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาระยะการแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของโครโมโซมได้

4.6 การแยกเซลล์ไร้ผนัง

การแยกเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายนั้น จำเป็นต้องมีแหล่งของพืชพอเพียงต่อการทดลอง แม้จะสามารถแยกเซลล์ไร้ผนังได้จากส่วนใบฝ้ายในธรรมชาติ แต่มักประสบปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ยิ่งไปกว่านั้นเซลล์ที่เตรียมได้ก็จะมีคุณสมบัติที่ไม่สม่ำเสมอแตกต่างกันออกไปเนื่องจากอายุของใบฝ้ายที่ใช้เตรียมเซลล์ต่างกัน การเพาะเลี้ยงฝ้ายในหลอดทดลองสภาพปลอดเชื้อ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพราะเราสามารถควบคุมการเจริญ และปริมาณของเนื้อเยื่อฝ้ายที่ต้องการได้ รวมทั้งไม่มีอุปสรรคจากเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนได้เซลล์ที่มีอายุสม่ำเสมอและใกล้เคียงกัน

ในการทดลองนี้ ใช้แหล่งของใบฝ้ายที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยการเพาะเมล็ดในวุ้น เลือกใช้ใบฝ้ายอายุ 7 วัน เนื่องจากเมื่ออายุของใบเลี้ยงอ่อนเกินไป การคลี่ออกของแผ่นใบยังไม่สมบูรณ์ทำให้การลอกผิวใบด้านล่างทำได้ยาก หรือถ้าใบเลี้ยงฝ้ายแก่เกินไป จะเกิดการเหลือง และอาการเน่าของใบเลี้ยง

สำหรับการเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย เพื่อใช้เป็นแหล่งของการเกิดเซลล์ไร้ผนัง ทำได้โดยการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยงนั้นก่อนที่จะนำมาแยกเซลล์ไร้ผนัง จากการทดลอง พบว่า ในระหว่างการเพาะเลี้ยงถ้าหากได้มีการเปลี่ยนอาหารของเซลล์เพาะเลี้ยง 2 วันต่อครั้ง หลาย ๆ ครั้ง ผลที่ได้รับจากการแยกเซลล์ไร้ผนังจะทำให้ได้จำนวนเซลล์ไร้ผนังเพิ่มมากขึ้น เชื่อว่า การเปลี่ยนอาหารเป็นการเปลี่ยนสภาพของการเลี้ยงจากอาหารเดิมที่มีการปล่อยสารบางอย่างหรือของเสียออกมาจากพืช นับเป็นการช่วยลดการสะสม

ของเสีย ทำให้การแบ่งตัวสูงขึ้น เซลล์จิงมีขนาดเล็ก นอกจากนี้ สภาพของแคลลัสที่มีลักษณะหลวมจะเป็นแหล่งของการแยกเซลล์ไร้ผนังได้ดีกว่าที่แคลลัสมีลักษณะแน่น ซึ่งให้ผลตรงกันกับการศึกษาของ Saka และคณะ (1987)ที่รายงานไว้ว่า แคลลัสของฝ้าย G. hirsutum L. พันธุ์ Deltapine 16 ที่มีลักษณะเซลล์แคลลัสหลวม จะเป็นแหล่งที่เหมาะต่อการแยกเซลล์ไร้ผนัง

นอกจากการเตรียมแหล่งของพืชดังกล่าวแล้ว ชนิดของเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการย่อยผนังเซลล์ ก็มักใช้กันโดยทั่วไป แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย middle lamella ที่เชื่อมระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ ได้แก่ pectinase ทำให้เซลล์แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และกลุ่มที่ย่อยผนังเซลล์ ได้แก่ cellulase, hemicellulase ในการทดลองนี้ ใช้ส่วนผสมของ macerozyme และ cellulase ในการแยกกลุ่มเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวและย่อยผนังเซลล์ตามลำดับเมื่อใช้ฝ้ายต่างสกุลและต่างพันธุ์กัน คือ พันธุ์ศรีสำโรง 2 ฝ้ายน้อย พบว่า ความแตกต่างของสกุลฝ้ายจะให้ผลผลิตของเซลล์ในรูปของจำนวนเซลล์ไร้ผนังต่างกัน ยิ่งไปกว่านี้ ยังพบว่า เมื่อใช้เนื้อเยื่อของฝ้ายต่างชนิดกันก็จะให้ผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังต่างกันด้วย โดยพบว่า ผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังที่เซลล์เริ่มต้นเป็นใบเลี้ยง พันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังสูงกว่าฝ้ายน้อย ในขณะที่เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงส่วนแคลลัส ก็จะให้ผลผลิตจำนวนเซลล์ไร้ผนังมากกว่าใบเลี้ยงและเซลล์แขวนลอย อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ไร้ผนังได้แน่นอนมากนัก เนื่องจากขีดจำกัดอยู่ที่ไม่สามารถควบคุมจำนวนเซลล์เริ่มต้นได้ถูกต้องแน่นอน แต่บอกได้ในเรื่องปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ จากการที่เซลล์ของใบอยู่กันค่อนข้างหลวม ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการเจริญเหมือนในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่มีความแตกต่างของเซลล์มาก ในปี ค.ศ.1985 Nakagawa รายงานว่า พืช Spinaca oleracea นั้น ขั้นตอนการเจริญของแคลลัสมีผลต่อจำนวนและความอยู่รอดของเซลล์ไร้ผนัง

โดยช่วงของ log phase ให้ผลการแยกและความมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ไร้ผนังสูงสุด ในการแยกเซลล์ไร้ผนังเซลล์ที่เจริญรวดเร็วจะแยกเซลล์ไร้ผนังได้ดีกว่าเซลล์ที่มีการเจริญช้า ผลการทดลองนี้ได้รายงานในพืชอื่นอีกหลายชนิด Ford (1990) พบว่า การเจริญของเซลล์แขวนลอยใน Arabidopsis thaliana ช่วง log phase ให้ผลการแยกและความมีชีวิตของเซลล์ไร้ผนังสูงสุด ผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ (รูปที่ 27, 34, 35) พบว่า เอนไซม์ที่ใช้แยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงมีความเข้มข้นต่ำกว่าเอนไซม์ที่ใช้แยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสและเซลล์แขวนลอยมาก แม้ว่าถ้าเราจะเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของเอนไซม์ลง จำนวนเซลล์ไร้ผนังจะไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตาม การปรับชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์นั้น ต้องคำนึงถึงการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้ด้วย

เนื่องจากเซลล์ไร้ผนังไม่มีผนังเซลล์ การรักษารูปร่างของเซลล์ให้คงรูปอยู่ได้จำเป็นอย่างยิ่ง เพราะแต่เดิมเซลล์พืชจะมีผนังเซลล์เป็นโครงสร้างสำคัญ มีสารพวก cellulase, hemicellulase และน้ำ รวมทั้งสารลิกนิน (lignin), เพ็กติน (pectin) อันมีคุณสมบัติช่วยทำหน้าที่เป็นโครงสร้างและสร้างความแข็งแรงแก่เซลล์ ทนต่อแรงดันจากสารละลายภายนอกและภายในเซลล์ได้ (Sheeler และ Bianchi, 1983) เมื่อปราศจากผนังเซลล์ การรักษาสภาพของเซลล์ในสารละลายเอนไซม์ระหว่างการย่อยจึงขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลาย ที่ใช้ในการรักษาระดับความดันออสโมซิสของเซลล์ไร้ผนังที่ผสมอยู่ในสารลายเอนไซม์ด้วย ในทางปฏิบัติ นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนิยมใช้สารประเภทน้ำตาล-แอลกอฮอล์ เช่น mannitol, sorbitol, กลูโคส และซูโครส (ประสาทพร สมิตะมาน, 2528; Dixon, 1985) จากการศึกษา เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 0.35 โมลาร์ ซึ่งรักษาสมดุลออสโมซิสระหว่างการเลี้ยงได้ดีของการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัสของฝ้าย ซึ่ง-

สอดคล้องกับผลของ Saka และคณะ (1987) และเมื่อเปลี่ยนมาลองใช้เป็นสารรักษาความสมดุลของออสโมซิสในระหว่างการย่อย โดยแปรปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย พบว่า จำนวนเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้ต่ำกว่าเมื่อใช้ mannitol แทนน้ำตาลซูโครส เมื่อความเข้มข้นของ mannitol เป็น 0.7 โมลาร์ รักษารูปร่างของเซลล์ไร้ผนังได้ดีที่สุด ทั้งนี้ เนื่องจากว่าเซลล์พืชไม่สามารถนำ mannitol ไปใช้ในขบวนการเมตาบอลิซึมได้ ในขณะที่เซลล์ไร้ผนังสามารถนำน้ำตาลซูโครสไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึมได้ ทำให้คุณสมบัติการเป็นสารรักษาความสมดุลของออสโมซิสลดลง ในขณะทำการทดลองการเลือกใช้สารรักษาความสมดุลของออสโมซิสที่เหมาะสมกับการแยกเซลล์ไร้ผนังย่อมได้เซลล์ไร้ผนังที่มีความชีวิตอยู่รอดสูง และขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ร่วมกันในการแยกเซลล์ไร้ผนังด้วย

การทำงานของเอนไซม์ได้ดีเพียงใดขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ pH ซึ่งอุณหภูมิที่พอเหมาะสำหรับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจะต่างกัน Gamborg (1981) รายงานว่า cellulase และ macerozyme ย่อยผนังเซลล์พืชทั่วไปได้ดี โดยให้จำนวนเซลล์ไร้ผนังสูงสุดที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 22-28 °ซ. ใช้อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ. ในการทดลองครั้งนี้ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปเป็น 28 $\pm$ 2 °ซ. ก็ยังให้ผลทำนองเดียวกัน กล่าวคือ เอนไซม์ยังมีประสิทธิภาพต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังได้ดี เพราะถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำไป จะมีผลไปทำลายโครงสร้างของโปรตีนทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ส่วน pH มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ เพราะ pH จะควบคุมการแตกตัวของหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลของเอนไซม์ pH ที่เหมาะสมต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายมี 2 ค่า คือ ที่ pH 5.0 และ pH 5.6 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า cellulase ที่เตรียมได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งใช้ในการวิจัยครั้งนี้ไม่ใช่เอนไซม์บริสุทธิ์อาจมีหลาย isozyme ทำให้มี pH ของการเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป เป็น

ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างกันด้วย

ช่วงระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ มีผลต่อการแยกเซลล์ไร้ผนัง ซึ่งขึ้นกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเซลล์พืชแต่ละชนิด รวมทั้งความจำเพาะ (specificity) ของชนิดและปริมาณของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ไม่ใช่เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง พบว่า เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นานเกินไป จะมีสิ่งเจือปนในเอนไซม์ และเศษเซลล์ในสารละลายเอนไซม์อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ไร้ผนัง หรือทำให้เซลล์ไร้ผนังแตกได้ง่าย สำหรับแสงมีผลต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังไม่แตกต่างจากการย่อยในที่มืดมากนัก แต่ผลผลิตสุดท้ายนั้น พบว่าในที่มืดให้ผลผลิตของจำนวนเซลล์ไร้ผนังสูงกว่าที่มีแสง จากการศึกษาเอกสารพบว่าการเตรียมเซลล์ไร้ผนังในพืชชนิดอื่น ๆ มักจะทำการบ่มในที่มืด ทั้งนี้ เพราะในในสภาวะที่มีแสงเซลล์บางส่วนอาจมีการเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ในคลอโรพลาสต์บางส่วนอาจเกิดการสังเคราะห์แสง บางส่วนมีผลทำให้เซลล์ว่องไวในการเจริญและใช้พลังงาน ซึ่งอาจมีผลเป็นอันตรายต่อเซลล์ไร้ผนังได้

นอกจากนี้ พบว่า การมี divalent cation ของพวก $CaCl_2$, $MgSO_4$ ทำให้รักษาดุลยภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ให้มีชีวิตดีขึ้น จากการศึกษาของ Bhojawani และ Razdan (1983) ให้ผลสนับสนุนการทดลองนี้ พบว่า divalent cation มีผลไปยับยั้งการสร้าง ribonuclease (RNase) ซึ่งเอนไซม์นี้มีผลทำให้เซลล์ไร้ผนังแตก ดังนั้น จึงไม่เกิดเอนไซม์ที่มีผลกระทบต่อเซลล์ไร้ผนังทำให้ความมีชีวิตอยู่รอดมีมากขึ้น

ความสำเร็จของการแยกเซลล์ไร้ผนังให้ได้ผลผลิตสูง ยังขึ้นกับช่วงอายุการเจริญของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง จากการทดลองแยกเซลล์ไร้ผนังจากเนื้อเยื่อแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่อายุต่างๆ กัน พบว่า เมื่อเซลล์มีอายุมาก ผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจะลดลง อาจเป็นเพราะว่า เมื่อเซลล์อายุมาก การสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อเซลล์ในการนำไปใช้สร้างหรือซ่อมแซมเซลล์เป็นไป

ได้น้อยลง ทำให้เมื่อแยกเซลล์ไร้ผนังออกมาแล้วจะแตกง่าย ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Wallin และคณะ (1977) เมื่อแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของยาสูบ ที่เลี้ยงไว้นาน ๆ ผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังที่ได้จะต่ำเนื่องจากเซลล์ไร้ผนังแตกง่าย

เมื่อทำการแยกเซลล์ไร้ผนังได้แล้ว จำเป็นต้องทำเซลล์ไร้ผนังให้บริสุทธิ์จากเซลล์ปกติที่หลงเหลืออยู่ นอกจากนี้ ยังจำเป็นต้องรีบย้ายเซลล์ไร้ผนังออกจากสารละลายเอนไซม์ ที่ใช้เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเร็ว และปลอดจากเศษเซลล์ สิ่งสกปรกต่างๆ เริ่มต้น โดยใช้ความแตกต่างของขนาดเซลล์ไร้ผนังกับเซลล์ปกติ กรองผ่านผ้ากรองขนาด 110 ไมโครเมตร ที่มีในห้องทดลอง ดังนั้น เซลล์ไร้ผนังสามารถรอดผ่านรูของผ้ากรองได้ เซลล์ที่ยังไม่ถูกย่อยยิ่งมีขนาดใหญ่เท่านั้นที่กรองไม่ผ่านรู เนื่องจากขนาดของเซลล์ไร้ผนังของพันธุ์ศรีสำโรง 2 ที่แยกจากส่วนใบเลี้ยงส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วง 20-30 ไมโครเมตร จากส่วนแคลลัสส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 15-30 ไมโครเมตร สำหรับส่วนเซลล์แขวนลอยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 20-45ไมโครเมตร ในฝ่ายน้อยขนาดของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยง แคลลัสและเซลล์แขวนลอยส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วง 10-20 ไมโครเมตร, 15-25 ไมโครเมตร และ 20-40 ไมโครเมตรตามลำดับ(รูปที่ 46) หลังจากกรองแล้ว นำเซลล์ไร้ผนังไปล้างด้วยสารละลายสำหรับล้างเซลล์ไร้ผนัง นำไปเซนติฟิวจ์โดยใช้แรงเหวี่ยงเพื่อให้สิ่งเจือปนในสารละลายและเศษเซลล์ขนาดเล็กที่รอดผ่านรูได้ออก เหลือเฉพาะเซลล์ไร้ผนังเท่านั้น แรงเหวี่ยงและเวลาที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เซลล์ไร้ผนังแตกและองค์ประกอบภายในเซลล์ไร้ผนังไปรวมอยู่เพียงด้านใดด้านหนึ่ง พบว่าแรงเหวี่ยงที่เหมาะสมของเซลล์ไร้ผนังฝ่าย คือ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สำหรับเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนใบเลี้ยง ส่วนที่แยกจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยจำเป็นต้องเซนติฟิวจ์นานกว่าเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้น ติดตามการสร้างผนังเซลล์ทำได้โดยย้อมด้วยสาร calcofluor white เพราะผนังเซลล์มีส่วนประกอบของพวก cellulose สารนี้จะไปจับกับโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จึงเกิดการเรืองแสงสีฟ้าที่บริเวณผนังเซลล์ได้ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ในการทดลองนี้ นอกจากสังเกตลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างจากเซลล์ปกติอย่างชัดเจนที่ขนาด รูปร่าง และการย้อมสีแล้ว ยังได้สนใจตรวจสอบลักษณะความแตกต่างของเซลล์ไร้ผนังกับเซลล์ปกติ โดยใช้การตรวจดูด้วยกล้องอิเลคตรอนไมโครสโคปแบบส่องกราด(scanning electron microscope)ใช้เซลล์ปกติและเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยที่แยกได้จากส่วนของใบเลี้ยงเป็นตัวอย่าง ในการศึกษา พบว่า เซลล์เซลล์ปกติของใบเลี้ยงที่ได้แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ รูปร่างของเซลล์มีทั้งยาวค่อนข้างกลม ผิวเซลล์ไม่เรียบ ในขณะที่เมื่อนำเซลล์ไร้ผนังที่ย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ไม่สมบูรณ์มาตรวจดูลักษณะ พบว่า รูปร่างของเซลล์ค่อนข้างกลมมากขึ้น สังเกตเห็นพื้นผิวเซลล์ รอยฉีกขาดของผนังเซลล์ ส่วนเซลล์ไร้ผนังที่ย่อยสมบูรณ์เซลล์มีรูปร่างกลม พื้นผิวเซลล์เรียบ (รูปที่ 33) ลักษณะภายนอกที่ตรวจสอบนี้รูปแบบของเซลล์ปกติและเซลล์ไร้ผนังจะเหมือนกัน แต่มองเห็นความแตกต่างในเรื่องของขนาดได้ชัดเจนขึ้น กล่าวคือ โดยเฉลี่ยแล้วพันธุ์ศรีสำโรง 2 จะให้เซลล์ไร้ผนังที่มีขนาดใหญ่กว่าฝ้ายน้อย นอกจากนี้ การตรวจสอบลักษณะเซลล์ไร้ผนังนี้ยังช่วยให้แน่ใจได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเกิดจากเซลล์ไร้ผนังอย่างแท้จริง

4.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง

ในระยะแรกของการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังมุ่งเน้นการเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากสามารถติดตามผลได้ง่าย เปลี่ยนอาหารสะดวก และสามารถ

เชย่าเบา ๆ เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนแก๊สพอเพียง ใช้อาหารสูตร MS เต็มสูตร เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ UM ในการทดลอง พบว่า อาหารที่ใช้เลี้ยงจะตกตะกอน เนื่องจากสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไร้ผนังมี มีการเพิ่ม $CaCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า Ca^{2+} ที่มีมากเกินพอเข้าไปทำปฏิกิริยากับ PO_4 ที่มีอยู่ในสูตรอาหาร MS ปกติที่มีปริมาณสูงอยู่แล้ว เกิดเป็น $Ca_3(PO_4)$ ตกตะกอนออกมา ได้ทดลองลดสัดส่วนของสูตรอาหาร MS เป็น 1/2 MS สามารถแก้ปัญหาการตกตะกอนนี้ การเพิ่ม $CaCl_2$ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังเพื่อช่วยให้ plasmamembrane ของเซลล์ไร้ผนังแข็งแรงและสร้างผนังเซลล์เร็วขึ้น สูตรอาหาร 1/2 MS ทำให้เซลล์ไร้ผนังมีชีวิตอยู่รอดได้ระยะหนึ่ง(ประมาณ 1 สัปดาห์) พร้อมกับมีการสร้างผนังเซลล์ แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ.

ในการทดลอง ได้พยายามหาสภาวะการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังที่เหมาะสม ใช้สูตรอาหาร 1/2 MS มาใช้เลี้ยงเซลล์ไร้ผนังและแปรความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีส่วนช่วยในการเจริญและแบ่งเซลล์ได้ Burger และ Hackett (1982) รายงานว่า NAA และ kinetin ทำให้การแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังสูงขึ้น นอกจากนี้ Freytag และคณะ (1988) พบว่า NAA, 2,4-D และ zeatin ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของ Beta vulgaris ได้

จากการทดลอง พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตสังเคราะห์ที่เป็นสารเดี่ยว ๆ ถึงแม้จะแปรผันสัดส่วนหลายชนิดเข้าด้วยกัน ก็ยังไม่สามารถพบการแบ่งเซลล์

มีรายงานว่า น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์ Maeda และคณะ (1983) พบว่า การเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของ Lithospernum erythrorhizon การเกิดกลุ่มเซลล์ของเซลล์ไร้ผนัง

จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง 20 เปอร์เซ็นต์ จึงได้ทำการทดลองแปรผันปริมาณน้ำมะพร้าวเสริมลงไปในอาหารสูตร 1/2 MS ที่มี NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล., kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 และ 0.5 มก./ล. จากผลการทดลองปริมาณน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้จากเซลล์ไร้ผนังที่แยกมาจากส่วนของแคลลัสฝ้าย นอกจากนี้ ยังพบว่าน้ำมะพร้าวยังช่วยรักษาสภาพความเป็นกรด - ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงได้

ปัญหาสำคัญของการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังอีกประการหนึ่ง คือ เรื่องของสารปรับแรงดันออสโมซิส ในการทดลอง พบว่า ถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกัน รูปร่างของเซลล์ไร้ผนังระหว่างการเลี้ยงไม่ดีเหี่ยวบ้างแตกบ้าง(เนื่องจากเกิดสภาวะ hypo หรือ hyper osmotic) ในการทดลอง จึงใช้ mannitol ร่วมด้วย เนื่องจากเป็นสารปรับแรงดันออสโมซิสช่วยรักษาดุลยภาพของเซลล์โดยที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม

จากผลการศึกษาแสดง ให้เห็นว่า การสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ยังเกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้น คิดว่าเป็นเพราะความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง ในการศึกษาทดลองแปรเปลี่ยนความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง พบว่า ความหนาแน่น $1x10^{5}$ เซลล์ต่อมิลลิตร เหมาะสมที่สุด เมื่อความหนาแน่นมากไม่อาจช่วยการแบ่งเซลล์เพราะมีเซลล์ไม่มีชีวิตสูง สารที่ปล่อยออกมาอาจมีผลต่อการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต

กล่าวโดยสรุปได้ว่า ในงานวิจัยนี้ได้พยายามหาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมกับการเตรียมเซลล์แคลลัสของฝ้าย 2 สายพันธุ์ คือ ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ซึ่งเป็นฝ้ายที่มีเพาะปลูก และเหมาะสมในสภาพภูมิอากาศของไทยเมื่อได้แคลลัสแล้วก็ได้พยายามศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหวนคืนกลับเป็นต้นใหม่ของกลุ่มเซลล์แคลลัสของฝ้ายทั้งสองสายพันธุ์ โดยใช้ทั้งสภาวะที่ได้จากการศึกษาจากเอกสาร

รวมทั้งสภาวะที่ได้แปรผัน กำหนดขึ้นเองด้วย ทั้งปัจจัยทางกายภาพ ชีวภาพ ฯลฯ ผลปรากฏว่าสามารถเตรียมเซลล์แคลลัสในลักษณะที่เป็น embryogenic callus ได้จากฝ้ายทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จในการทำให้เซลล์หวนคืนกลับเป็นต้นฝ้ายได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ ได้บันทึก และรวบรวมผลการวิจัยต่างๆ ตลอดจนลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงไว้ได้อย่างละเอียด เพื่อประโยชน์ของการศึกษาต่อไป เนื่องจากสภาวะของการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสจากฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และ ฝ้ายน้อย ยังไม่มีรายงายไว้ในเอกสารใดมาก่อน

ในการเตรียมเซลล์ไร้ผนังของเซลล์ฝ้ายทั้ง 2 ชนิดก็ได้ทำการศึกษาหาวิธีการ สภาวะที่เหมาะสมทั้งทางกายภาพและชีวภาพซึ่งสภาวะและข้อมูลเหล่านี้ยังไม่มีรายงานมาก่อนในฝ้ายทั้งสอง

เซลล์ไร้ผนังของฝ้ายทั้ง 2 ชนิดสามารถเตรียมได้จากทั้งเซลล์ใบในธรรมชาติ และเซลล์เพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาวะอาหารแข็งและสภาวะแขวนลอย เพื่อนำเปรียบเทียบคุณสมบัติ และพยายามเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สภาวะของการสร้างผนังเซลล์ และการหวนคืนกลับมาสู่สภาวะของเซลล์แคลลัสใหม่ ซึ่งในงานวิจัยขั้นตอนนี้เกือบยังไม่มีผู้ใดรายงานว่า พบความสำเร็จมาก่อนเลย แต่การวิจัยนี้สามารถศึกษาจนกระทั่งสภาวะของการสร้างผนังเซลล์ใหม่เกิดขึ้นได้ในเซลล์ไร้ผนังของสายพันธุ์ฝ้ายทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ ยังได้สภาวะที่เซลล์มีการสร้างผนังเซลล์ สามารถแบ่งตัวได้ในระยะเริ่มต้นถึงแม้จะไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้เป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่องก็ตาม สภาวะเหล่านี้ หากได้รับความสนใจและติดตาม ตลอดจนมีระยะเวลาของการวิจัยที่มากพอ น่าจะเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการนำไปสู่ความสำเร็จได้อย่างแน่นอน

ในการทดลองนี้ สามารถใช้เซลล์รากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส เป็นแหล่งของเซลล์ใหม่ใช้เป็นแหล่งของการศึกษาระยะเวลาของการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ตลอดจนสามารถใช้เป็นแหล่งในการศึกษาติดตามคุณลักษณะ จำนวน และสมบัติของโครโมโซมได้ ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนและลักษณะโครโมโซมที่ทำการวิเคราะห์จากเซลล์รากของต้นฝ้ายเพาะเลี้ยงในธรรมชาติ นับเป็นเทคนิคที่สำคัญในการศึกษาคุณสมบัติทาง morphology ของเซลล์พืชได้ใหม่อีกทางหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สภาวะของการเกิดรากจากเซลล์แคลลัสเพาะเลี้ยงที่สามารถควบคุมให้เกิดได้อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ

ในการศึกษา อิเล็กตรอนไมโครกราฟของเซลล์ไร้ผนังของเซลล์ฝ้ายทั้ง 2 ชนิด เป็นผลที่น่าสนใจที่สามารถใช้อธิบายถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทาง morphology ของเซลล์ฝ้ายที่ไม่ค่อยพบกระทำมาก่อน ซึ่งการ establish กระบวนการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยสำรวจเซลล์ฝ้ายทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นผลการทดลองที่ใช้เวลา และให้ผลที่น่าสนใจ

สรุปผลการวิจัย

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส จากชิ้นส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (Gossypium hirsutum L.) และพันธุ์ฝ้ายน้อย (G. arboreum L.) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ อาหารสูตร MS (MS salt) ของ Marashige and Skoog เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากใบเลี้ยง ส่วนแคลลัสจากไฮโปคอทิลเสริมด้วย NAA 4 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน
2. แหล่งของคาร์บอนที่ทำให้แคลลัสเจริญได้ดี คือ น้ำตาลกลูโคสเมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครส ในปริมาณที่เท่ากัน คือ 30 กรัมต่อลิตรในอาหารเพาะเลี้ยง
3. การเจริญของแคลลัสจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอทิลเจริญได้เร็วกว่าเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงในฝ้ายทั้ง 2 พันธุ์ รูปแบบการเจริญของเซลล์เป็น logarithmic growth โดยการเจริญของแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของส่วนไฮโปคอทิลเจริญได้มากกว่าส่วนใบเลี้ยง และยังพบอีกว่า ฝ้ายน้อยมีการเจริญเร็วกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 โดยฝ้ายน้อยเจริญสูงสุดภายใน 3 สัปดาห์ ขณะที่พันธุ์ศรีสำโรง 2 เจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4
4. สามารถจัดกลุ่มและแบ่งลักษณะของเซลล์แคลลัสของฝ้ายออกได้เป็นหลายแบบ พบว่า แคลลัสที่ชักนำด้วย NAA ต่อ kinetin จะให้เซลล์ที่มีรูปร่างกลมเป็นส่วนใหญ่ องค์ประกอบภายในเซลล์ เข้มข้น เหมาะต่อการนำมาชักนำให้เกิดต้นต่อไป

5. แคลลัสของฝ้ายน้อยมีสีเขียว การเกาะกลุ่มของเซลล์ค่อนข้างแน่น ส่วนศรีสำโรง 2 แคลลัสมีสีเขียวออกเหลือง การเกาะกลุ่มของเซลล์หลวมมากกว่าฝ้ายน้อย

6. การพัฒนาต่อจากแคลลัส โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ไม่มี NH_4NO_3 แต่เพิ่ม KNO_3 ขึ้นเป็น 2 เท่า เสริมด้วยวิตามินสูตร B5 เติมกลูตามีน 15 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วย kinetin 0.5 มก./ล.

ฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 จากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 7.1 และ 9.6 ตามลำดับ

ฝ้ายน้อย จากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล เกิดราก 9.4 - 19.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

7. จำนวนโครโมโซมที่ตรวจนับได้ พันธุ์ศรีสำโรง 2 2N=4X=48-52 แท่ง ส่วนพันธุ์ฝ้ายน้อยจำนวนโครโมโซม 2N=2X=26 แท่ง

8. ในการแยกเซลล์ไร้ผนัง พบว่า ใบเลี้ยงอายุ 7 วัน เป็นใบที่สมบูรณ์เหมาะต่อการนำมาแยกเซลล์ไร้ผนัง ส่วนแคลลัสลักษณะหลวมอายุ 3 สัปดาห์ และเซลล์แขวนลอยอายุ 2 สัปดาห์ เหมาะในการแยกเซลล์ไร้ผนังให้ได้จำนวนมากที่สุด

9. เมื่อใช้ cellulase R10 0.5 % ร่วมกับ macerozyme R10 0.5 % สามารถแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงสูงสุด ส่วน cellulase R10 2.0 % ร่วมกับ macerozyme R10 0.6% เหมาะต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัส สำหรับเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยแยกได้จำนวนสูงสุดเมื่อใช้ cellulase R10 2.0 % macerozyme R10 0.6 % $CaCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์

10. ผลของ mannitol ต่อการเป็นสารรักษาสมดุลของออสโมซิส พบว่า mannitol 0.7 โมลาร์ในสารละลายเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ เหมาะสมต่อการรักษาดุลยภาพของเซลล์

11. pH ที่เหมาะต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังมี 2 ค่า ที่ pH 5.0 และ 5.6

12. ผลของช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ พบว่า เซลล์ไร้ผนัง ส่วนใบเลี้ยงใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากแคลลัส และเซลล์แขวนลอยใช้เวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำให้ได้เซลล์ไร้ผนังสูงสุด

13. ที่มืดและที่มีแสงให้เซลล์ไร้ผนังใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ. ให้เซลล์ไร้ผนังสูงสุด

14. ผลของสารบางตัว ที่เติมลงไปในสารละลายเอนไซม์ ได้แก่ $CaCl_2$, $MgSO_4$ ช่วยให้จำนวนเซลล์ไร้ผนังแยกได้ดีขึ้น

15. เมื่อเปรียบเทียบขนาดของเซลล์ไร้ผนัง พบว่า ขนาดของเซลล์ไร้ผนังเรียงจากขนาดเล็กไปหาขนาดใหญ่ ได้แก่ เซลล์ไร้ผนังที่แยกจาก แคลลัส ใบเลี้ยง และเซลล์แขวนลอย ตามลำดับ และขนาดของเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายน้อยที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ เล็กกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2

16. จากผลการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง ในอาหารเหลว สูตร 1/2 MS อายุ 2 วัน เซลล์ไร้ผนังในทั้ง 2 พันธุ์ เริ่มแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 เซลล์ โดยพันธุ์ฝ้ายน้อยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 ในส่วนของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากแคลลัสเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

1. เทคนิคของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องของเซลล์ไร้ผนัง จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและการเลี้ยง ความสำเร็จนั้นนอกจากขึ้นกับปัจจัยที่จำเป็น ยังขึ้นกับบุคคลที่ทำการศึกษาเนื่องจากเป็นงานที่ต้องอาศัยความละเอียด ใจเย็น ในช่วงการทำให้เซลล์ไร้ผนังบริสุทธิ์ การถ่ายเซลล์ไร้ผนังขณะปั่นแยก อาจมีผลทำให้เซลล์ไร้ผนังแตกได้ง่าย หรือแม้แต่การถ่ายระหว่างการเลี้ยงเป็นผลให้ความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ไร้ผนังลดลง ส่งผลเสียสืบเนื่องต่อการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์เพื่อพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ต่อไป

2. เนื่องจากเซลล์ที่ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยง แคลลัส และเซลล์แขวนลอย มีลักษณะองค์ประกอบภายในเซลล์ที่มีความหนาแน่นต่างกัน มองออกว่า มาจากส่วนใดยกเว้นเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสและเซลล์แขวนลอย ถึงแม้ยังไม่สามารถชักนำเซลล์ไร้ผนังให้พัฒนาเป็นต้นขึ้นมาได้ แต่การแยกเซลล์ไร้ผนัง จากฝ่ายทั้ง 2 พันธุ์ได้น่าจะเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับนำเทคนิคการรวมเซลล์ไร้ผนังมาใช้ศึกษาและประยุกต์ในเรื่องอื่น ๆ ต่อไป