บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การปลูกฝ้ายเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์

ปลูกฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ซึ่งเป็นฝ้ายพื้นเมืองของเอเชีย (Asiatic cotton) เป็นพวก diploid ในสภาพธรรมชาติ เพื่อเก็บเมล็ดไว้ขยายพันธุ์และศึกษาลักษณะทางกายภาพ รวมทั้งเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฝ้ายในสภาพปลอดเชื้อเพื่อนำชิ้นส่วนฝ้ายที่เหมาะสมไปชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยง

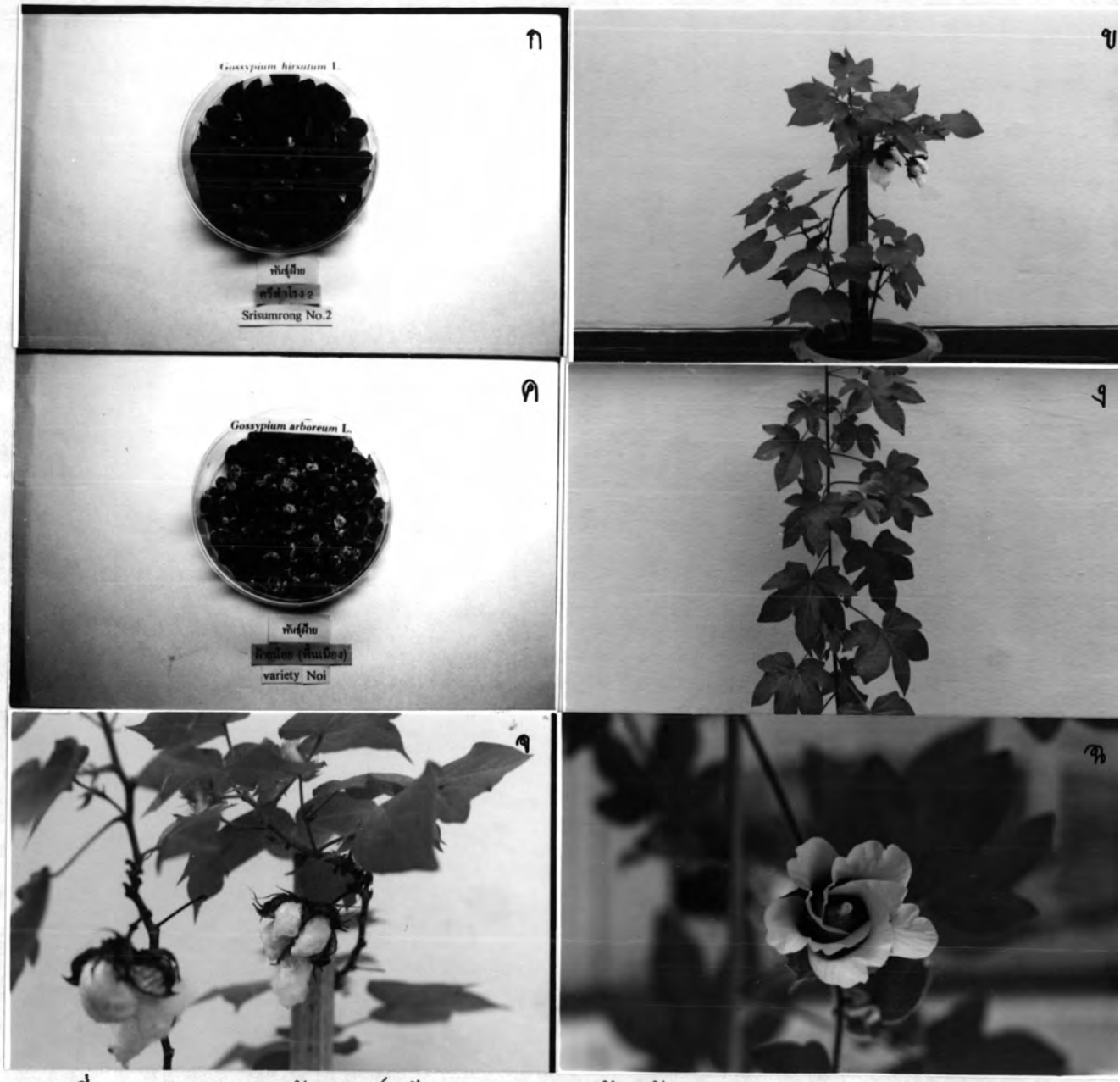
3.1.1 การปลูกฝ้ายเพื่อขยายพันธุ์

เพาะเมล็ดพันธุ์ฝ้าย (ตามวิธีข้อ 2.4.1) ลงกระถาง แล้วนำไปวางให้ได้รับแสงแดดไม่จัดหนัก คือ ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ติดตามการเจริญเติบโต จนกระทั่งเก็บเมล็ดพันธุ์ได้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ตารางที่ 3 ,รูปที่ 1) ของพันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเรื่องของลักษณะใบ สมอ และเมล็ด แต่ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นฝ้ายเป็นไปทำนองเดียวกัน พบว่า ลำต้นฝ้ายจะขึ้นตรง มีกิ่งก้านสาขาแตกออกมาจากลำต้นทรงต้นโปร่ง หลังจากฝ้ายงอกแล้วประมาณ 40-50 วัน จะเกิดดอกขึ้น ดอกฝ้ายจะเริ่มบานตอนเช้าเมื่อได้รับแสงแดด มีสีขาวครีม เมื่อดอกเริ่มบาน หลังจากนั้น 1 วัน สีของดอกเปลี่ยนไปเป็นสีชมพูและร่วงหลุดไป เมื่อเกิดการผสมละอองเกสร เกิดสมอฝ้ายอ่อนขึ้นมา หลังจากนั้น 35-50 วัน สมอจะแตกพร้อมที่จะเก็บเมล็ดที่มีเส้นใยติดปกคลุมอยู่ ได้ศึกษาติดตามการพัฒนาส่วนต่าง ๆ ของฝ้าย พบว่า พันธุ์ฝ้ายน้อยเจริญได้ดีกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 เนื่องจากไม่ค่อย

ตารางที่ 3 ลักษณะของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

ศรีสำโรง 2	ฝ้ายน้อย
1. ใบมี 3 แฉก	1. ใบมี 5-7 แฉก
2. สมอกลม	2. สมอกลมแบน
3. ใต้ใบบริเวณเส้นกลางใบ ใต้ริ้วประดับมีต่อมน้ำหวาน	3. ใต้ใบบริเวณกลางใบ ใต้ริ้วประดับมีต่อมน้ำหวาน
4. มี gossypol ที่ใบฝ้ายด้านล่างก้านใบ กลีบรองดอก สมอ	4. มี gossypol ที่ใบฝ้ายด้านล่างก้านใบ กลีบรองดอก สมอ
5. ใบสีเขียวเข้ม, มีขนน้อย	5. ใบสีเขียวอ่อน, มีขนมาก
6. เมล็ดทางด้านโคนแหลมมากมีสีน้ำตาล ขนาดเมล็ดเล็ก	6. เมล็ดทางด้านโคนแหลมน้อย มีสีน้ำตาล ขนาดเมล็ดเล็กกว่า



รูปที่ 1 ลักษณะของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

ก. เมล็ดฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2

ข. ต้นฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 ใบจะเห็นมี 3 แฉก เป็นส่วนใหญ่

ค เมล็ดฝ้ายน้อย

ง. ต้นพันธุ์ฝ้ายน้อย ใบจะเห็นมี 5-7 แฉก

จ. ลักษณะสมอฝ้าย ระยะที่เก็บเอาฝ้ายทั้งปุยที่มีเมล็ดติดอยู่

ฉ. ลักษณะดอกต้นฝ้ายน้อย

ประสบปัญหาเรื่องแมลงมารบกวนเหมือนพันธุ์ศรีสำโรง 2

3.1.2 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฝ้ายปลอดเชื้อ

เตรียมเมล็ดพันธุ์ฝ้าย (ตามวิธีข้อ 2.4.1) และฟอกฆ่าเชื้อ (2.4.2) เพาะเลี้ยงบนวุ้นความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

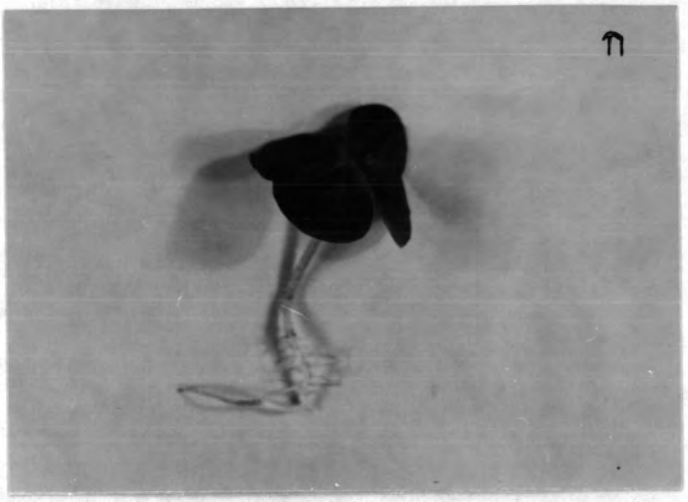
ลักษณะต้นอ่อนฝ้ายอายุ 7 วัน (รูปที่ 2) มีใบเลี้ยงจะคลี่ออกเต็มที่ ส่วนไฮโปคอทิลยืดยาวออก ในพันธุ์ศรีสำโรง 2 ใบเลี้ยงมีสีเขียวเข้ม ใบเลี้ยงหนา ส่วนของไฮโปคอทิลอวบ เมื่อเทียบกับฝ้ายน้อยที่มีใบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนกว่าและส่วนไฮโปคอทิลค่อนข้างบาง ต้นอ่อนฝ้าย (seedling) เมื่อเลี้ยงต่อไปในสภาวะเช่นนี้ใบเลี้ยงจะค่อย ๆ เหลืองไปในที่สุด

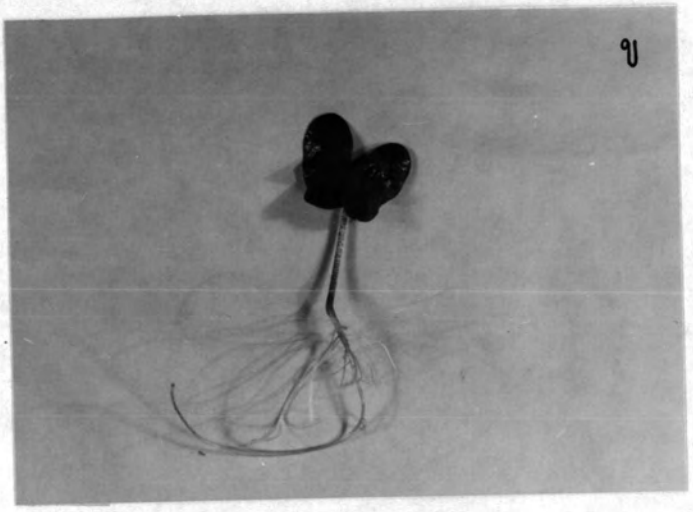
3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยง คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) และแหล่งคาร์บอน (carbon source)

3.2.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ทำการเตรียมเนื้อเยื่อฝ้ายส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล (ตามวิธีข้อ 2.9) เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ใช้น้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ NAA ในระดับ 0, 1, 2, 3, 4, 5 มก./ล. 2,4-D ในระดับ 0, 0.05, 0.1, 0.15 มก./ล. ใช้ร่วมกับสาร-





รูปที่ 2 ลักษณะต้นอ่อนฝ้ายอายุ 7 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงในวุ้นที่ อุณหภูมิ 25±2 °ช. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

ก. ศรีสำโรง 2

ข. ฝ้ายน้อย

ควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ kinetin ในระดับ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 มก./ล. zeatin ในระดับเดียวกับ kinetin และ kinetin, zeatin ในระดับเดียวกัน คือ 0, 0.1, 0.5 มก./ล. สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ. ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (% callusing) และสังเกตลักษณะทางกายภาพของแคลลัส (morphology of callus) เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

3.2.1.1 <u>ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส</u>

<u>ฝ้ายศรีสำโรง</u> 2 แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยงและส่วนของ-ไฮโปคอทิล ที่ได้จากการชักนำในอาหาร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 แล้วแปรผันความเข้มข้นของ NAA, 2,4-D และ kinetin, zeatin (ตารางที่ 4,5 และรูปที่ 3,4) นั้นแคลลัสจากชิ้นส่วนของไฮโปคอทิลจะมีอัตราการเจริญสูงกว่าแคลลัสส่วนของใบเลี้ยง โดยชิ้นส่วนใบเลี้ยงให้แคลลัสเมื่อเสริมด้วยความ NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.คิดเป็น 80 % และที่ความเข้มข้นของสารควบคุมที่แตกต่างไปกว่านี้จะให้การเจริญของแคลลัสเช่นกัน แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำกว่า เมื่อเปลี่ยนไปใช้สารควบคุมการเจริญกลุ่มไซโตไคนิน เป็น zeatin ปริมาณ 0.1-2 มก./ล. พบว่า ส่วนใหญ่ของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจะให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุดดีกว่าเมื่อใช้ kinetin อย่างเด่นชัด ความเข้มข้นของ zeatin ที่ทำ-ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุดมีค่าต่ำกว่า kinetin ในอาหารเพาะเลี้ยง คือ ที่ NAA 2 มก./ล. และ zeatin 0.1 มก./ล.ให้แคลลัส 80 % ขณะที่เมื่อใช้ 2,4-D ต่อ kinetin และ zeatin ปริมาณ 0.1 ต่อ 0.5 (มก./ล.) มีผลให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุดถึง 75 และ 70 % ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ในระดับต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง ของฝ้ายศรีสำโรง 2 เจริญบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อกัน

ก. เมื่อใช้ NAA : kinetin และ zeatin

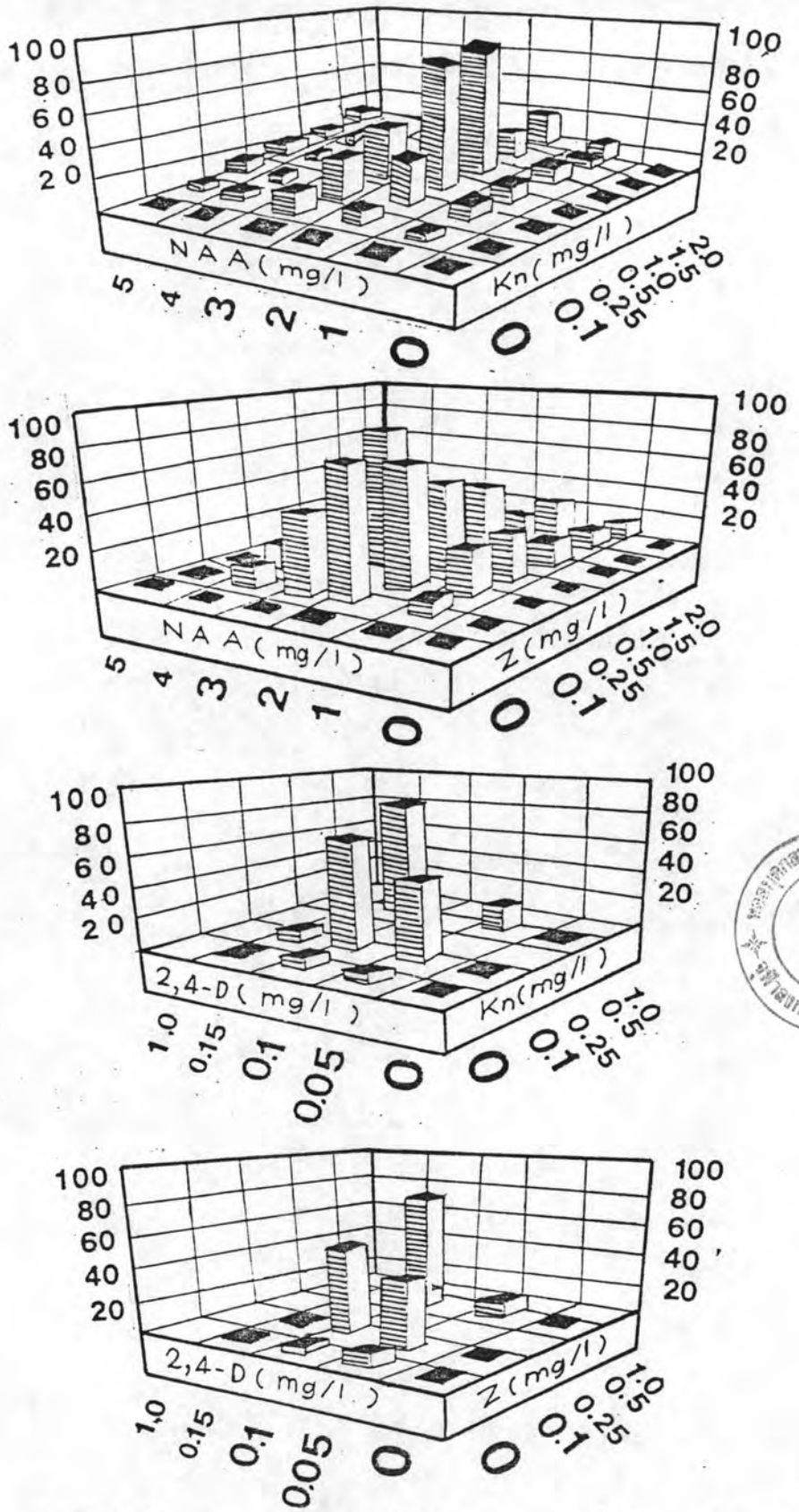
Cytokinin / Auxin	Kinetin (mg/l)							Zeatin (mg/l)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2
NAA(mg/l) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	5	10	10	15	5	15	0	10	25	30	15	10	10
2	0	10	40	75	80	25	35	0	80	80	45	40	15	25
3	0	20	35	35	25	10	10	0	50	45	80	50	65	40
4	0	10	5	5	10	15	10	0	15	15	25	10	0	0
5	0	10	10	5	10	5	10	0	0	0	0	0	0	0

ข. เมื่อใช้ NAA : kinetin และ zeatin

Cytokinin / Auxin	Kinetin (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
	0	0.1	0.5	0	0.1	0.5
2,4-D (mg/l) 0	0	0	0	0	0	0
0.05	5	55	15	10	40	10
0.1	5	70	75	5	55	70
0.15	0	5	10	0	0	5

จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส(%) = $\frac{\text{จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่ใช้เมื่อเริ่มทดลอง}^*}$ x100

* โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อขวดละชิ้นโดยใช้จำนวนตัวอย่างสภาวะละ 20 ขวด



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์แคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 เมื่อมีอัตราส่วนของ NAA ต่อ kinetin และ zeatin ปริมาณต่างๆในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ในระดับต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอทิลของฝ้ายศรีสำโรง 2 เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

ก. เมื่อใช้ NAA : kinetin และ zeatin

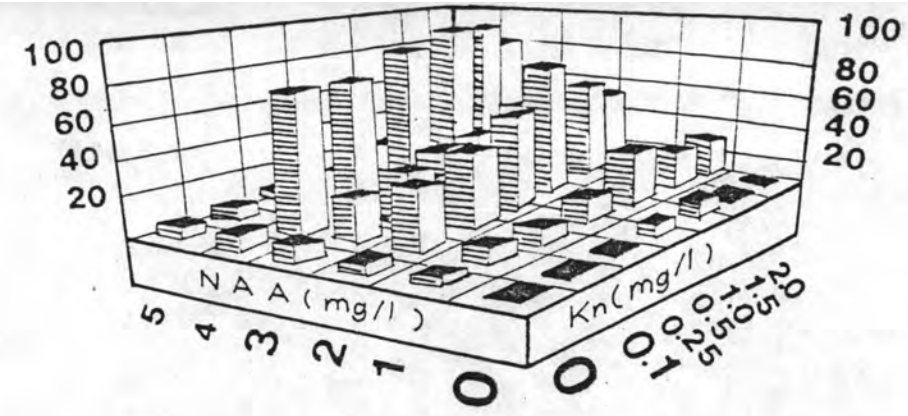
Cytokinin / Auxin	Kinetin (mg/l)							Zeatin (mg/l)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2
NAA (mg/l) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	10	15	15	30	20	20	10	35	30	25	15	5	5
2	5	35	40	55	65	50	45	5	35	20	20	25	40	30
3	10	25	25	30	35	30	25	5	40	35	50	50	45	40
4	15	70	65	75	85	80	65	10	25	80	90	75	25	20
5	10	10	5	10	15	10	5	20	20	20	15	5	10	5

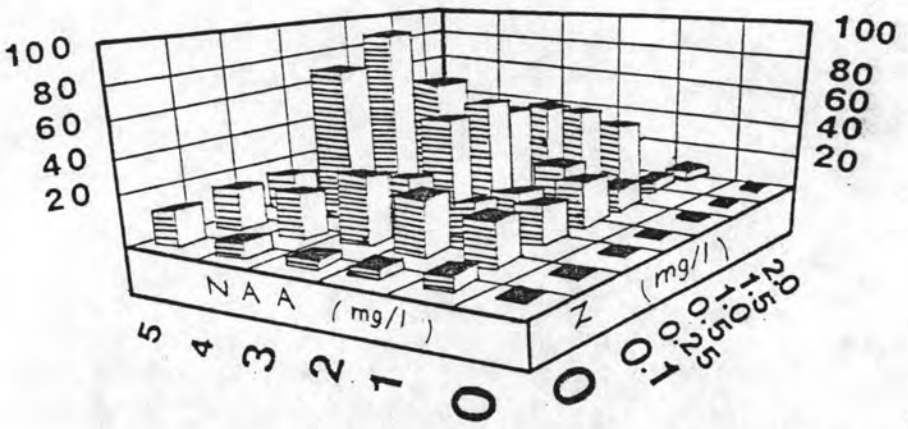
ข. เมื่อใช้ 2,4-D : kinetin และ zeatin

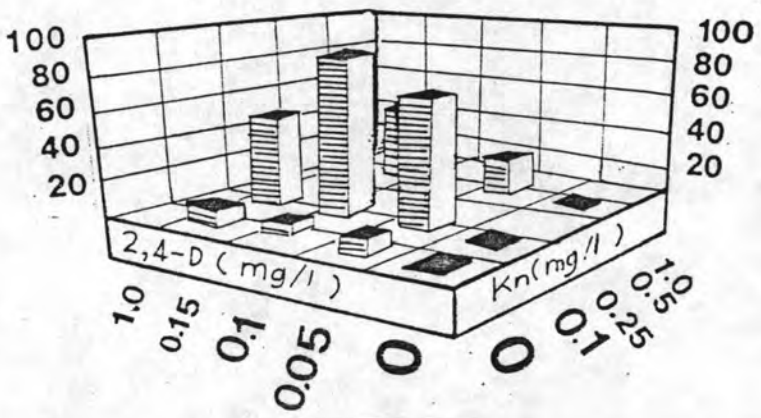
Cytokinin / Auxin	Kinetin (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
	0	0.1	0.5	0	0.1	0.5
2,4-D (mg/l) 0	0	0	0	0	0	0
0.05	10	75	20	10	60	20
0.1	5	80	85	10	70	80
0.15	10	45	35	10	30	25

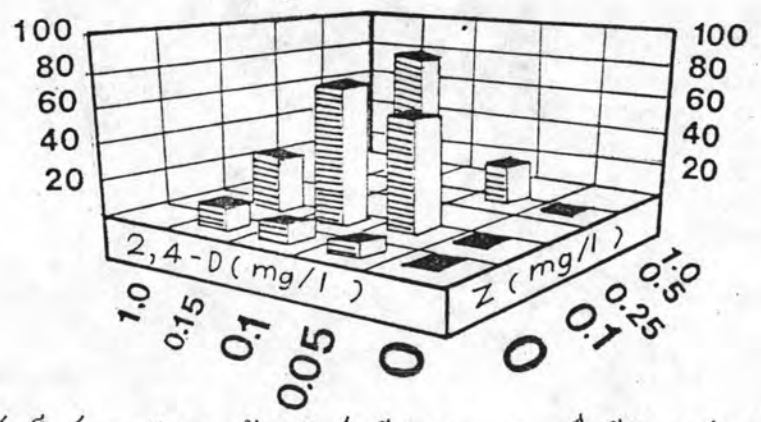
จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส(%) = $\frac{\text{จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่ใช้เมื่อเริ่มทดลอง*}} \times 100$

* โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อชวดละชิ้นโดยใช้จำนวนตัวอย่างสภาวะละ 20 ชวด









รูปที่ 4 เปอร์เซ็นต์แคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 เมื่อมีอัตราส่วนของ 2,4-D ต่อ kinetin และ zeatin ปริมาณต่างๆในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสจากไฮโปคอทิลที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สำหรับส่วนไฮโปคอทิล เมื่อใช้ NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ให้แคลลัสสูงสุดถึง 85 %โดยที่ NAA 4 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล.ให้แคลลัสสูงสุด คือ 90 % เมื่อใช้ 2,4-D ต่อ kinetin และ zeatin ปริมาณ 0.1 ต่อ 0.5 (มก./ล.) ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุด คือ 85 และ 80 % ตามลำดับ

<u>ฝ้ายน้อย</u> การทดลองให้ผลคล้ายกับศรีสำโรง 2 (ตารางที่ 6,7 และรูปที่ 5,6) กล่าวคือ ส่วนใบเลี้ยงที่เจริญในอาหารเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของ NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ให้แคลลัส 85 % และ NAA 2 มก./ล. และ zeatin 0.1 มก./ล.ให้แคลลัส 85 % เมื่อเปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินเป็น 2,4-D แทน NAA พบว่า 2,4-D ต่อ zeatin ปริมาณ 0.1 ต่อ 0.5 (มก./ล.) ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุด คือ 90 และ 80 % ตามลำดับ

ส่วนแคลลัสที่เกิดจากส่วนไฮโปคอทิลเมื่อใช้ NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.ให้แคลลัสสูงสุดคือ 95 % ส่วน NAA ต่อ kinetin ปริมาณ 4 ต่อ 0.5 (มก./ล.) ให้แคลลัสสูงสุด คือ 80 % ขณะที่ 2,4-D ต่อ kinetin และ zeatin ปริมาณ 0.1 ต่อ 0.5 (มก./ล.) ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงสุด คือ 95 และ 85 % ตามลำดับ

3.2.1.2 <u>ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะภายนอกของแคลลัส</u>

เกี่ยวกับลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นจากลักษณะภายนอก เมื่อใช้สารกลุ่มออกซิน(NAA และ 2,4-D)และกลุ่มไซโตไคนิน (kinetin และ zeatin) เป็นดังนี้

ตารางที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในระดับต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายน้อยเจริญบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

ก. เมื่อใช้ NAA : kinetin และ zeatin

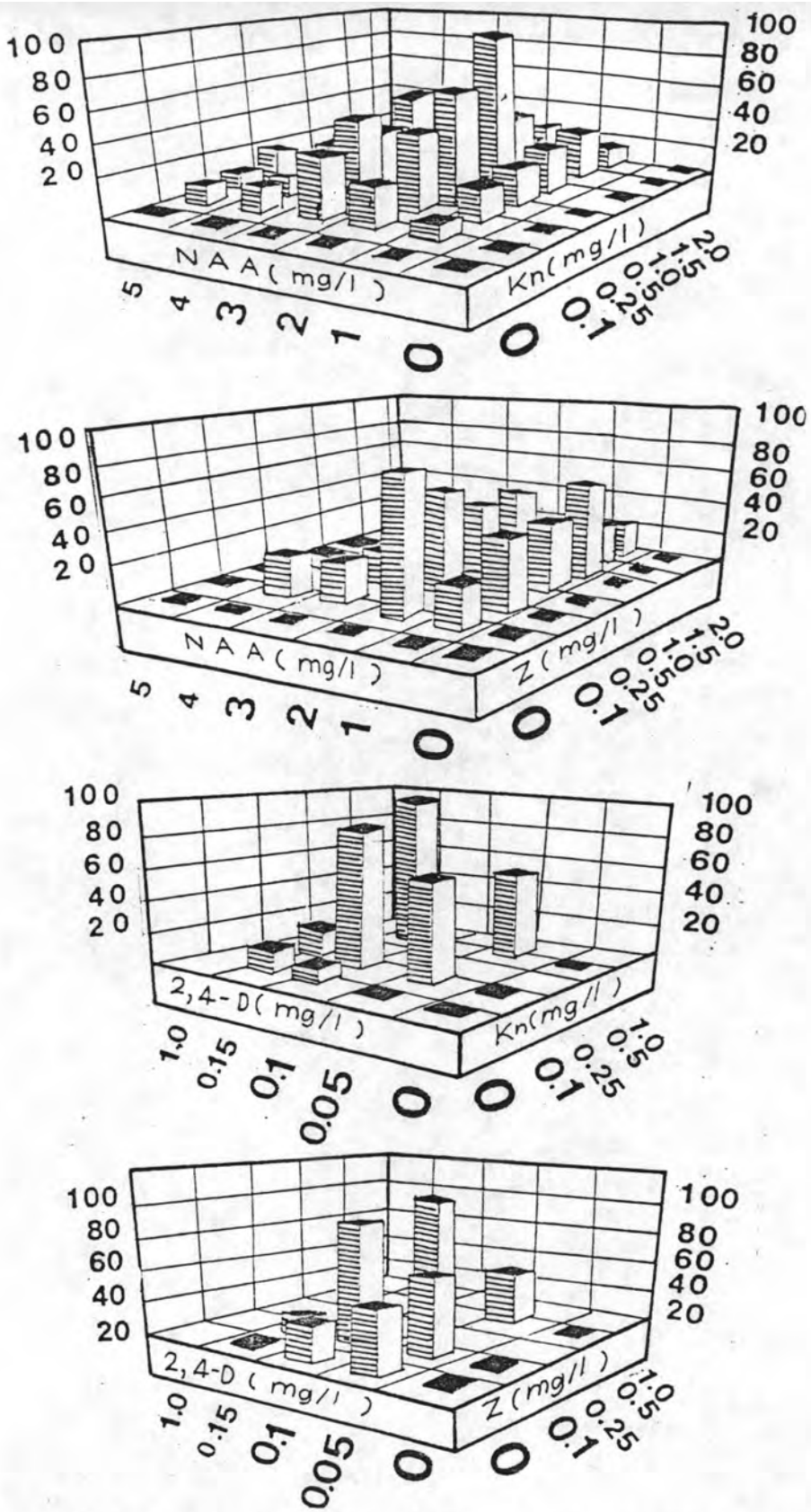
Cytokinin / Auxin	Kinetin (mg/l)							Zeatin (mg/l)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	0	0.1	0.2	0.5	1	1.5	2
NAA (mg/l) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	15	20	30	30	25	10	0	30	45	40	50	20	20
2	0	30	45	70	85	30	20	0	85	70	55	45	40	30
3	0	40	50	35	45	40	30	0	30	35	50	60	55	55
4	0	20	15	25	10	20	25	0	25	10	20	40	10	15
5	0	15	10	20	15	10	10	0	0	0	0	0	0	0

ข. เมื่อใช้ 2,4-D : kinetin และ zeatin

Cytokinin / Auxin	Kinetin (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
	0	0.1	0.5	0	0.1	0.5
2,4-D (mg/l) 0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	60	50	40	50	50
0.1	10	80	90	20	75	80
0.15	15	20	20	0	10	10

จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส (%) = $\frac{\text{จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่ใช้เมื่อเริ่มทดลอง}^*} \times 100$

* โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อขวดละชิ้นโดยใช้จำนวนตัวอย่างสภาวะละ 20 ขวด



รูปที่ 5 เปอร์เซ็นต์แคลลัสของฝ้ายน้อย เมื่อมีอัตราส่วนของ NAA ต่อ kinetin และ zeatinปริมาณต่างๆในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จากส่วนใบเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในระดับต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอทิลของฝ้ายน้อย เจริญบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

ก. เมื่อใช้ NAA : kinetin และ zeatin

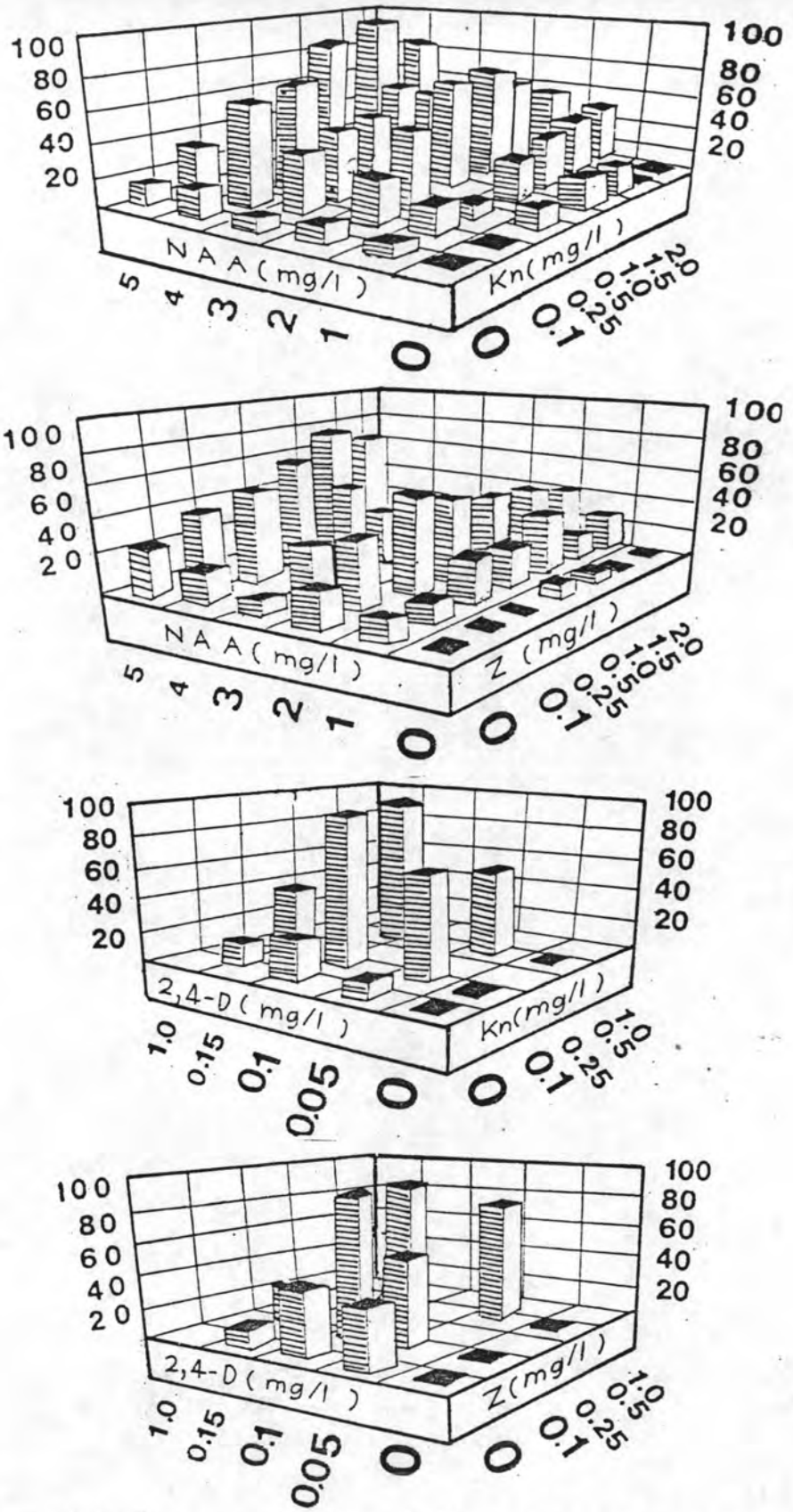
Cytokinin / Auxin		Kinetin (mg/l)							Zeatin (mg/l)						
		0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	0	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2
NAA(mg/l)	0	0	0	15	20	15	0	0	0	0	0	10	5	0	0
	1	10	20	10	25	30	30	35	20	15	25	20	30	15	20
	2	15	35	45	60	65	65	50	25	40	55	50	50	45	30
	3	10	40	45	45	40	40	40	10	35	60	30	25	30	15
	4	25	65	70	80	95	95	60	20	60	70	80	70	50	40
	5	15	30	20	30	25	25	20	35	40	20	55	45	25	10

ข. เมื่อใช้ 2,4-D : kinetin และ zeatin

Cytokinin / Auxin		Kinetin (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
		0	0.1	0.5	0	0.1	0.5
2,4-D (mg/l)	0	0	0	0	0	0	0
	0.05	15	65	50	40	55	70
	0.1	25	85	95	40	80	85
	0.15	20	40	30	10	30	45

จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส(%) = $\frac{\text{จำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่ใช้เมื่อเริ่มทดลอง}^{*}} \times 100$

* โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อขวดละชิ้นโดยใช้จำนวนตัวอย่างสภาวะละ 20 ขวด



รูปที่ 6 เปอร์เซ็นต์แคลลัสของฝ้ายน้อยเมื่อมีอัตราส่วนของ2,4-D ต่อ kinetin และ zeatin ปริมาณต่าง ๆ ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนไฮโปคอทิล ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

พันธุ์ศรีสำโรง 2 แคลลัสที่ชักนำมาจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงเมื่อใช้ NAA ต่อ kinetin ที่อัตราส่วนต่างกัน จะให้แคลลัสที่เริ่มเกิดบริเวณขอบชิ้นส่วนของใบเลี้ยงก่อน แล้วจึงค่อยเจริญเต็มชิ้นส่วนโดยแคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์ค่อนข้างแน่น (semicompact) มีสีเขียวออกเหลือง ค่อนข้างชุ่มน้ำ มักจะเกิดสีน้ำตาลที่อาหารบริเวณใกล้ชิ้นส่วนของใบเลี้ยง เนื่องจากมีการปล่อยสารพวกฟีนอลิค (phenolic) ออกมา และเมื่อใช้ NAA ร่วมกับ zeatin ลักษณะของแคลลัสที่เกิดภายนอกก็เช่นเดียวกัน แต่ชนิดของแคลลัสที่พบมีสีเหลืองออกแดง เมื่อใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin และ zeatin แคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวมและฟู (friable callus) ชุ่มน้ำ มีสีเหลืองน้ำตาล

ส่วนไฮโปคอทิลของพันธุ์ศรีสำโรง 2 นั้น เมื่อใช้ NAA ร่วมกับ kinetin และ zeatin ที่อัตราส่วนต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนไฮโปคอทิลจะเริ่มพอง แคลลัสเริ่มเกิดได้ในทุกบริเวณของชิ้นส่วน การเกาะกลุ่มของแคลลัสค่อนข้างหลวม มีสีเขียวอ่อน สีเขียวออกเหลือง สีเหลืองน้ำตาล สีเหลืองออกแดง การเจริญรวดเร็วกว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของใบเลี้ยง เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่ค่อยพบการปล่อยสารฟีนอลิคของชิ้นส่วนพืช ส่วนเมื่อใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin และ zeatin แคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวมมากขึ้น แคลลัสมีสีเหลือง สีเหลืองน้ำตาล

ฝ้ายน้อย เมื่อใช้ส่วนใบเลี้ยง โดยมี NAA ร่วมกับ kinetin และ zeatin ที่อัตราส่วนต่างกัน พบว่า รูปแบบการเกิดแคลลัสเช่นเดียวกันกับพันธุ์ศรีสำโรง 2 แต่การเกาะกลุ่มของเซลล์แน่นมากกว่า แคลลัสมีสีเขียว สีเขียวเหลือง สีขาว ชุ่มน้ำน้อยกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 และเมื่อใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin และ zeatin อัตราส่วนต่างกัน แคลลัสมีการเกาะกลุ่มของเซลล์ค่อนข้างหลวมและชุ่มน้ำ

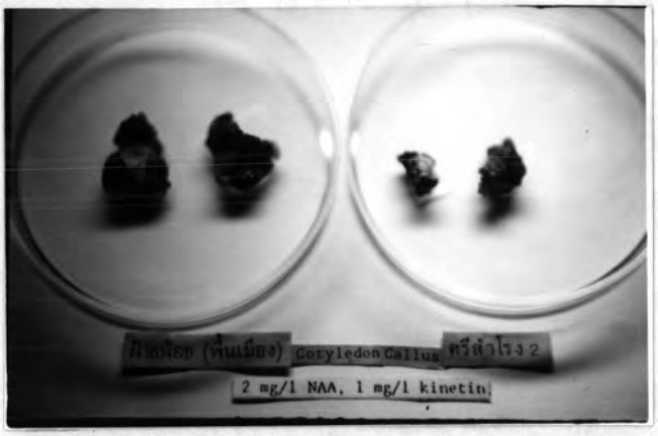
สำหรับส่วนไฮโปคอทิล เมื่อใช้ NAA กับ kinetin เป็นสารกระตุ้นการเจริญ พบว่า การเกาะกลุ่มของแคลลัสแน่นกว่าส่วนใบเลี้ยง แคลลัสมีสีเขียว ส่วนไฮโปคอทิลเมื่อใช้ NAA กับ zeatin การเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม ชุ่มน้ำ แคลลัสมีสีเขียวอ่อน, สีเขียวเหลือง เมื่อใช้ 2,4-D กับ kinetin และ zeatin การเกาะกลุ่มของเซลล์หลวมมากกว่าเมื่อใช้ NAA กับ kinetin และ zeatin ไม่พบการปล่อยสารฟีนอลิคในฝ้ายน้อยออกมาจากชิ้นส่วนพืชทั้งใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล ลักษณะทางกายภาพของแคลลัสที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 7-14)

3.2.2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อนำส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยมาเลี้ยงให้เจริญบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ปรากฏว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะในแต่ละส่วนของพืช โดยการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ น้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลเป็นไปดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่า เมื่อใช้ส่วนใบเลี้ยงของพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสจะมีสีเขียวการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม และแคลลัสจะมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นเร็วกว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้จากไฮโปคอทิลก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (รูปที่ 16) ดังนั้น กลูโคสน่าจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่าซูโครส

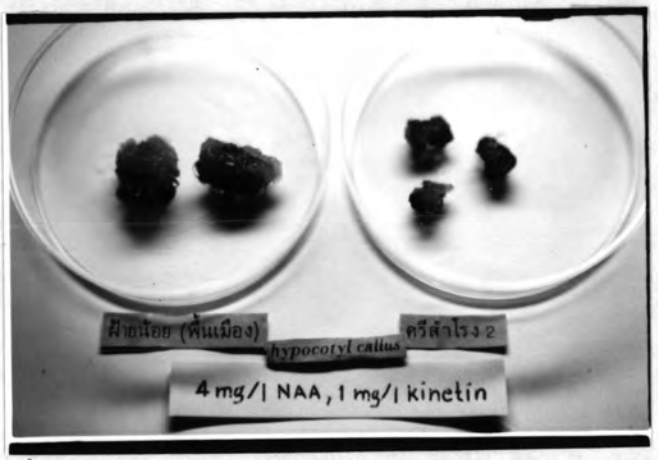
3.3 ผลการจำแนกชนิดของแคลลัส

เนื่องจากที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลซึ่งแคลลัสที่ได้มีลักษณะต่างๆ มากมายหลายแบบ ดังนั้นจึงจำเป็นต้อง



รูปที่ 7 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 2 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มีแสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ต่อวัน อายุ 4 สัปดาห์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลในฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ในที่มีแสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 9 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล.และ kinetin 0.1 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ช.ในที่มีแสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 10 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลในฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล.และ kinetin 0.1 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25±2 °ช.ในที่มีแสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 11 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 2 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 12 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลในฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 4 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์

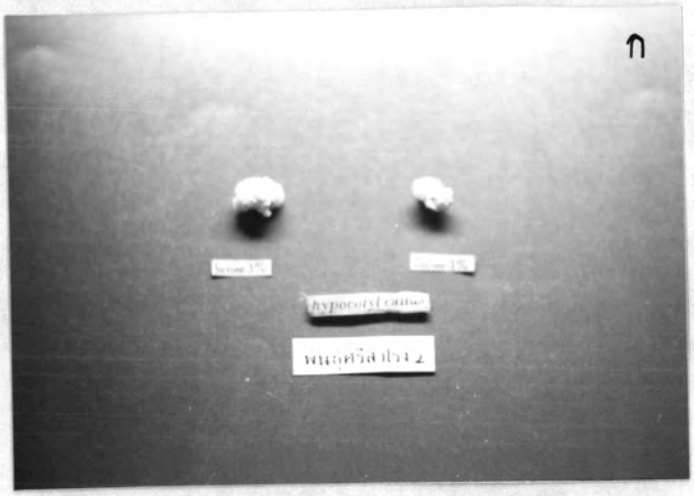
รูปที่ 13 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยงอายุ 4 สัปดาห์

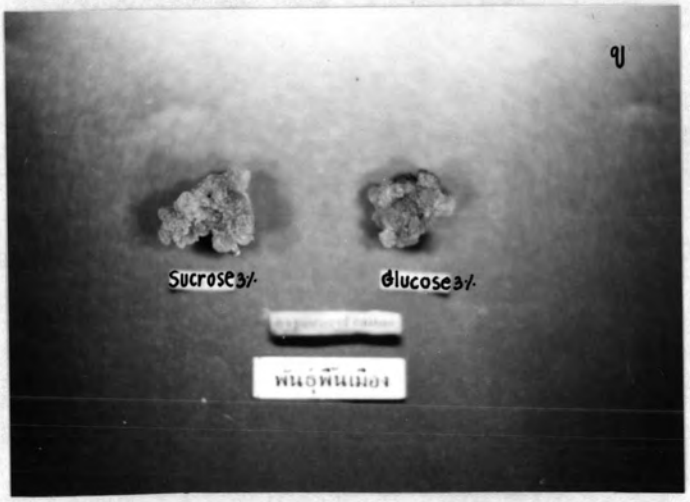
รูปที่ 14 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลในฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 15 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้าย เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.โดยใช้กลูโคสและซูโครส 3 % เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน อายุ 4 สัปดาห์

ก. ศรีสำโรง 2

ข. ฝ้ายน้อย





รูปที่ 16 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลของฝ้าย เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรMS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.โดยใช้กลูโคสและซูโครส 3 %เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน อายุ 4 สัปดาห์

ก. พันธุ์ศรีสำโรง 2

ข. พันธุ์ฝ้ายน้อย

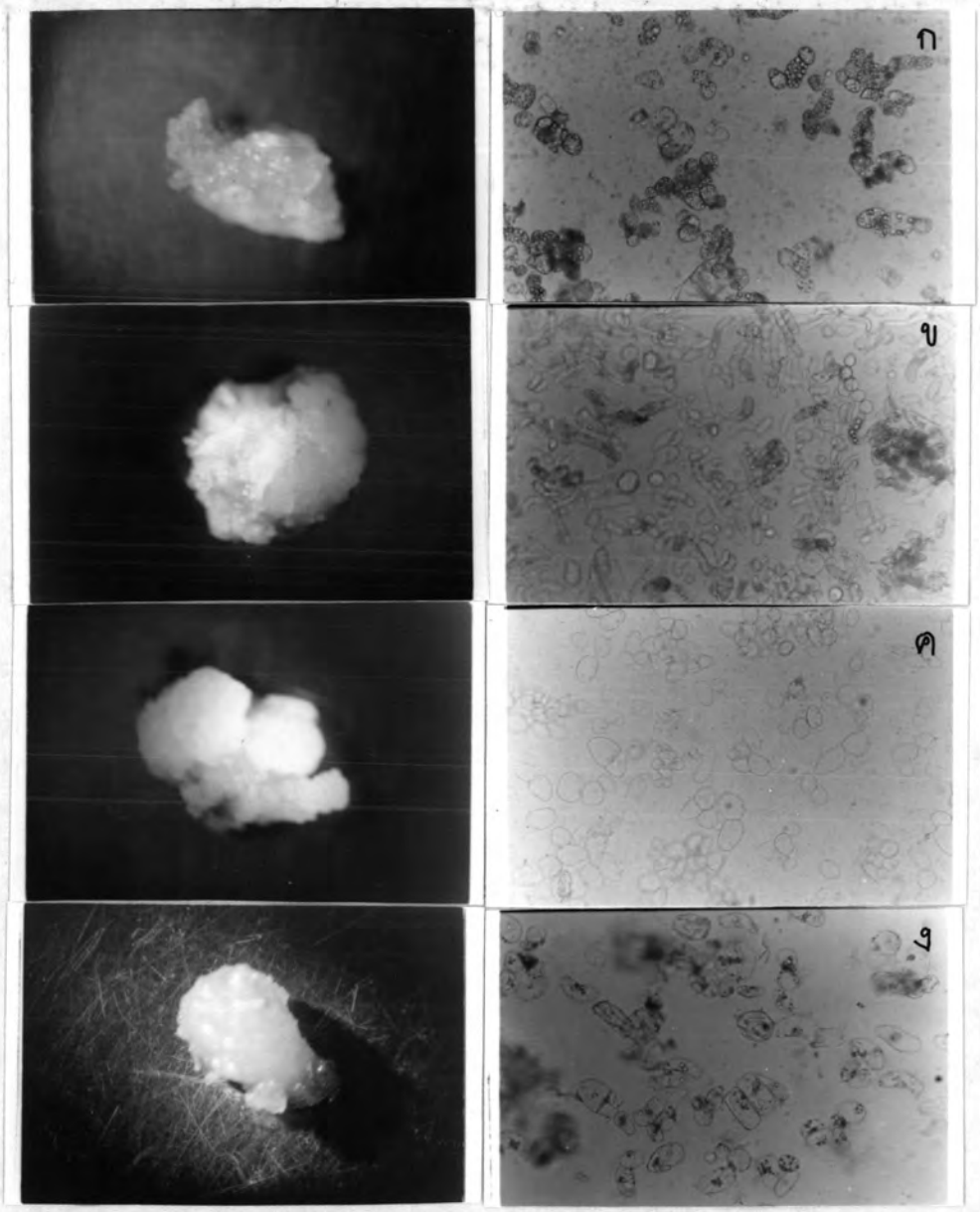
ทำการศึกษาลักษณะบางประการ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการคัดเลือกแคลลัสที่คาดว่าเหมาะสมกับการชักนำให้กลับเป็นต้นใหม่ได้ โดยนำมาตรวจสอบลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามัญ ผลการทดลอง (รูปที่ 17) แสดงให้เห็นลักษณะความแตกต่างของแคลลัสที่ได้จากเนื้อเยื่อฝ้าย 4 สัปดาห์ คือ

ก. กลุ่มแคลลัสที่มีสีเขียวและเขียวเหลือง ที่เกิดจากการนำชิ้นส่วนของใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลมาเจริญบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เสริมด้วย NAA กับ kinetin ในปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละชิ้นส่วนพืชนั้น เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สามัญกำลังขยาย 10 เท่า พบว่าองค์ประกอบภายในเซลล์หนาแน่น มีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวมากมาย รูปร่างเซลล์มีลักษณะกลม (round cell) เป็นส่วนใหญ่ มีบางเซลล์ที่รูปร่างรี (eliptrical cell) และยาว (elongated cell)

ข. กลุ่มแคลลัสที่มีสีเหลืองแดง เป็นแคลลัสที่กระตุ้นให้เจริญด้วย NAA กับ zeatin จากชิ้นส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล องค์ประกอบภายในเซลล์ไม่หนาแน่นมีเม็ดคลอโรพลาสต์เล็กน้อย บางเซลล์มีสีแดง รูปร่างเซลล์ยาวเป็นส่วนใหญ่

ค. กลุ่มแคลลัสที่มีสีขาว เป็นแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D กับ kinetin และ zeatin ภายในเซลล์จะใส ไม่มีเม็ดคลอโรพลาสต์ รูปร่างเซลล์กลมและรูปรี

ง. กลุ่มแคลลัสที่มีสีเหลืองน้ำตาล นอกจากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D กับ kinetin และ zeatin จะให้แคลลัสที่มีสีขาว แล้วยังพบแคลลัสที่มีสีเหลืองน้ำตาลเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายในเซลล์มีองค์ประกอบต่าง ๆ น้อยและมีสีน้ำตาล ส่วนรูปร่างเซลล์ มีทั้งกลม ยาวรี กระจายปะปนกัน



รูปที่ 17 ชนิดของแคลลัสและลักษณะเซลล์ที่ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 50 เท่า)

ก. แคลลัสที่มีสีเขียว-เขียวเหลือง เซลล์มีองค์ประกอบหนาแน่น มีรูปร่างเซลล์ค่อนข้างกลม

ข. แคลลัสที่มีสีเหลืองแดง องค์ประกอบภายในเซลล์ไม่หนาแน่น รูปร่างเซลล์ยาว บางเซลล์มีสีแดง

ค. แคลลัสที่มีสีขาว ภายในเซลล์ใส เซลล์ค่อนข้างกลม

ง. แคลลัสที่มีสีน้ำตาล องค์ประกอบภายในเซลล์น้อย มีสีน้ำตาล รูปร่างเซลล์ยาวรี ค่อนข้างกลมกระจายปะปนกัน

ลักษณะของเซลล์ของแคลลัสที่ชักนำจากใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลในฝ่ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ่ายน้อยจะคล้ายกัน ขึ้นกับการเจริญในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญชนิดใด ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า แคลลัสที่เหมาะสมที่จะนำมาชักนำให้เกิดต้น คือ แคลลัสที่ชักนำให้เกิดขึ้นด้วย NAA กับ kinetin เนื่องจากมีองค์ประกอบภายในเซลล์ของแคลลัสหนาแน่น

3.4 รูปแบบและลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส

3.4.1 การเจริญในอาหารแข็ง

เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงและส่วนไฮโปคอทิลไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ในส่วนใบเลี้ยงเจริญในอาหารที่มี NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ส่วนไฮโปคอทิลเจริญบนอาหารที่มี NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. เก็บตัวอย่างแคลลัส (10 ขวด) นำไปหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งตามวิธีข้อ 2.13.1 (รูปที่ 18,19) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากส่วนไฮโปคอทิลในฝ่ายทั้งสองสูงกว่าส่วนใบเลี้ยง นอกจากนั้น ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่าฝ่ายน้อยจะมีอัตราการเจริญสูงกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 โดยที่ฝ่ายน้อยเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ส่วนศรีสำโรง 2 เจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4

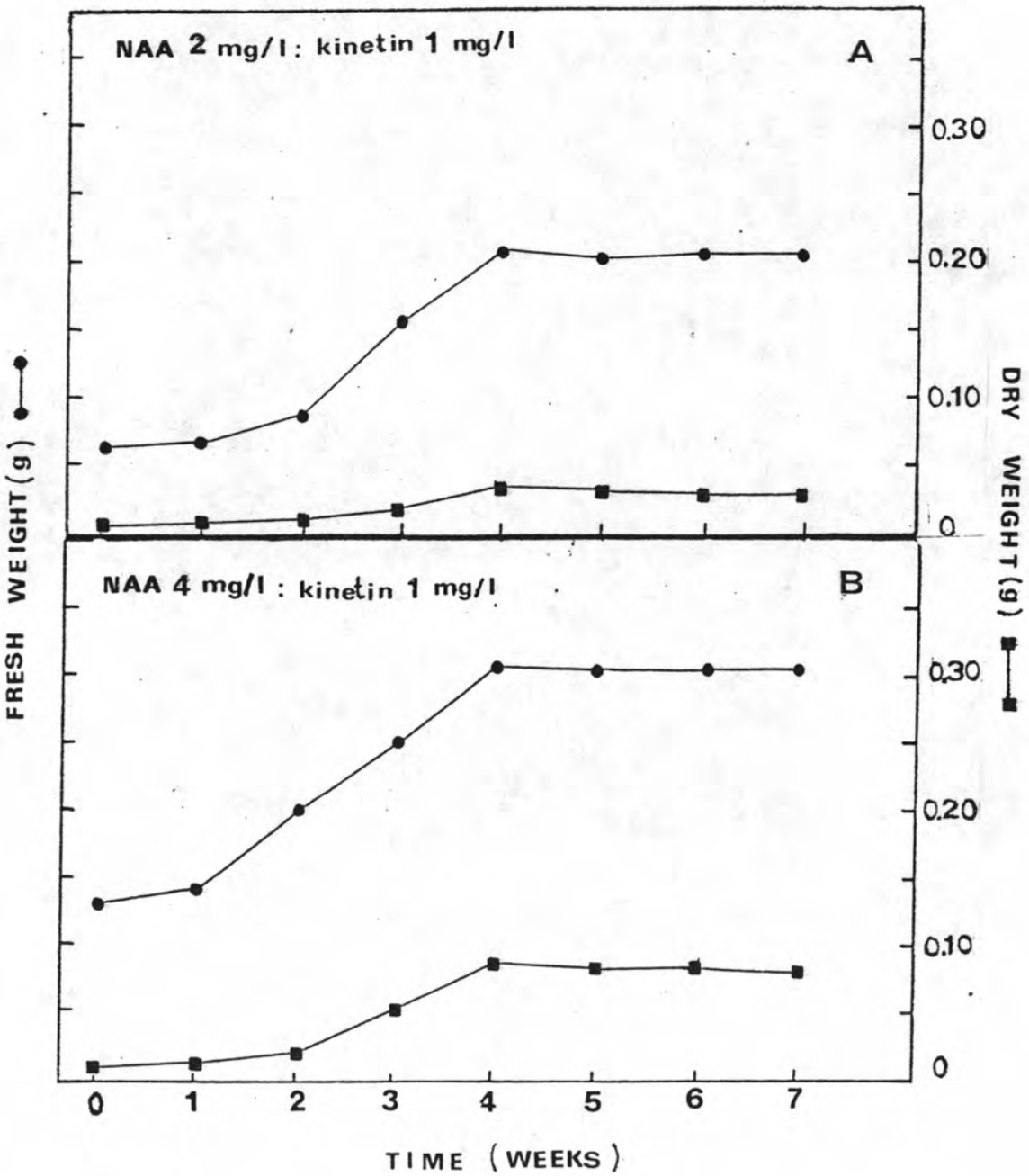
3.4.2 การเจริญในอาหารเหลว

การเจริญเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการเจริญในอาหารแข็ง คือ ฝ่ายน้อย จะให้น้ำหนักแห้งสูงสุดมากกว่าน้ำหนักแห้งของศรีสำโรง 2 นอกจากนี้ยังมีอัตราเจริญสูงสุดใน 3 สัปดาห์ ส่วนพันธุ์ศรีสำโรง 2 เจริญสูงสุดใน 4 สัปดาห์ (รูปที่ 20)

รูปที่ 18 ลักษณะการเจริญของแคลลัสในพันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2เมื่อเจริญบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ.ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

A. แคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยง เมื่อเสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.

B. แคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิล เมื่อเสริมด้วย NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.



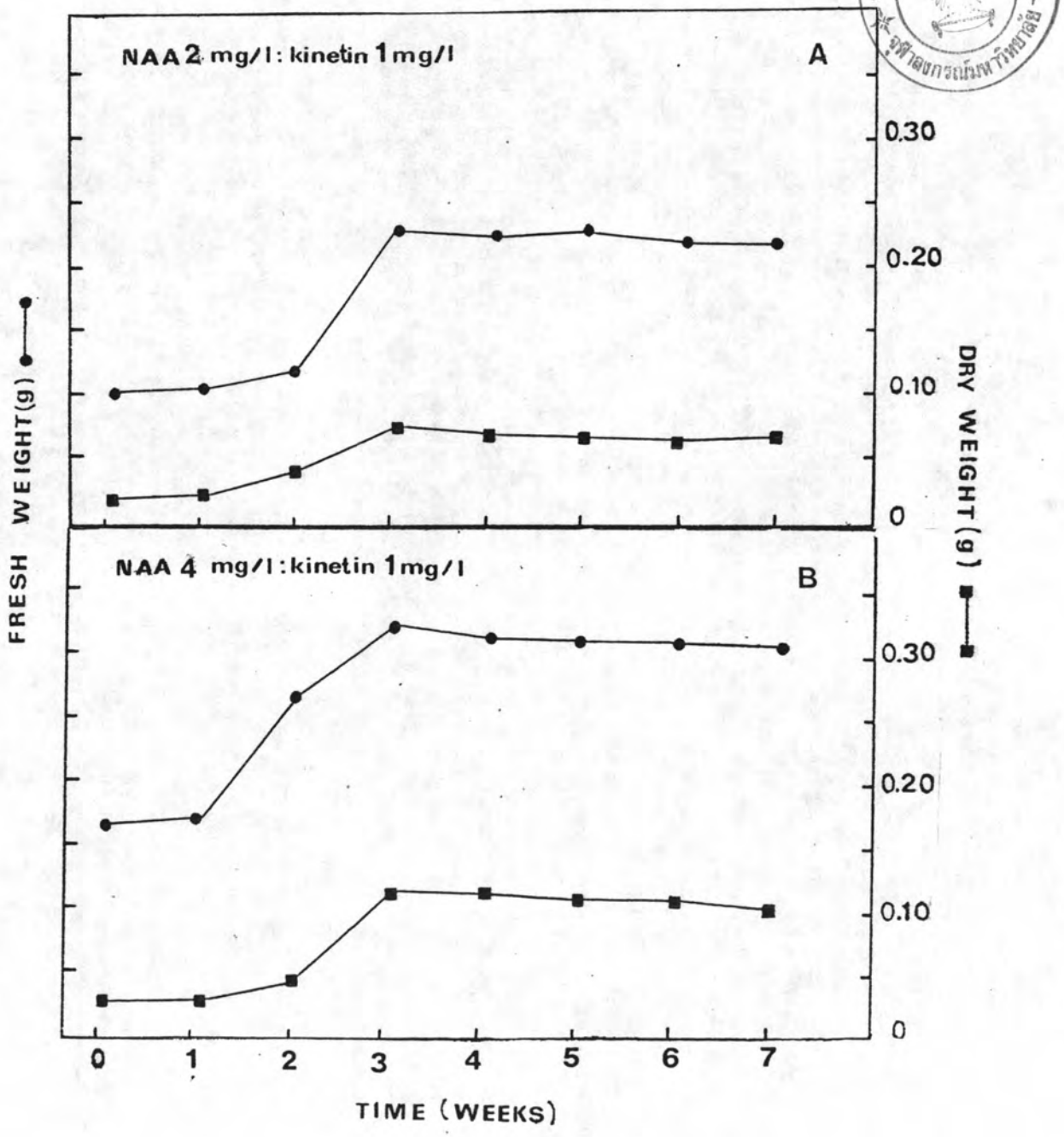
รูปที่ 19 ลักษณะการเจริญของแคลลัสในฝ้ายน้อย

เมื่อเจริญบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

A. แคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยง เมื่อเสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.

B. แคลลัสที่ชักนำจากส่วยไฮโปคอทิลเมื่อเสริมด้วย NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล.

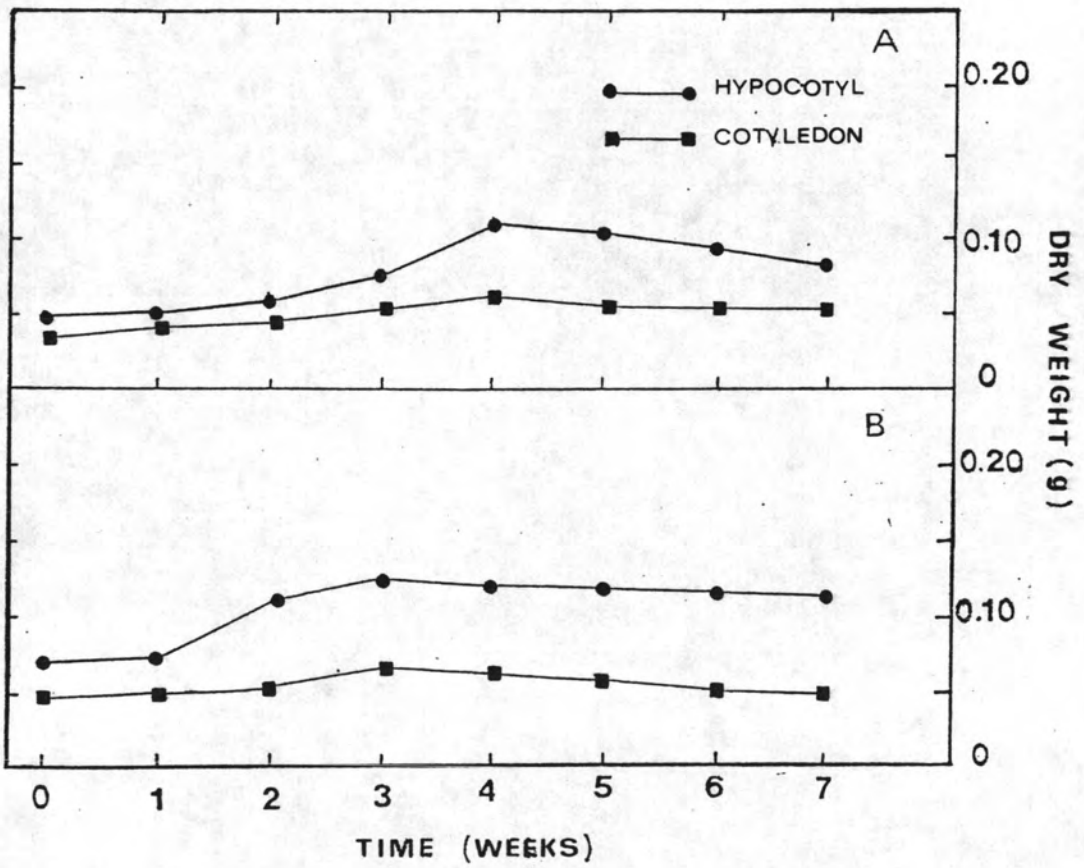
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ลักษณะการเจริญของเซลล์แขวนลอยในพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยเมื่อเจริญบนอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA:kinetin ปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในแต่ละชิ้นส่วนของพืช เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน

A. ศรีสำโรง 2

B. ฝ้ายน้อย



3.5 การชักนำให้เกิดต้น (plant regeneration)

นำแคลลัสที่ได้จากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลที่เจริญบนอาหาร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ร่วมกับ NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. (สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของใบเลี้ยง) และ NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. (สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของไฮโปคอทิล) โดยใช้แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ย้ายลงอาหารสูตรเดิม แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับทำการทดลองชุดควบคุมโดยไม่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอน ในสภาวะควบคุมเดิม หลังจากทำการเปลี่ยนอาหารนี้แล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดเป็นต้นต่อไป

การชักนำให้เกิดต้นผ่านทาง organogenesis โดยย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตรดัดแปลง MS (ไม่มี NH_4NO_3 แต่เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่า) เสริมด้วยกลูตามีน 15 มิลลิโมลาร์ แปรผันความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ในระดับ 0, 0.1, 0.5, 1 มก./ล. และเคซีนไฮโดรไลเซตระดับ 0, 50, 100, 150, 200, 250 มก./ล. ตามผลการทดลอง ในตารางที่ 8,9 และรูปที่ 21-23 ในอาหารแข็งที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส กลูตามีน 15 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วย kinetin 0.5 มก./ล.นั้น พบว่า แคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงของทั้งฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยเกิดรากขึ้น (7.1 และ 9.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) สำหรับแคลลัสจากส่วนไฮโปคอทิลของศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยเกิดรากได้ (9.6 และ 19.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) แคลลัสไม่สามารถพัฒนาให้ยอดได้ แต่ลักษณะแคลลัสจะมีจุดเขียวเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง เมื่อทำการตัดแบ่งชิ้นส่วนแคลลัสไปลงบนอาหารสูตรเดิม จำนวนรากเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีก น่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากในฝ้าย ส่วนสภาวะที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสแคลลัสไม่มีการพัฒนาเป็นยอดและราก

ตารางที่ 8 ผลการเกิดรากจากแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยที่ชักนำมาจากส่วนใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มีองค์ประกอบของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตต่างกันที่สภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง อายุ 3 สัปดาห์

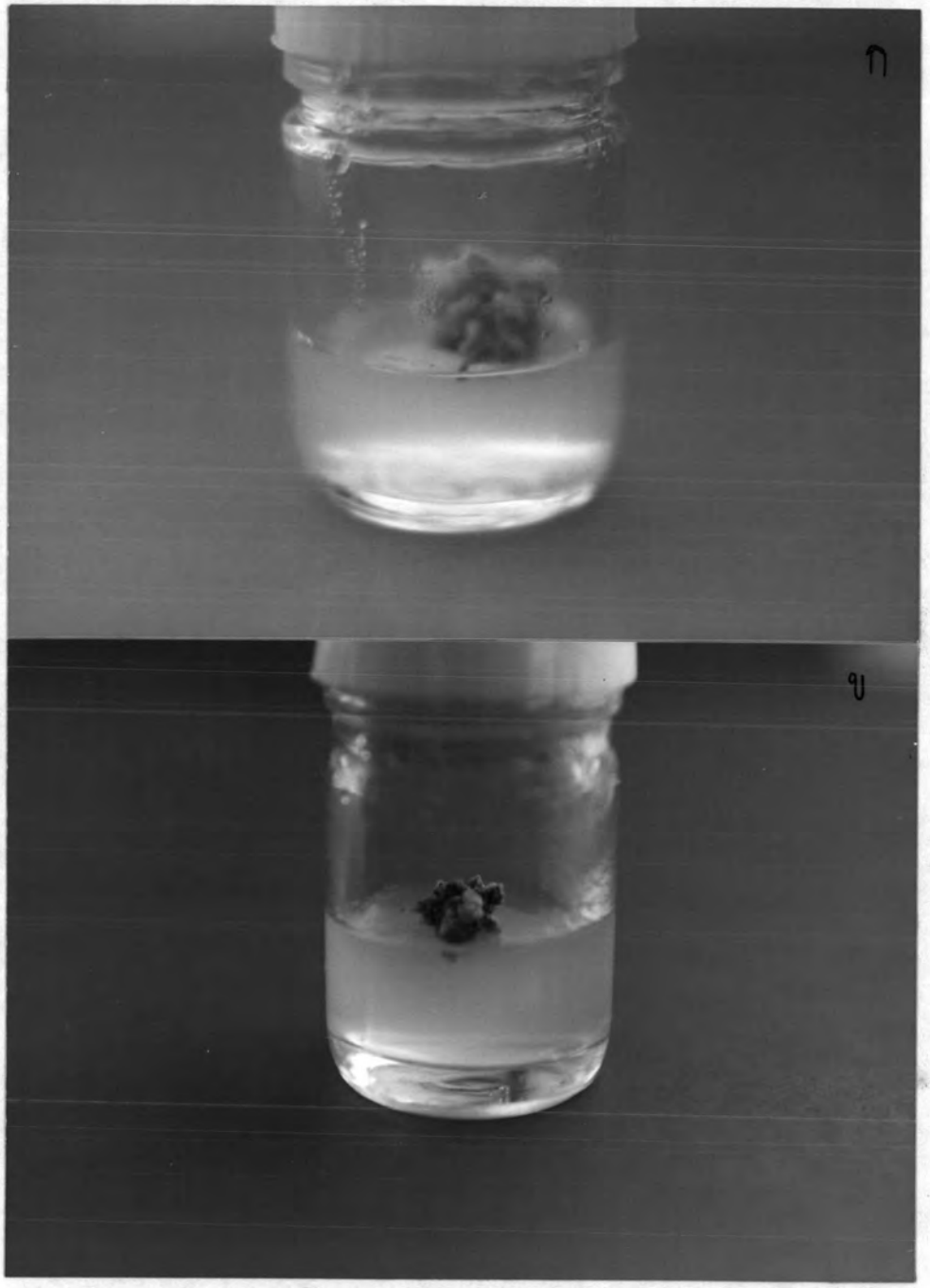
Cultivar	Hormone level (Kinetin)(mg/l)	Casein hydrolysate(mg/1)	Calli producing	
			Root(%)	Shoot(%)
Si Samrong 2	0	0	0	0
	0	50,100,150,200,250	0	0
	0.1	0	0	0
	0.1	50,100,150,200,250	0	0
	0.5	0	7.1	0
	0.5	50,100,150,200,250	0	0
	1.0	0	0	0
	1.0	50,100,150,200,250	0	0
Noi	0	0	0	0
	0	50,100,150,200,250	0	0
	0.1	0	0	0
	0.1	50,100,150,200,250	0	0
	0.5	0	0	0
	0.5	50,100,150,200,250	9.4	0
	1.0	0	0	0
	1.0	50,100,150,200,250	0	0

หมายเหตุ การทดลองเพาะเลี้ยงใช้จำนวนตัวอย่างอยู่ระหว่าง 40-50 ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 9 ผลการเกิดรากจากแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยที่ชักนำมาจาก ส่วนไฮโปคอทิลเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มีองค์ประกอบของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตต่างกัน ที่สภาวะมาตรฐานของ การเพาะเลี้ยง อายุ 3 สัปดาห์

Cultivar	Hormone level (Kinetin) (mg/l)	Casein hydrolysate(mg/1)	Calli producing	
			Root(%)	Shoot(%)
Si Samrong 2	0	0	0	0
	0	50,100,150,200,250	0	0
	0.1	0	0	0
	0.1	50,100,150,200,250	0	0
	0.5	0	9.6	0
	0.5	50,100,150,200,250	0	0
	1.0	0	0	0
	1.0	50,100,150,200,250	0	0
Noi	0	0	0	0
	0	50,100,150,200,250	0	0
	0.1	0	0	0
	0.1	50,100,150,200,250	0	0
	0.5	0	19.8	0
	0.5	50,100,150,200,250	0	0
	1.0	0	0	0
	1.0	50,100,150,200,250	0	0

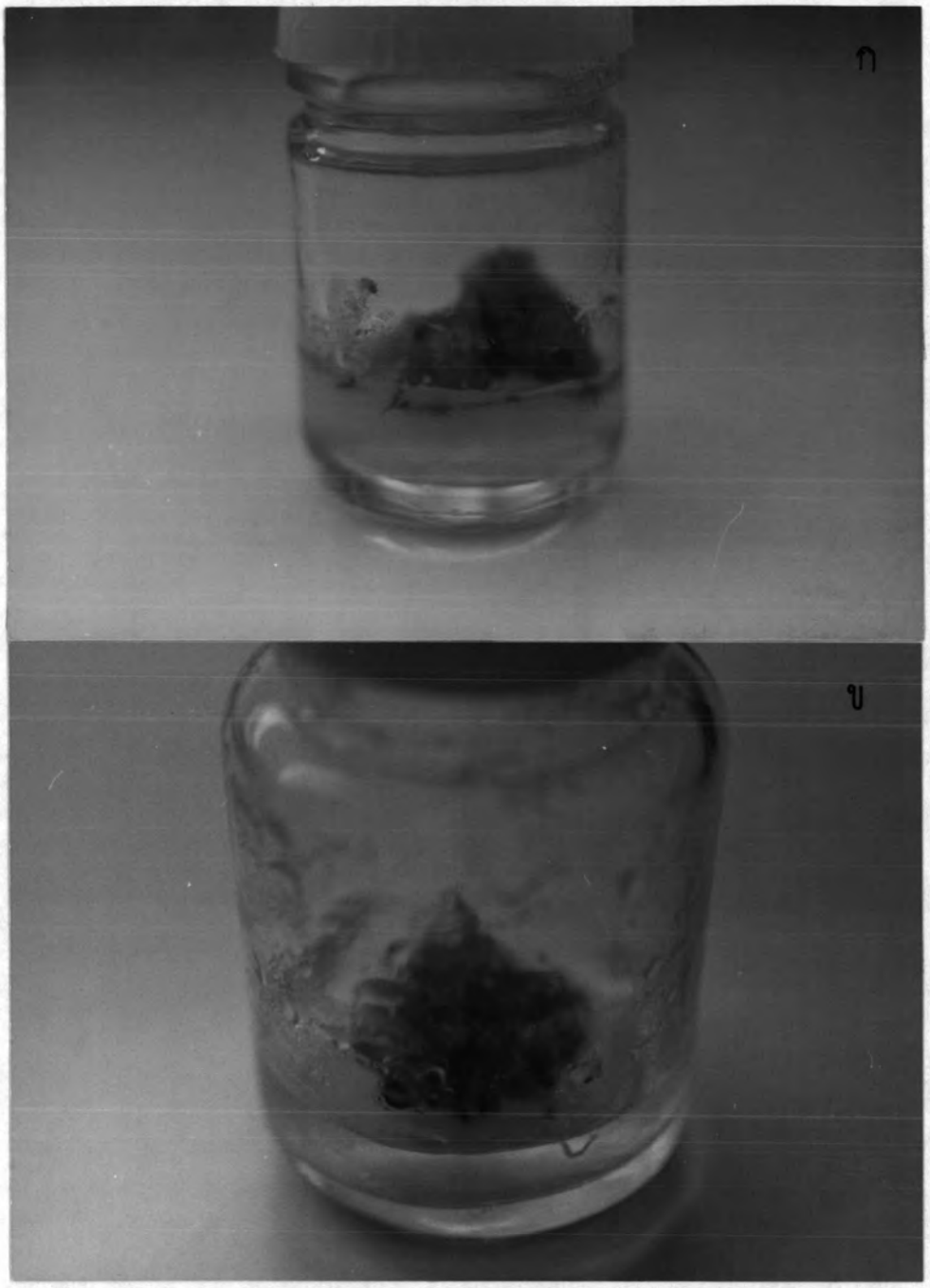
หมายเหตุ การทดลองเพาะเลี้ยงใช้จำนวนตัวอย่างอยู่ระหว่าง 40-50 ตัวอย่าง 3 ซ้ำ



รูปที่ 21 ลักษณะการเกิดรากในพันธุ์ศรีสำโรง 2 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี kinetin 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา16 ชั่วโมงต่อวันอายุ 3 สัปดาห์

ก. การเกิดรากของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของใบเลี้ยง

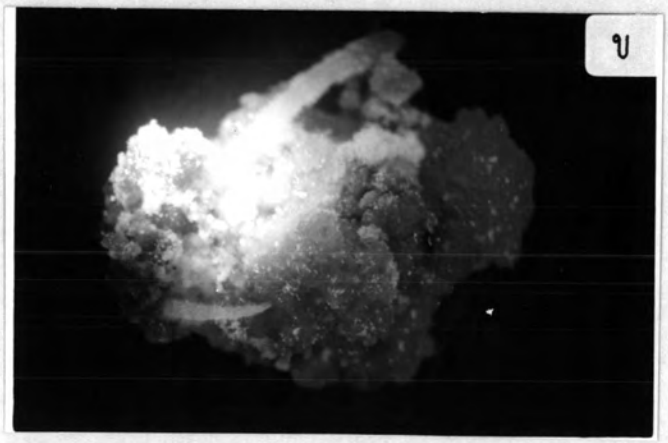
ข. การเกิดรากของแคลลัสที่ชักนำมาจากส่วนของไฮโปคอทิล



รูปที่ 22 ลักษณะการเกิดรากในฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี kinetin 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ให้แสงความเข้ม 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อายุ 3 สัปดาห์

ก. การเกิดรากของแคลลัสที่ชักนำมาจากส่วนของใบเลี้ยง

ข. การเกิดรากของแคลลัสที่ชักนำมาจากส่วนของไฮโปคอทิล



รูปที่ 23 ลักษณะการเกิดรากของฝ้ายจากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิล ถ่ายจากกล้องสเตอริโอ (กำลังขยายประมาณ 10 เท่า)

ก. ศรีสำโรง

ข. ฝ้ายน้อย

การชักนำให้เกิดต้นผ่านทาง embryogenesis ทำโดยย้ายแคลลัส (ตามวิธีข้อ 2.14.2) จากอาหารแข็งลงไปสู่อาหารเหลวที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ และแปรผันปริมาณ 2,4-D ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 5 มก./ล. เพื่อจะชักนำให้เกิดเป็นโซมาติคเอมบริโอ (somatic embryo) ในระยะแรก พบว่า เซลล์แคลลัสที่เจริญบนอาหารเหลวมีขนาดโตขึ้น มีสีเขียวเข้ม แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไปนาน ๆ แคลลัสจาก ส่วนของใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลในฝ่ายศรีสำโรง 2 มักจะเจริญช้าลงหรือไม่เจริญเลย กลายเป็นสีน้ำตาลภายใน 1-2 สัปดาห์ ส่วนแคลลัสจากส่วนของฝ่ายทั้ง 2 นี้ ในฝ่ายน้อยจะมีการเจริญอยู่ได้ตลอดหากใช้ 2,4-D ปริมาณ 0.1 มก./ล.โดยที่ความเข้มข้นของ 2,4-D สูงกว่านี้ คือ ระดับ 0.25, 0.5, 5 มก./ล. จะทำให้แคลลัสมีสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3

จากนั้น นำแคลลัสที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ปริมาณ 0.1 มก./ล. อายุ 4-6 สัปดาห์ ย้ายกลับสู่อาหารแข็งสภาวะเช่นเดียวกับการชักนำให้เกิดต้นผ่านทาง organogenesis และพบว่าแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งที่มี kinetin 0.5 มก./ล. จะขยายขนาดไปเรื่อย ๆ แคลลัสยังมีสีเขียวอยู่ ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอื่นที่มี kinetin 0.1, 1 มก./ล. หรือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแคลลัส จะค่อย ๆ เหลืองเป็นสีน้ำตาล ไม่สามารถเกิดยอดและรากได้

ผลของการเสริมด้วยเคซีนไฮโดรไลเซตปริมาณต่าง ๆไม่มีผลต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดและราก แต่ทำให้แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมีสีน้ำตาลเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเซต

3.6 การแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซมภายในเซลล์รากฝ้าย

จากการศึกษาระยะการแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซมของรากที่เพาะในสภาพปลอดเชื้ออายุ 7 วัน และรากที่ได้จากการชักนำให้เกิดขึ้นโดยการเพาะเลี้ยงผ่านทาง organogenesis อายุ 7 วัน หลังจากที่รากงอกออกมาจากแคลลัส ทำการย้อมเซลล์รากฝ้าย (ข้อ 2.15) พบระยะการแบ่งตัวของเซลล์รากฝ้ายทั้ง 2 คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 24,25) คือ ระยะ early prophase, middle prophase, metaphase, anaphase สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจนในระยะ metaphase เทียบกับรายงานจำนวนโครโมโซมของพืช Gossypium hirsutum L. มีจำนวนโครโมโซม 2N=4X=52 แท่ง และ G. arboreum มีจำนวนโครโมโซม 2N=2X=26 แท่ง (Barrow และคณะ, 1978) ผลการทดลอง (รูปที่ 26) จะเห็นว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 (G. hirsutum L.) มีจำนวนแท่งของโครโมโซมที่ตรวจนับได้ประมาณ 48-52 แท่ง และพันธุ์ฝ้ายน้อย (G. arboreum L.) มีจำนวนแท่งโครโมโซม 26 แท่ง ซึ่งตรวจนับได้ใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้

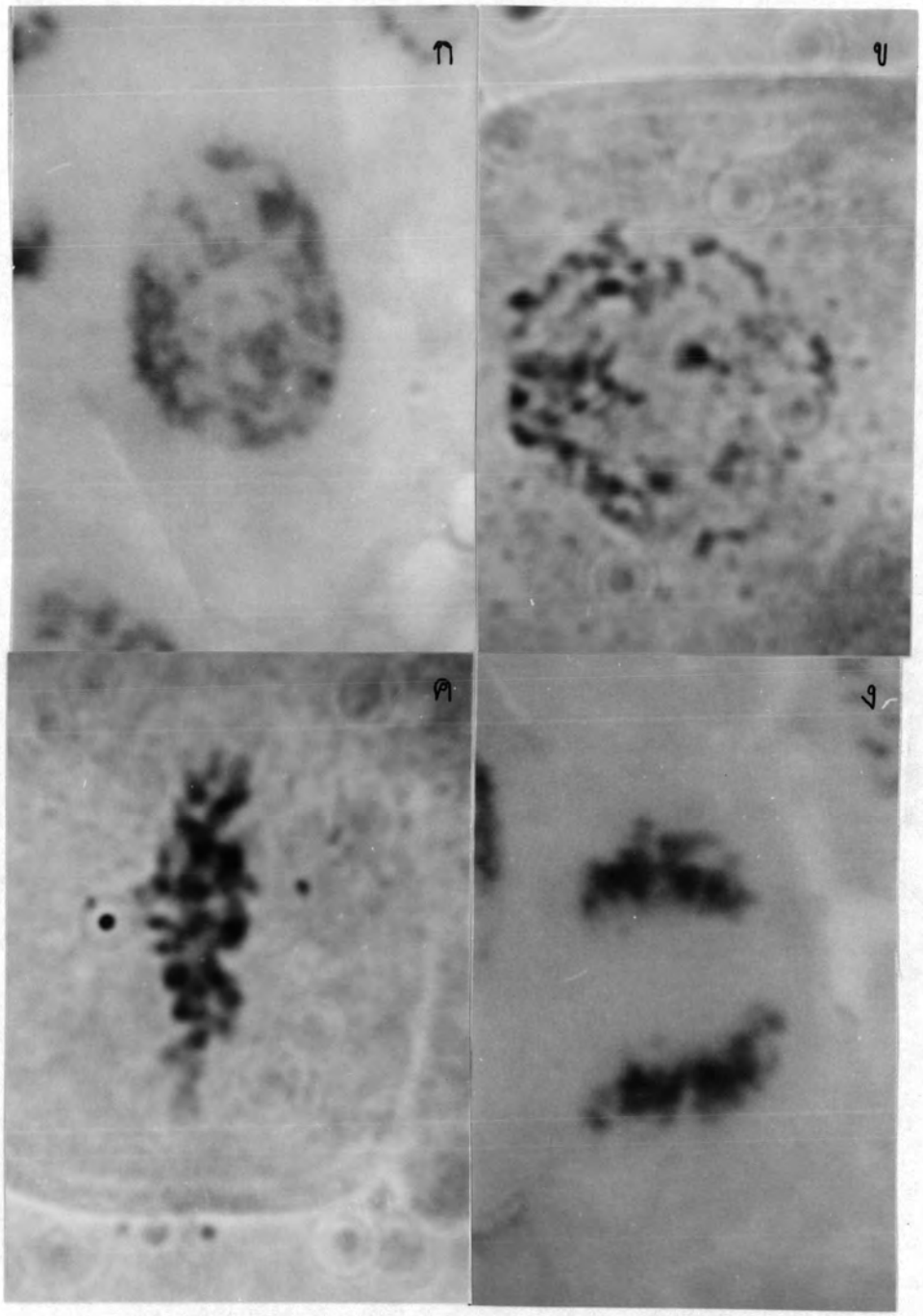
3.7 การแยกเซลล์ไร้ผนัง (protoplast isolation)

3.7.1 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์ไร้ผนังจากใบเลี้ยง

เตรียมส่วนของใบเลี้ยง (ข้อ 2.17.1) ของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย นำไปแยกเซลล์ไร้ผนังและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังสูงสุด จากการตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.7.1.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

จากการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase R10 ช่วง 0-3 % และ macerozyme R10 ช่วง 0-0.7 % (ผลการทดลองจาก-



รูปที่ 24 แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์รากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (กำลังขยาย 500 เท่า)

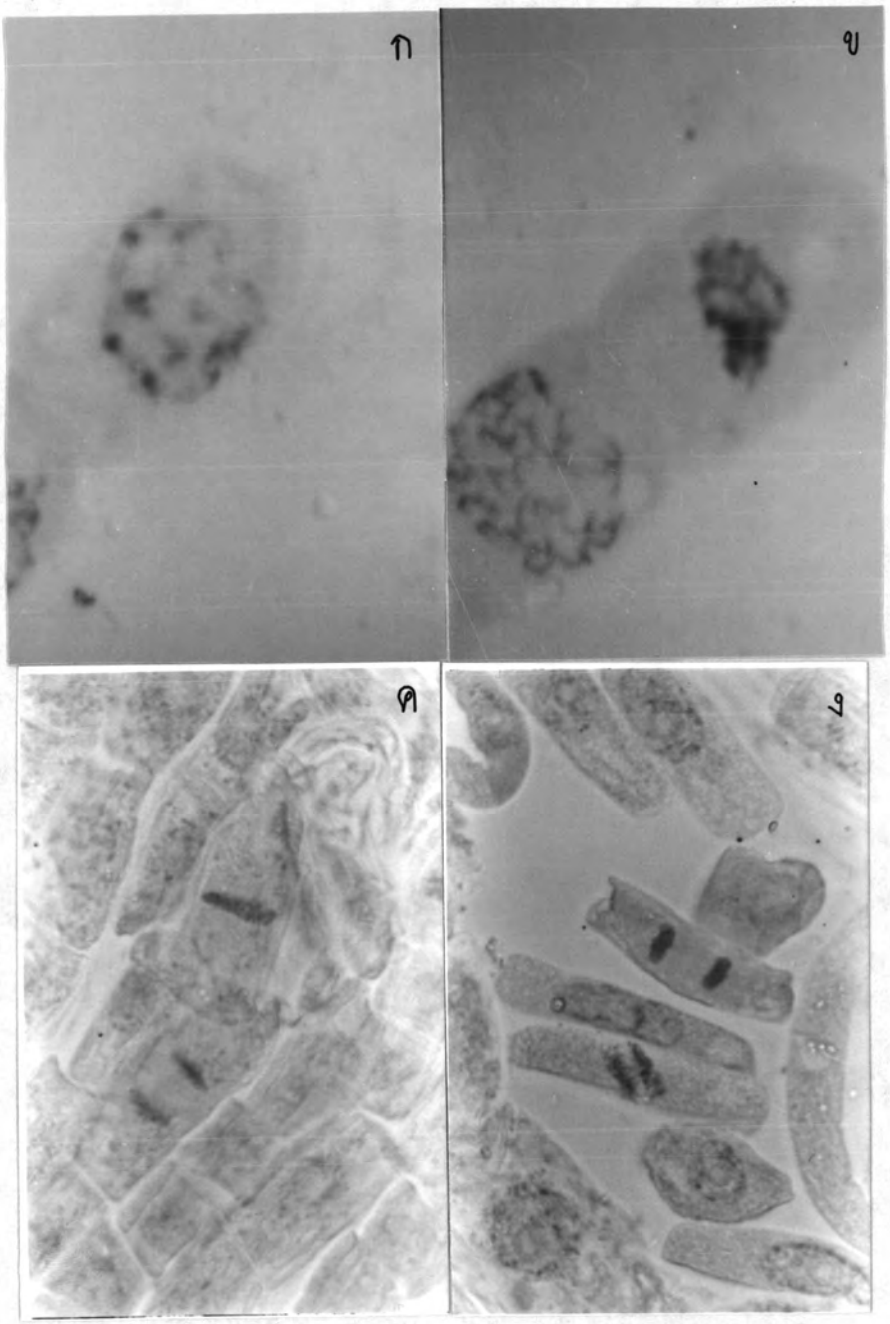
ก. ระยะ early prophase

ข. ระยะ middle prophase

ค. ระยะ metaphase

ง. ระยะ anaphase

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



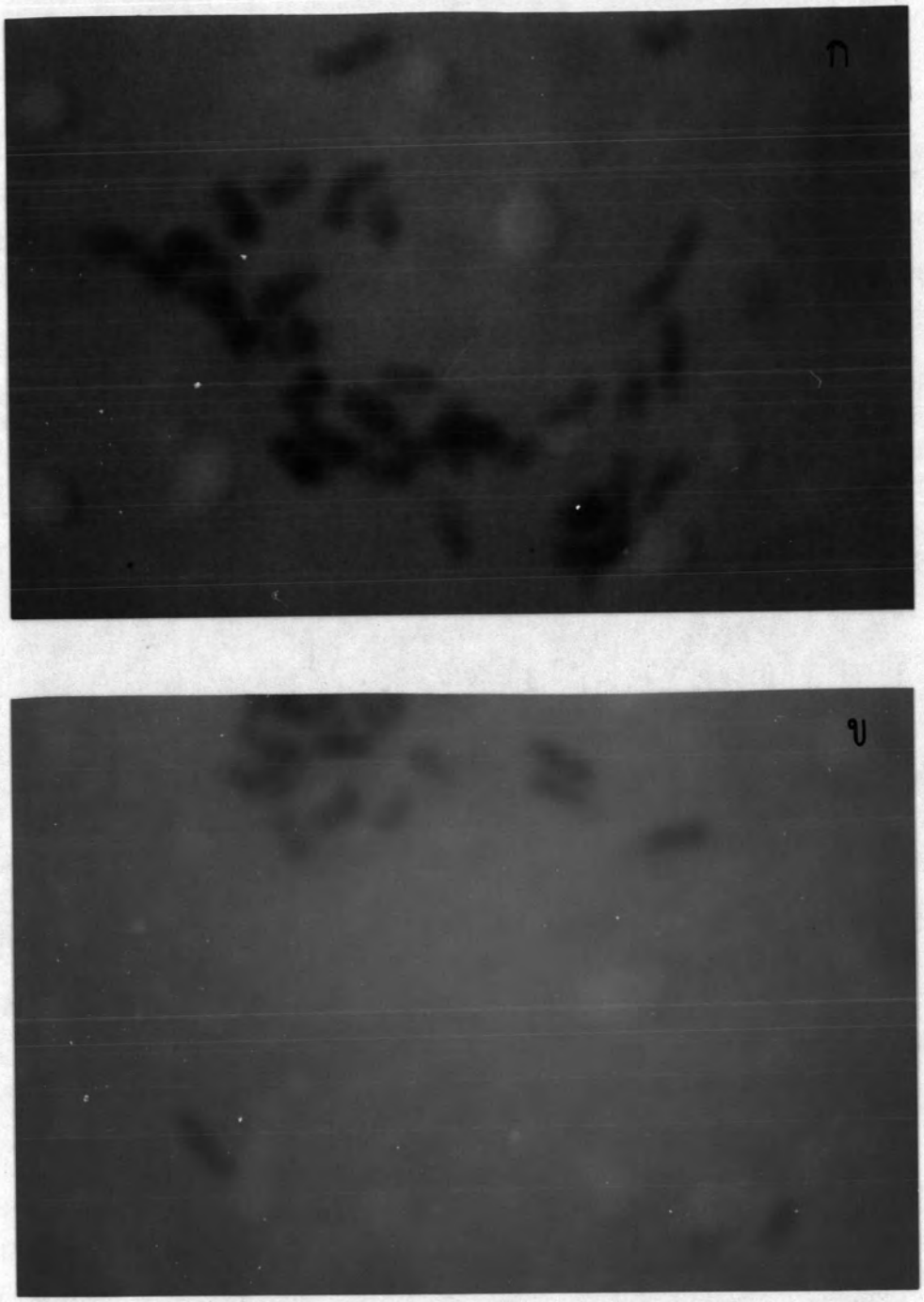
รูปที่ 25 แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์รากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของฝ้ายน้อย (กำลังขยาย 500 เท่า)

ก. ระยะ early prophase

ข. ระยะ middle prophase

ค. ระยะ metaphase

ง. ระยะ anaphase



รูปที่ 26 แสดงจำนวนโครโมโซมของเซลล์รากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส (กำลังขยาย 500 เท่า)

ก. ศรีสำโรง 2 2N =4X= 52 แท่ง (26 คู่)

ข. ฝ้ายน้อย 2N =2X= 26 แท่ง (13 คู่)

การตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์) แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase ร่วมกับ macerozyme อย่างละ 0.5 % จะให้ค่าปริมาณเซลล์ไร้ผนังสูงสุดในส่วนของใบเลี้ยงจากฝ้ายทั้งพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย แต่พันธุ์ศรีสำโรง 2 จะให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังสูงกว่ากล่าวคือ พันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่น 1.7×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ฝ้ายน้อยให้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่นเพียง 0.6×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 27)

3.7.1.2 ผลของความเป็นกรด - ด่าง(pH)ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

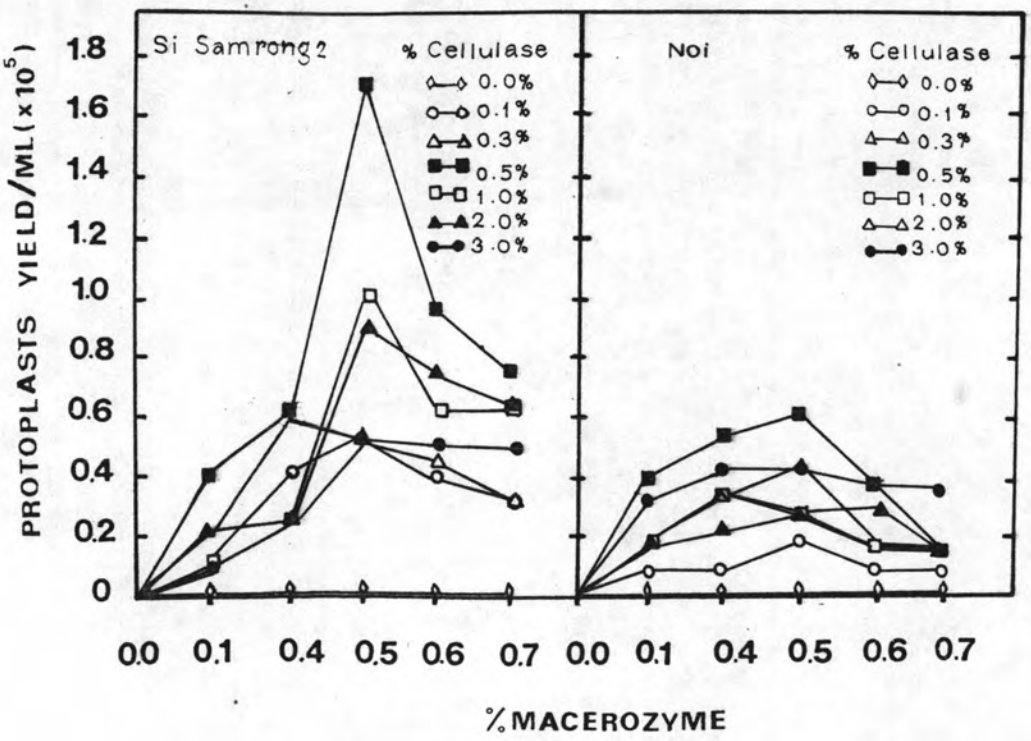
เมื่อทำการแปรผัน pH ของสารละลายที่ใช้แยกเซลล์ไร้ผนังในช่วงจาก 4.6-5.8 จะให้ผลการแยกเซลล์ไร้ผนังค่าต่าง ๆ กัน (รูปที่ 28) จะเห็นได้ว่า ในพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังสูงสุดที่ pH 5.0 และ 5.6 ใกล้เคียงกัน โดยที่ pH 5.0 ให้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่นสูงกว่า pH 5.6 (1.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่สภาวะเดียวกันนี้ เนื้อเยื่อของพันธุ์ฝ้ายน้อยก็ให้ค่าความหนาแน่นสูงสุดแต่มีค่าเพียง 0.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.7.1.3 ผลของช่วงระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ทำปฏิกริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนังสูงสุด จะได้ผลการทดลอง (ดังในรูปที่ 29) เนื้อเยื่อฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ความหนาแน่นและเซลล์ไร้ผนัง (1.1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าฝ้ายน้อย (0.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เวลา 4 ชั่วโมง เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงไปกว่านี้ จะเริ่มสังเกตพบการแตกของเซลล์ไร้ผนังขึ้น

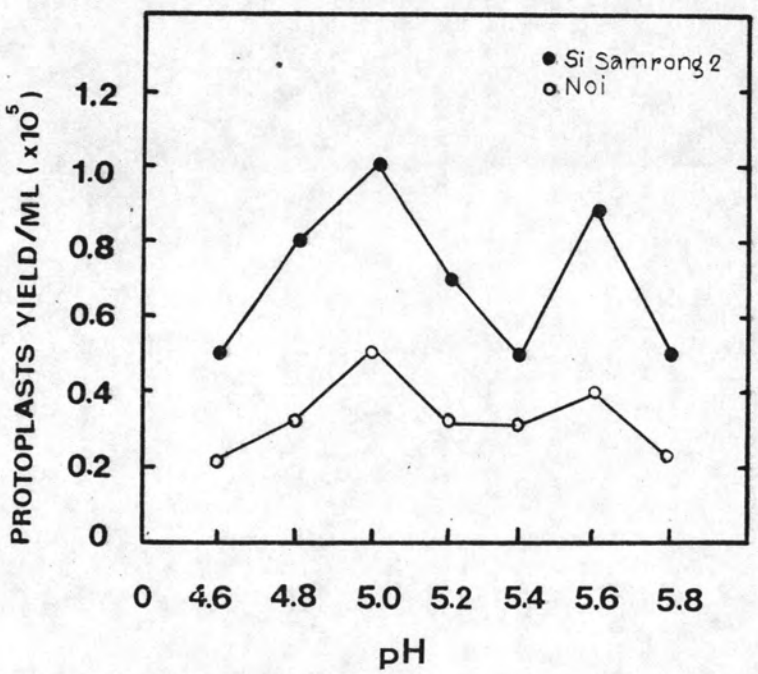
รูปที่ 27 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ mannitol 0.7 โมลาร์ ระยะเวลาการทำงานของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. pH 5.0 เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



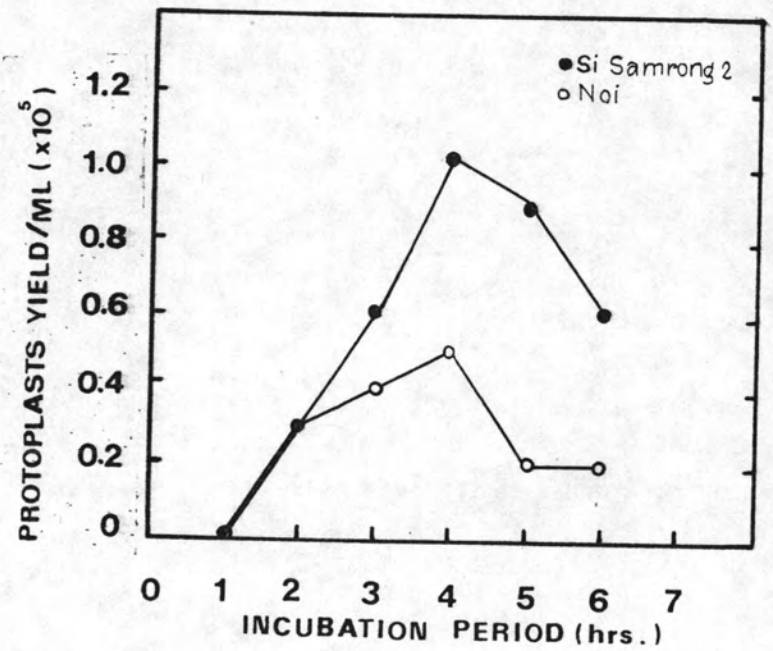
รูปที่ 28 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 0.5 %, macerozyme 0.5 % mannitol 0.7 โมลาร์ ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



รูปที่ 29 ผลของช่วงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และ ฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 0.5%, macerozyme 0.5 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.0 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



3.7.1.4 ผลของความเข้มข้นของสารปรับแรงดันออสโมซิส ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

ในการทดลองใช้ mannitol ปริมาณต่างๆเป็นสารปรับแรงดันออสโมซิส แล้วติดตามความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง พบว่า ในเนื้อเยื่อฝ้ายทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังสูงสุด 1.7×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับฝ้ายน้อยให้เพียง 0.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร เมื่อความเข้มข้นของ mannitol เท่ากับ 0.7 โมลาร์ (รูปที่ 30)

3.7.1.5 ผลกระทบของอุณหภูมิและแสงต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

เมื่อนำเนื้อเยื่อฝ้ายมาแยกเซลล์ไร้ผนังในสารละลายเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. และ 28 ± 2 °ซ. พบว่า อุณหภูมิทั้ง 2 ให้ค่าผลการแยกเซลล์ไร้ผนังจำนวนใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °ซ. ให้จำนวนเซลล์ไร้ผนังต่ำกว่าเล็กน้อย

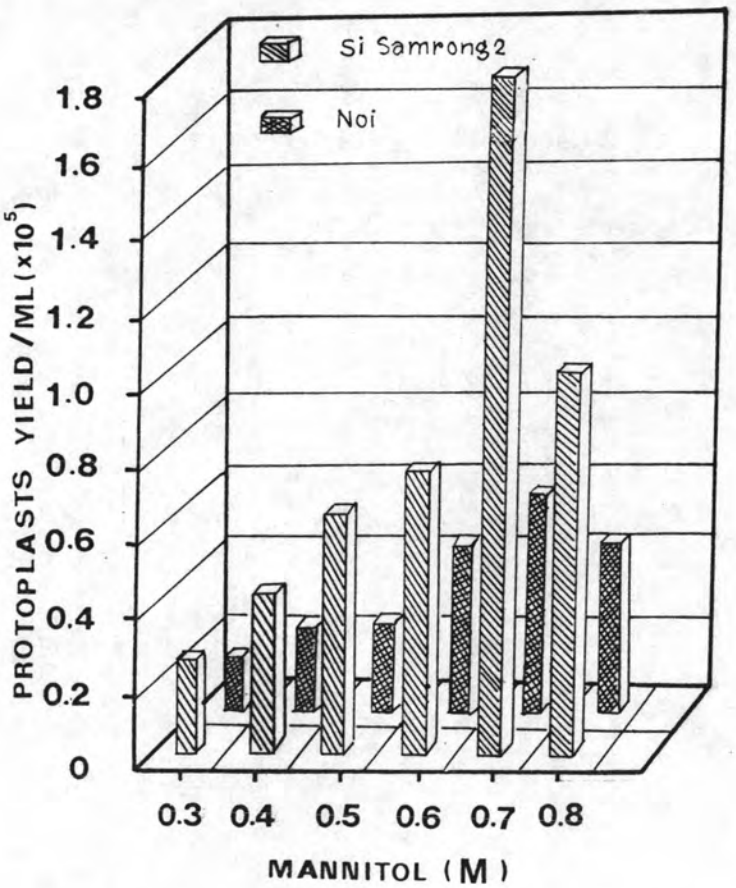
สำหรับการแยกเซลล์ไร้ผนังในที่มืดและที่มีแสง (2000 ลักซ์) ให้จำนวนเซลล์ไร้ผนัง ใกล้เคียงกันในทั้ง 2 พันธุ์ (ตารางที่ 10)

3.7.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและลักษณะบางประการของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยง คือ ใช้ cellulase ร่วมกับ macerozyme อย่างละ 0.5 %, mannitol 0.7 โมลาร์, pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้ระยะเวลาของการทำปฏิกริยาของเอนไซม์ 4 ชั่วโมงในที่มืด แล้วนำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ (ตามวิธีข้อ 2.17.2) จากนั้น นำเซลล์ที่ได้มาตรวจสอบ

รูปที่ 30 ผลของความเข้มข้นของสารปรับแรงดันออสโมซิส ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 0.5 %, macerozyme 0.5 % ระยะเวลาการบ่ม 4 ชั่วโมง pH 5.0 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิและแสงต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย[1]

สภาวะที่ใช้ cellulase 0.5 % macerozyme 0.5 % mannitol 0.7 โมลาร์ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชั่วโมง เยื่อ 110-120 รอบต่อนาทีตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

Cultivar	Protoplasts yield x 10^5 / ml			
	25±2 °c.	28±2 °c.	light	dark
Si Samrong 2	0.9	0.9	0.9	1.2
	1.1	0.7	0.9	0.9
	0.9	0.7	0.8	1.0
Noi	0.4	0.5	0.5	0.7
	0.6	0.6	0.6	0.7
	0.5	0.5	0.6	0.6

ข้อมูลจากการทดลองแต่ละครั้ง 3 ซ้ำ

[1] การทดลองผลกระทบของอุณหภูมิทำในสภาวะที่ไม่มีแสง

การทดลองผลกระทบของแสงกระทำที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติและลักษณะบางประการ เช่น จำนวนเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ความมีชีวิตและความสามารถในการสังเคราะห์แสงด้วย การย้อมเซลล์ ผลการทดลองเป็นดังในตารางที่ 11 พบว่า เนื้อเยื่อฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 สามารถแยกเซลล์ไร้ผนังได้มากกว่า นอกจากนี้ ความมีชีวิตและความสามารถในการสังเคราะห์แสงก็สูงกว่าฝ้ายน้อยอย่างชัดเจน

3.7.3 <u>การศึกษาลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนของใบเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์</u>

เมื่อนำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากพันธุ์ศรีสำโรง 2 และพันธุ์ฝ้ายน้อยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า

3.7.3.1 <u>จากใต้กล้องจุลทรรศน์สามัญ</u>

เมื่อนำเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมได้ 1 หยด (ความหนาแน่นประมาณ 10^5) หยดลงบนสไลด์ แล้วหยดสารละลายไนโตร-บลู เตตราโซเลียม 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ที่มีความเข้มแสง 2000 ลักซ์เป็นเวลา 10 นาที เพื่อดูความสามารถในการสังเคราะห์แสง กำลังขยาย 50 เท่า (รูปที่ 31) ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่สังเคราะห์แสงได้ภายในเซลล์มีเม็ดคลอโรพลาสต์ชัดเจน ติดสีย้อมสีม่วงน้ำตาล ซึ่งต่างจากเซลล์ไร้ชีวิตที่ไม่มีความสามารถสังเคราะห์แสงจะไม่ติดสีย้อม

3.7.3.2 <u>จากใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์</u>

นำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้มาย้อมด้วยสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท เพื่อตรวจดูความมีชีวิต โดยใช้เซลล์ไร้ผนัง 1 หยด แล้วจิงหยดสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ กำลังขยาย 50 เท่า จะเห็นว่า เซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตเท่านั้นที่เรืองแสงออกมา (รูปที่ 32)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

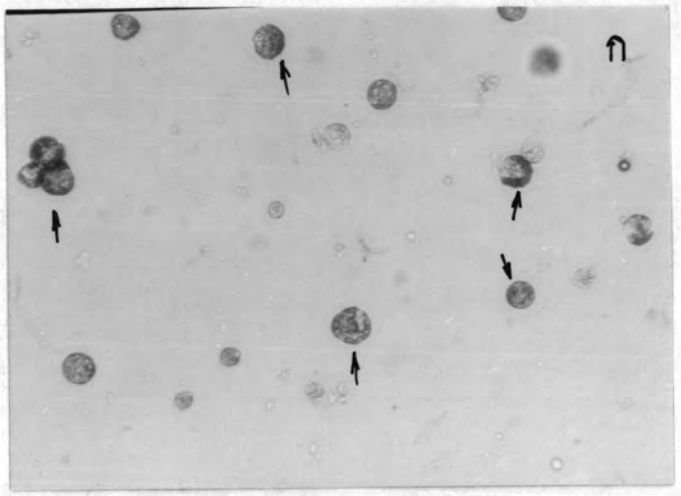
ตารางที่ 11 ความหนาแน่น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และความสามารถในการสังเคราะห์แสงของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนของใบเลี้ยงในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

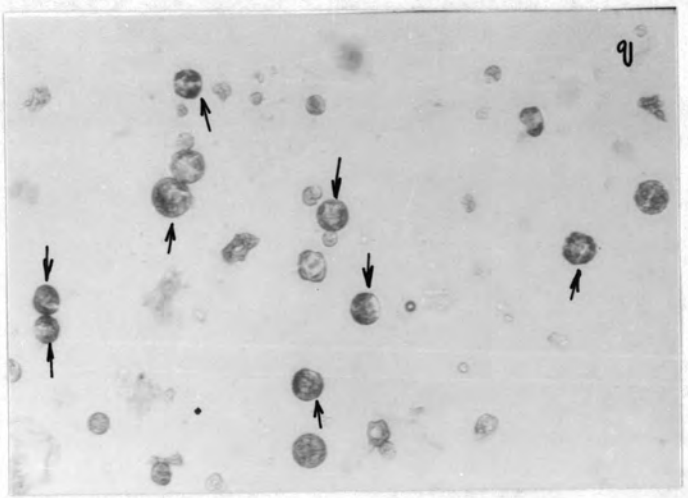
Cultivar	Experiment no.	Protoplast yield[1] ($x10^5$/ml)	Viable protoplast yield[2] (%)	Photosynthetic activity[3] (%)
Si Samrong 2	1	1.3	64.0	72.7
	2	1.1	75.0	76.6
	3	1.5	83.2	68.2
	Total	1.3	74.0	72.5
Noi	1	0.5	46.9	33.3
	2	0.3	41.6	56.2
	3	0.6	53.0	44.4
	Total	0.5	47.1	44.6

[1] ข้อมูลจากการทดลองแต่ละครั้ง 3 ซ้ำ
จำนวนเซลล์ไร้ผนังตรวจนับโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

[2] ความมีชีวิตตรวจนับจากการย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 0.5 เปอร์เซ็นต์

[3] ความสามาถในการสังเคราะห์แสงตรวจนับจากย้อมด้วยไนโตร-บูล เตตราโซเลียม 0.01 เปอร์เซ็นต์

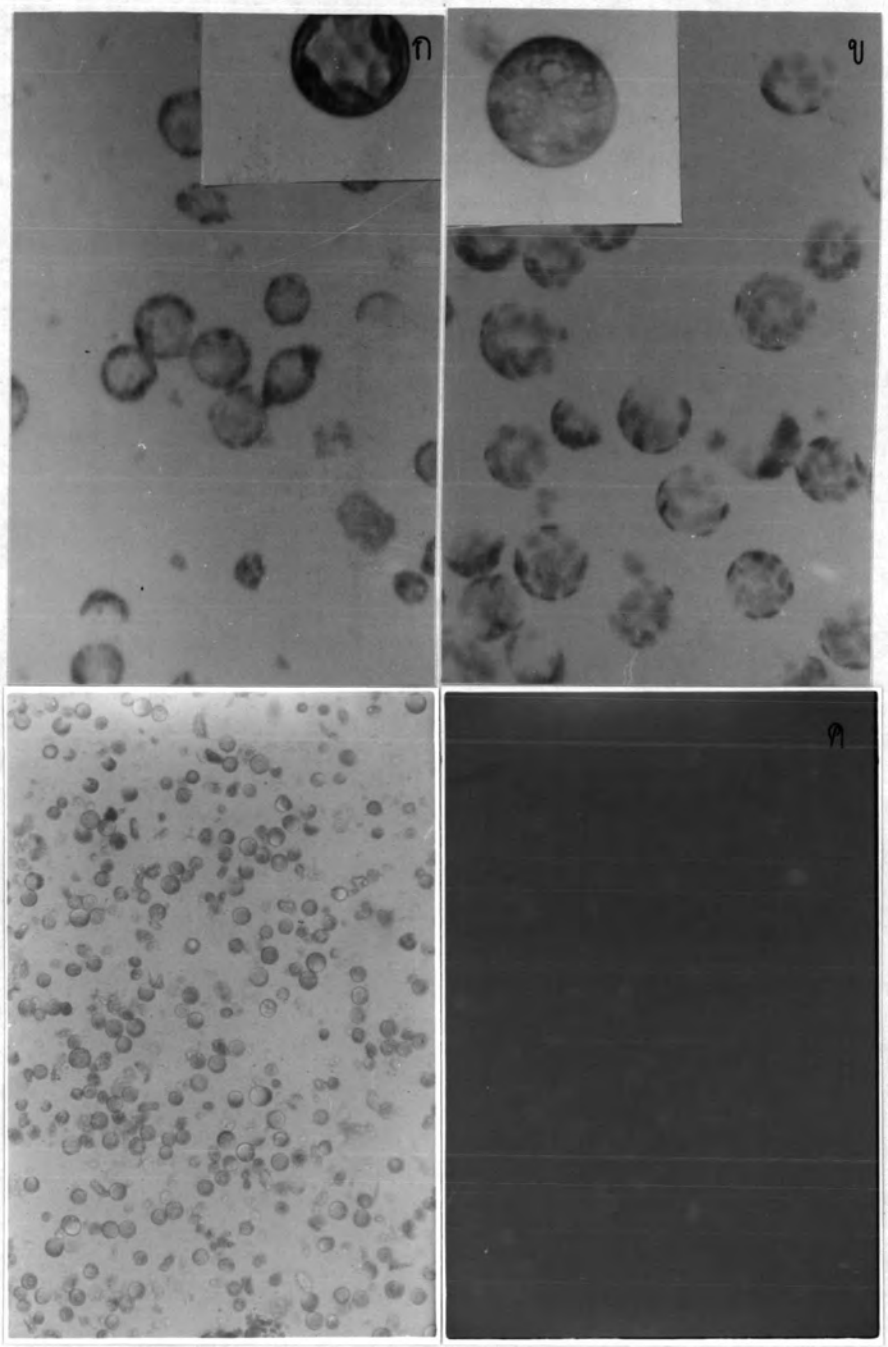




รูปที่ 31 รูปร่างลักษณะและความสามารถในการสังเคราะห์แสงของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนใบเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์แสงได้จะติดสีม่วงน้ำตาลเมื่อย้อมด้วยไนโตร-บลู เตตราโซเลียม ตามวิธีข้อ 2.19.3

ก. ศรีสำโรง 2 (กำลังขยาย 25 เท่า)

ข. ฝ้ายน้อย (กำลังขยาย 25 เท่า)



รูปที่ 32 รูปร่างลักษณะและความชีวิตของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนใบเลี้ยง

ก. เซลล์ไร้ผนังของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (กำลังขยาย 40 เท่า)

ข. เซลล์ไร้ผนังของฝ้ายน้อย (กำลังขยาย 40 เท่า)

ค. ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตในพันธุ์ฝ้ายน้อยเมื่อย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท ตามวิธีข้อ 2. 19.2 (กำลังขยาย 25 เท่า)

3.7.3.3 จากใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

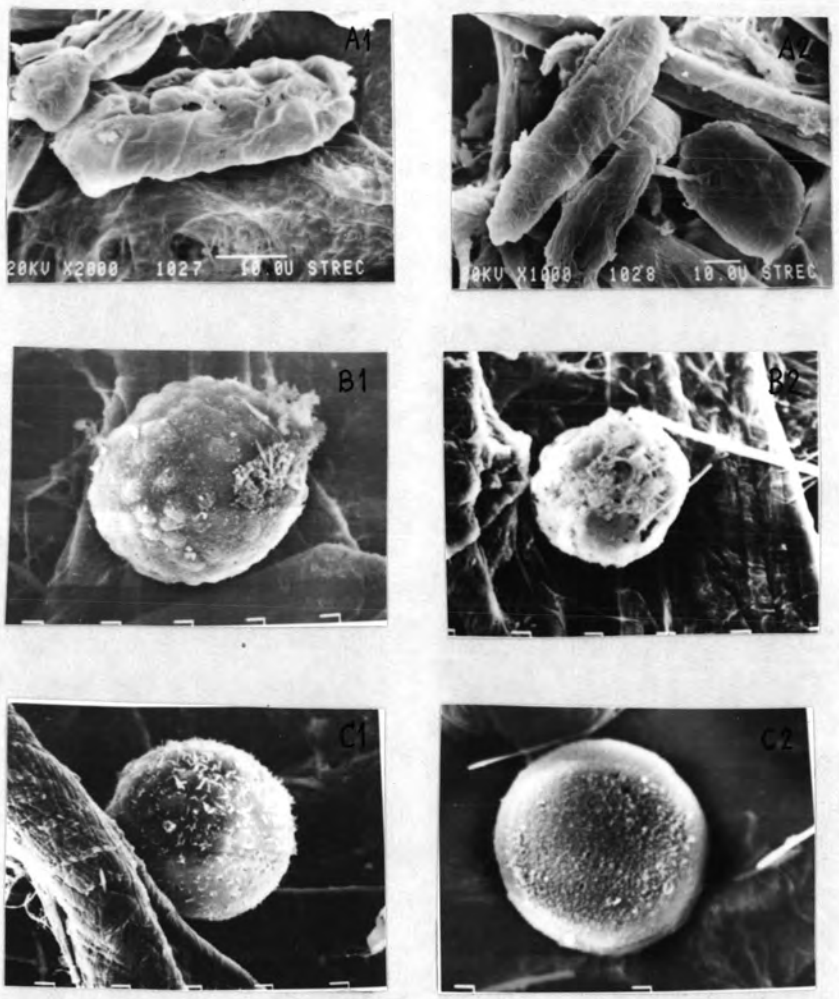
เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้สมบูรณ์หรือไม่ และมีลักษณะภายนอกเมื่อนำผนังเซลล์ออกไปแล้ว เทียบกับเซลล์ปกติ โดยเตรียมเซลล์ไร้ผนังและเซลล์ปกติตามข้อ 2.22 ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า (รูปที่ 33) เซลล์ไร้ผนังที่ย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์สมบูรณ์จะมีผิวเรียบ รูปร่างกลม ส่วนเซลล์ปกติที่แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เช่น ส่วนของ palisade cell รูปร่างยาวผิวไม่เรียบ หรือส่วนของ spongy cell เซลล์รูปร่างค่อนข้างกลมผิวไม่เรียบ ทำให้แยกความแตกต่างของเซลล์ที่มีผนังเซลล์กับเซลล์ไร้ผนังได้อย่างเด่นชัด

3.7.4 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัส

ทำการเตรียมแคลลัส (ข้อ 2.17.3) เพื่อใช้เป็นแหล่งของการแยกเซลล์ไร้ผนัง

3.7.4.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนของใบเลี้ยง พบว่า สภาวะดังกล่าวสามารถใช้แยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสของฝ้ายทั้ง 2 พันธุ์ได้ แต่ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังต่ำมาก จึงทำการทดลองโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของเอมไซม์และใช้แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นสารปรับแรงดันออสโมซิส pH ที่ใช้แยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัสใช้ pH 5.6 เนื่องจากแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ pH 5.7 จากผลการศึกษา pH ที่มีต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังมี 2 ค่า ที่เหมาะสม คือ 5.0 และ 5.6 ดังนั้นจึงเลือก pH 5.6 มาใช้ในการแยกเพราะใกล้เคียงกับสภาพของการเพาะเลี้ยงแคลลัส



รูปที่ 33 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron micrograph) แสดงลักษณะรูปทรงและพื้นผิวของเซลล์

A.1 เซลล์ปกติของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (x2000)

A.2 เซลล์ปกติของฝ้ายน้อย (x1800)

B.1, B.2 เซลล์ไร้ผนังของพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยที่ย่อยไม่สมบูรณ์ตามลำดับ (x2000)

C.1 เซลล์ไร้ผนังของพันธุ์ศรีสำโรง 2 ที่ย่อยสมบูรณ์ (x2000)

C.2 เซลล์ไร้ผนังของฝ้ายน้อยที่ย่อยสมบูรณ์ (x5000)

ทำการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ เพื่อจะได้-แยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนของแคลลัสให้เพิ่มขึ้นได้ ดังใน รูปที่ 34 พบว่าเมื่อให้-ความเข้มข้นของ macerozyme คงที่เป็น 0.5 % cellulase ที่ความเข้มข้น 2 % แคลลัสจากฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $1.4x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (77.8%) เทียบกับเซลล์เริ่มต้นที่สภาวะเดียวกันนี้ ฝ้ายน้อยให้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่นถึง $2.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (86.9%) เทียบกับเซลล์เริ่มต้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของ cellulase คงที่ความเข้มข้น 2% แปรผันปริมาณของ macerozyme พบว่า แคลลัสจากฝ้ายทั้งสองสายพันธุ์จะให้ความ-หนาแน่นสูงสุดเมื่อ macerozyme เข้มข้น 0.6 % (รูปที่ 35) ดังนั้น cellulase 2 %ใช้ร่วมกับ macerozyme 0.6% เหมาะต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัสของฝ้าย

3.7.4.2 <u>ผลของช่วงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง</u>

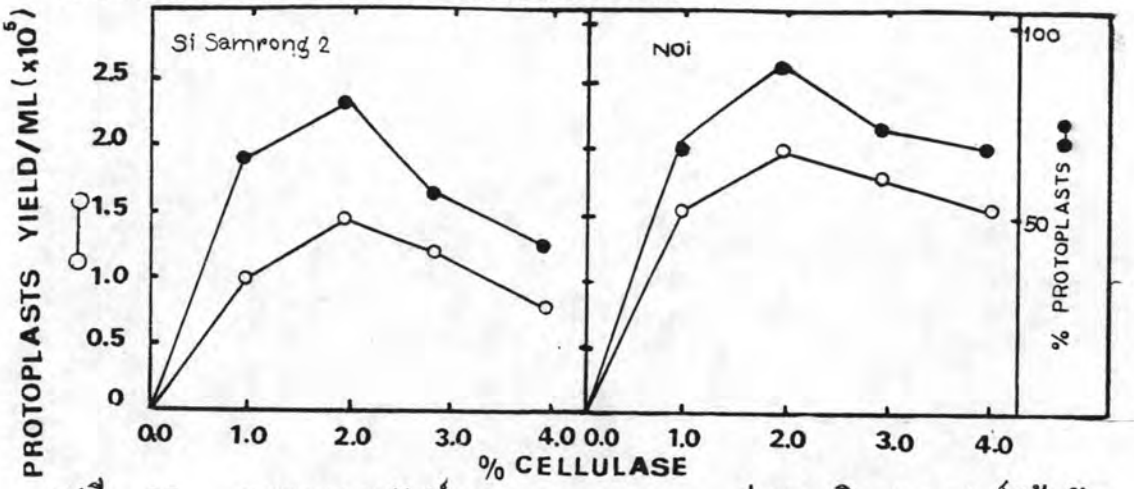
ใช้สารละลายความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase ต่อ macerozyme (2 ต่อ 0.6 เปอร์เซ็นต์) mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 อุณหภูมิ 25± 2 °ซ. แปรผันช่วงเวลาการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่ 1-4 ชั่วโมง (รูปที่ 36) พบว่า พันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังสุด $1.2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (80%) เทียบกับเซลล์เริ่มต้น ต่ำกว่าฝ้ายน้อยซึ่ง-ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังคิดเป็น $1.9x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรเทียบกับเซลล์-เริ่มต้น เมื่อใช้เวลาของการปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 3 ชั่วโมง

3.7.4.3 <u>ผลของชนิดแคลลัสที่ชักนำมาจากส่วนของพืชต่างกันต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง</u>

นำแคลลัสที่ชักนำมาจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลมาแยกในสภาวะที่มี cellulase 2 % macerozyme 0.6 % ความเข้มข้นของ-สารละลาย mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มืด

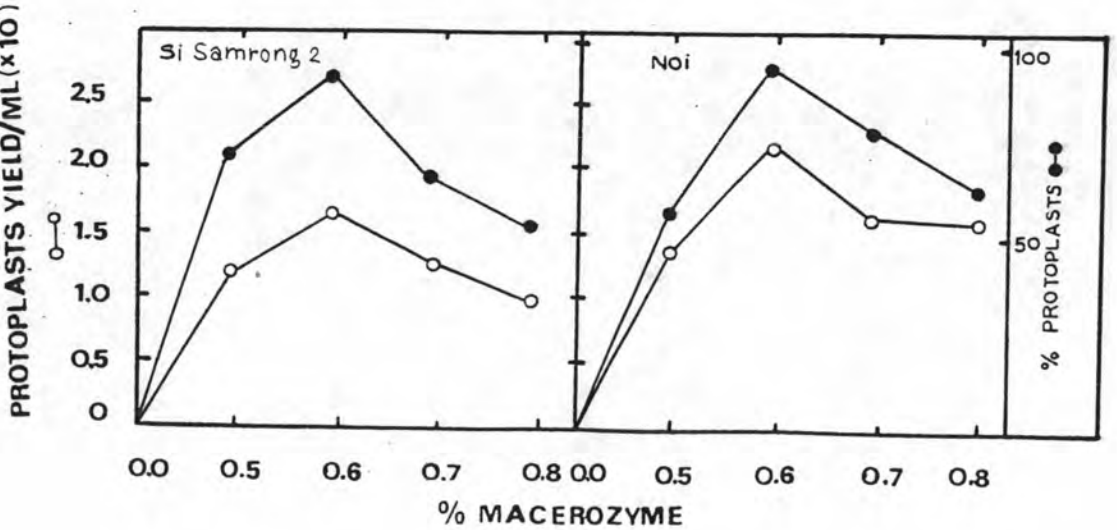
รูปที่ 34 ผลของเอนไซม์ cellulase ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ macerozyme 0.5 % mannitol 0.7 โมลาร์ ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 2-3 ชั่วโมง pH 5.6 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



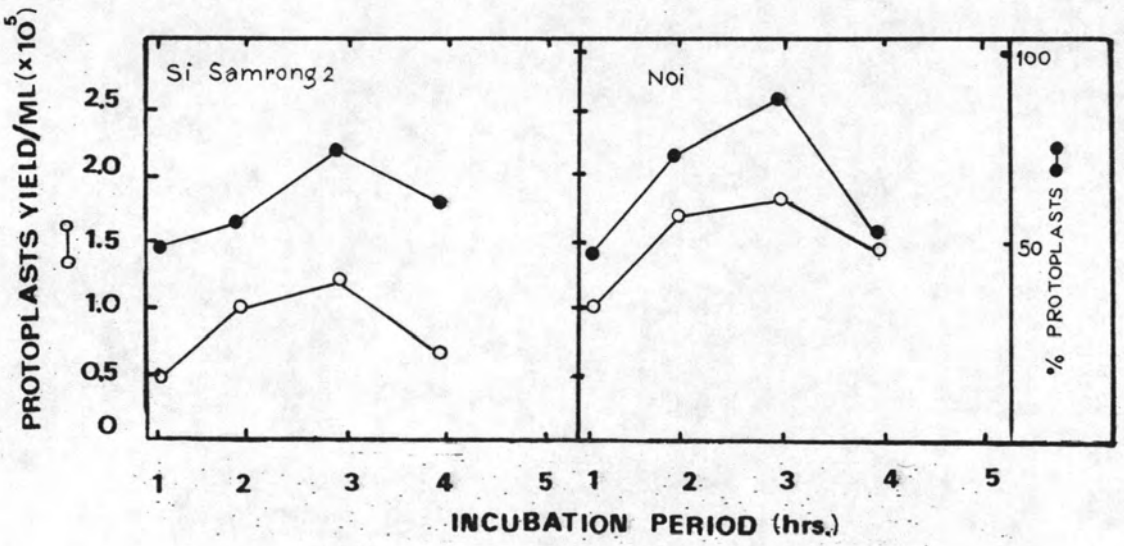
รูปที่ 35 ผลของเอนไซม์ macerozyme ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสของพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 2 % mannitol 0.7 โมลาร์ ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 2-3 ชั่วโมง pH 5.6 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์



รูปที่ 36 ผลของช่วงระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังของแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 2 %, macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



ผลปรากฏว่า แคลลัสที่ชักนำมาจากส่วนของใบเลี้ยงให้จำนวนเซลล์ไร้ผนังสูงกว่าแคลลัสที่มาจากส่วนของไฮโปคอทิล (รูปที่ 37)

3.7.4.4 ผลของอายุแคลลัสต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

นำแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงมาแยกเซลล์ไร้ผนังในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.7.2.3 พบว่า เมื่ออายุแคลลัสมากขึ้นจะแยกเซลล์ไร้ผนังได้ลดลง (รูปที่ 38) พันธุ์ศรีสำโรง 2 แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์จะแยกเซลล์ไร้ผนังได้สูงสุดเพียง 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่สภาวะเดียวกัน ฝ้ายน้อยให้ค่าเซลล์ไร้ผนังถึง 2.3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

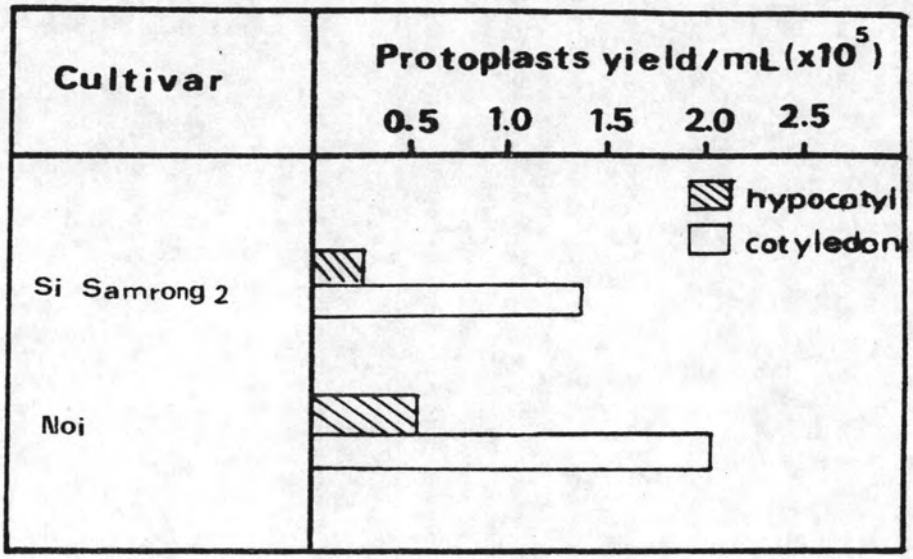
3.7.5 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและลักษณะบางประการของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากแคลลัสในพันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

นำเซลล์ไร้ผนังที่แยกมาจากแคลลัสของฝ้ายทั้งสองพันธุ์ในสภาวะที่เหมาะสมมาตรวจนับความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ตรวจนับความมีชีวิตและความสามารถในการสังเคราะห์แสงโดยการย้อมสี (ตามวิธีข้อ 2.19) ผลการทดลอง (ตารางที่ 12) พบว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้จำนวนเซลล์ไร้ผนัง 1.3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรคิดเป็น 68.4 % เทียบกับเซลล์เริ่มต้นความมีชีวิต 59.8 และความสามารถในการสังเคราะห์แสง 62.7 %

ส่วนพันธุ์ฝ้ายน้อยให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังสูงกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2 กล่าวคือ ให้จำนวนเซลล์ไร้ผนัง 2.1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 77.8 % เทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น ความมีชีวิต 73.2 % และความสามารถในการสังเคราะห์แสง 72.5 %

รูปที่ 37 เปรียบเทียบผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมได้จากแคลลัสของฝ้ายที่ชักนำมาจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลในพันธุ์ศรีสำโรง 2 และ ฝ้ายน้อย

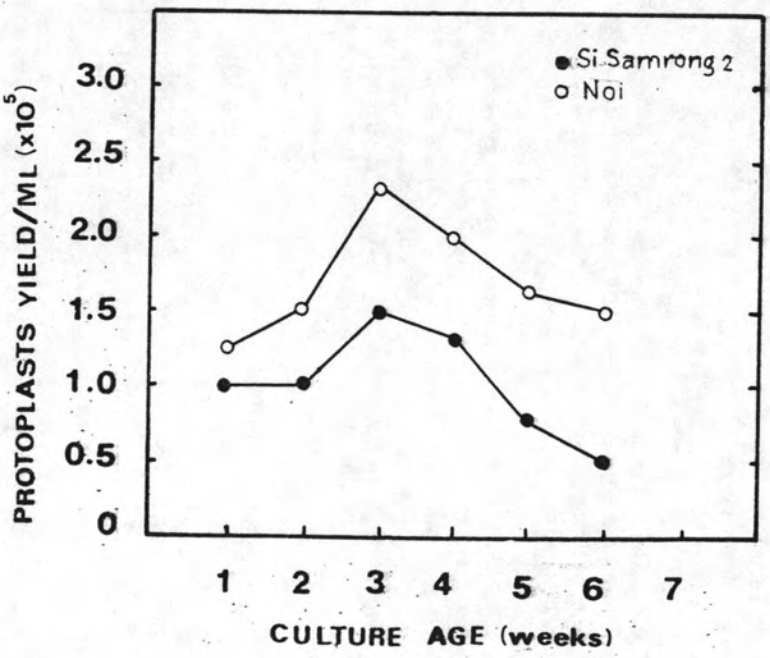
สภาวะที่ใช้ cellulase 2 %, macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38 ผลของอายุแคลลัสฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และ ฝ้ายน้อยต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนัง

สภาวะที่ใช้ cellulase 2 %, macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้วิธีฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



ตารางที่ 12 ความหนาแน่น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความสามารถในการสังเคราะห์แสงเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนแคลลัสใน ฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

Cultivar	Experiment no.	Protoplast yield[1] ($x10^5$/ml)	Viable protoplast yield[2] (%)	Photosynthetic activity[3] (%)
Si Samrong 2				
	1	1.3	57.2	45.0
	2	1.5	62.4	78.5
	3	1.2	60.0	64.7
	Total	1.3(72.2%)	59.8	62.7
Noi	1	2.5	74.5	80.2
	2	1.9	76.8	72.8
	3	2.1	68.5	65.5
	Total	2.1(80.7%)	73.2	72.5

[1] ข้อมูลจากการทดลองแต่ละครั้ง 3 ซ้ำ จำนวนเซลล์ไร้ผนังตรวจนับโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

[2] ความมีชีวิตตรวจนับจากการย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 0.5 เปอร์เซ็นต์

[3] ความสามารถในการสังเคราะห์แสงตรวจนับจากย้อมด้วยไนโตร-บูล เตตราโซเลียม 0.01 เปอร์เซ็นต์

พันธุ์ศรีสำโรง 2 จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ฝ้ายน้อย จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.6×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.7.6 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนของแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์

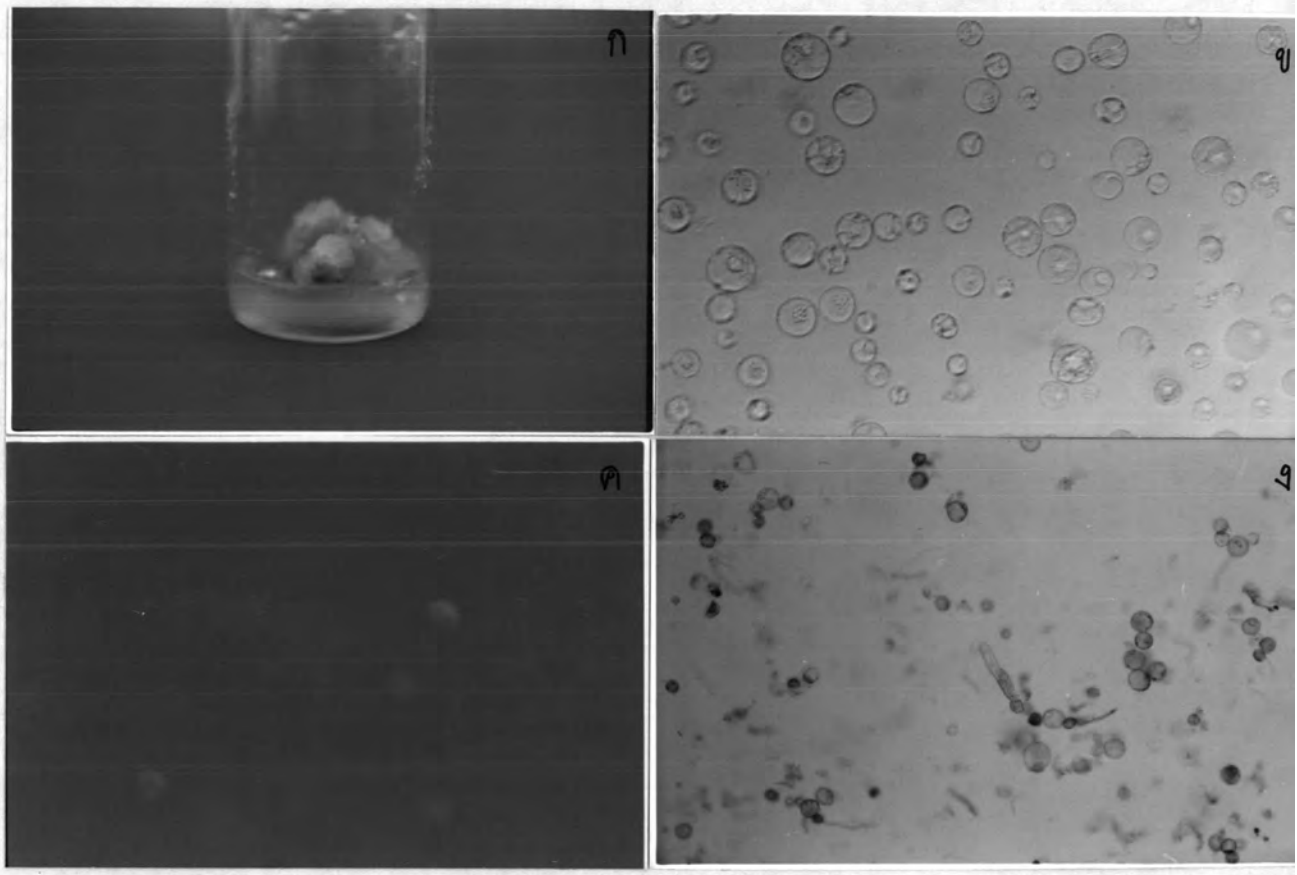
ในการทดลองนำเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมได้จากแคลลัสในพันธุ์ฝ้ายทั้งสองมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบลักษณะความมีชีวิตและความสามารถในการสังเคราะห์แสงด้วยการย้อมสี (ตามวิธีข้อ 2.19.2 และ 2.19.3) พบว่า ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายทั้ง 2 พันธุ์มีลักษณะกลมองค์ประกอบภายในเซลล์มีเม็ดคลอโรพลาสต์ พบแวคิวโอลน้อย ตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์แสงเมื่อย้อมด้วยไนโตร-บลูเตตราโซเลียมเซลล์ไร้ผนังที่สังเคราะห์แสงได้จะติดสีม่วงน้ำตาล ส่วนเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตจากการย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตทจะเกิดการเรืองแสงสังเกตเห็นองค์ประกอบภายในเรืองแสงชัดเจน (รูปที่ 39,40)

3.7.7 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอย

เซลล์แขวนลอย (เตรียมตามวิธีข้อ 2.17.3) ของฝ้ายสายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยเมื่อนำมาแยกเซลล์ไร้ผนังโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมกับการแยกเซลล์ไร้ผนังของแคลลัส พบว่า ได้ผลผลิตของเซลล์-ไร้ผนังต่ำมาก แต่ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังยังคงสภาพอยู่ได้ จึงน่าจะเพิ่มเวลาของการเกิดปฏิกริยาของเอนไซม์ หรือศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยให้ได้มากขึ้น

3.7.7.1 ผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

ผลการทดลองในรูปที่ 41 พบว่า ในเวลา 4 ชั่วโมงสามารถเกิดเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยได้สูงสุด โดยพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่นเพียง 0.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 41.6 % เทียบกับเซลล์-



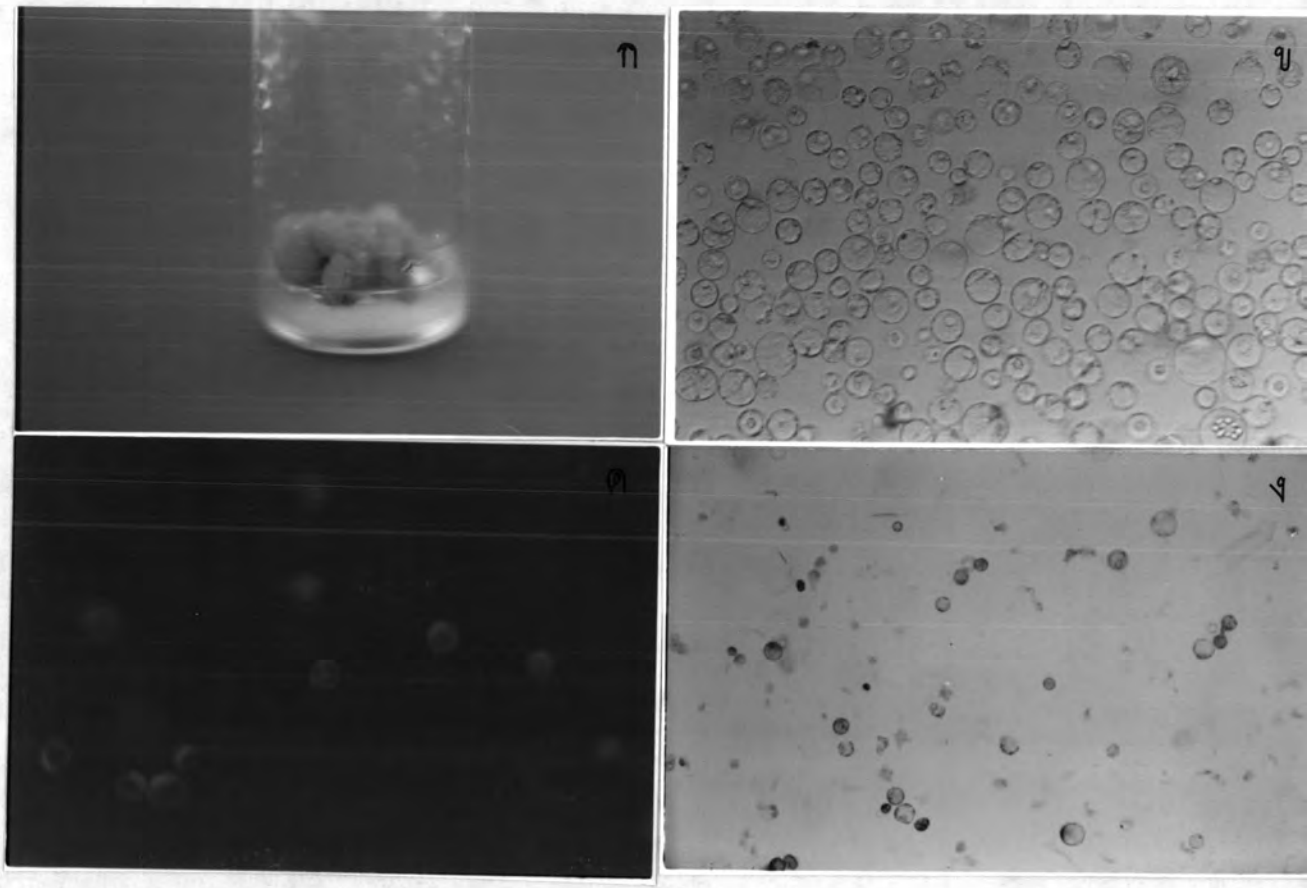
รูปที่ 39 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสในพันธุ์ศรีสำโรง 2

ก. ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยง

ข. เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากแคลลัส (กำลังขยาย 50 เท่า)

ค. ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตโดยย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท ตามวิธีข้อ 2.19.2 (กำลังขยาย 50 เท่า)

ง. ลักษณะการติดสีของเซลล์ไร้ผนังที่สามารถสังเคราะห์แสงได้โดยย้อมด้วยไนโตร-บลู เตตราโซเลียม ตามวิธีข้อ 2.19.3 (กำลังขยาย 25 เท่า)



รูปที่ 40 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสในฝ้ายน้อย

ก. ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยง

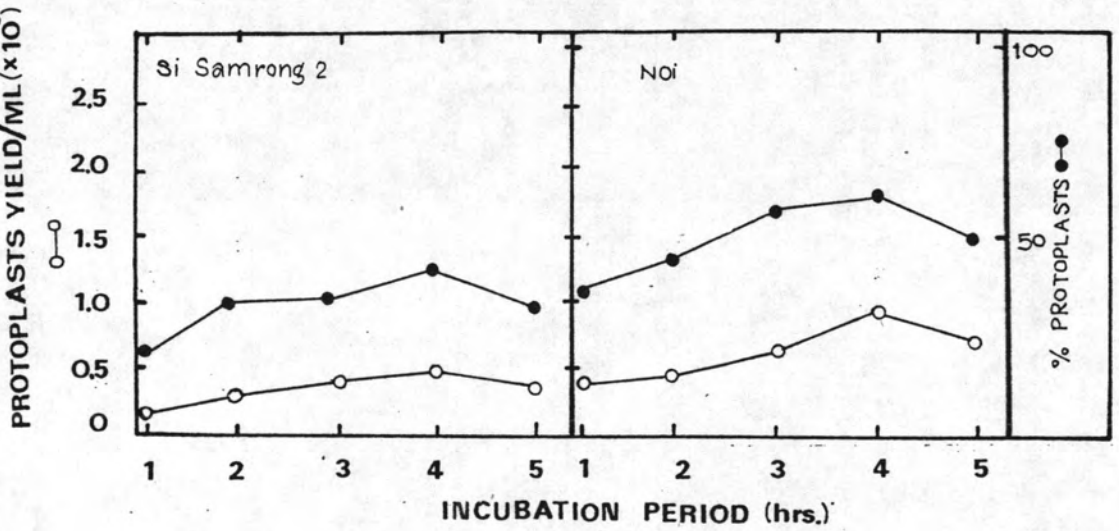
ข. เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากแคลลัส (กำลังขยาย 50 เท่า)

ค. ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตโดยย้อมด้วย ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตทตามวิธีข้อ 2.19.2(กำลังขยาย 50เท่า)

ง. ลักษณะการติดสีของเซลล์ไร้ผนังที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยย้อมด้วยไนโตร-บลู เตตราโซเลียม ตามวิธีข้อ 2.19.3 (กำลังขยาย 25 เท่า)

รูปที่ 41 ผลของช่วงเวลาของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 2 % macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



เริ่มต้น ขณะที่เซลล์แขวนลอยของฝ้ายน้อย ให้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่นถึง 0.9×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.7.7.2 ผลของสารอินทรีย์บางชนิดต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังของเซลล์แขวนลอยฝ้าย

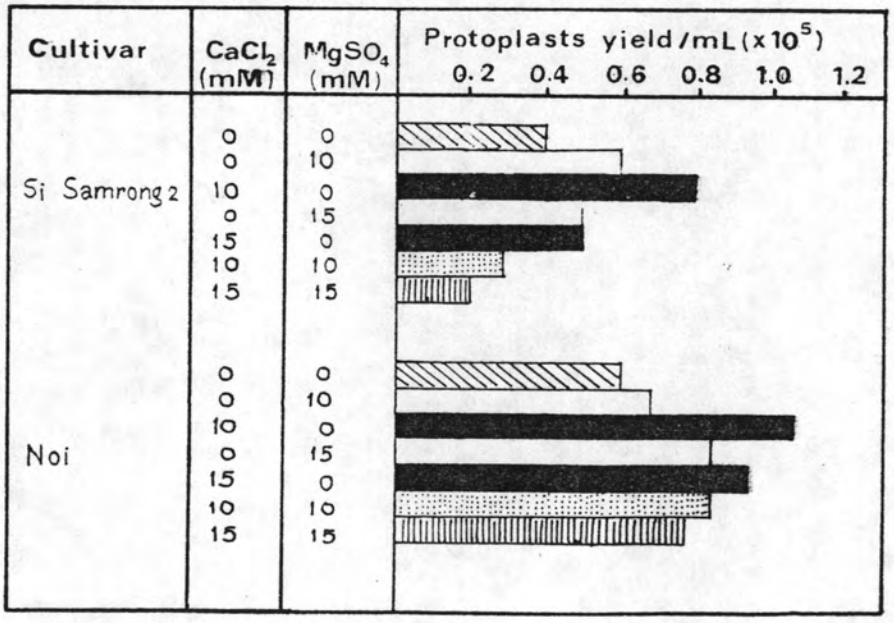
ใช้สภาวะการแยกเช่นเดียวกับการแยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัส แต่เพิ่มเวลาของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จาก 3 ชั่วโมงไปเป็น 4 ชั่วโมง เสริมสารอินทรีย์ลงไปในสารละลายเอนไซม์ ได้แก่ $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์, 15, มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 10, 15 มิลลิโมลาร์, $MgSO_4$ plus $CaCl_2$ อย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ $MgSO_4$, plus $CaCl_2$ อย่างละ 15 มิลลิโมลาร์ พบว่า การใช้สารอินทรีย์เสริมลงไปในสารละลายเอนไซม์ย่อย-เซลล์ไร้ผนังมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอย โดยที่ $CaCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังได้เกือบ 2 เท่า เทียบกับไม่มีสารอินทรีย์ และเมื่อเสริมด้วย $MgSO_4$ หรือ $MgSO_4$ plus $CaCl_2$ ช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังได้ในพันธุ์ฝ้ายทั้งสอง แต่ไม่เด่นชัดนัก (รูปที่ 42)

3.7.7.3 ผลของอายุของเซลล์แขวนลอยต่อประสิทธิภาพการเกิดเซลล์ไร้ผนัง

นำเซลล์แขวนลอยมาแยกเซลล์ไร้ผนังในสภาวะที่มี cellulase 2 % และ macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ เสริมด้วย $CaCl_2$ มิลลิโมลาร์ pH 5.6 อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. พบว่า เซลล์แขวนลอยของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง2 อายุประมาณ 2 สัปดาห์ แยกเซลล์ไร้ผนังได้เพียง 0.7×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนฝ้ายน้อยให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังถึง 1.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่สภาวะเดียวกัน (รูปที่ 43)

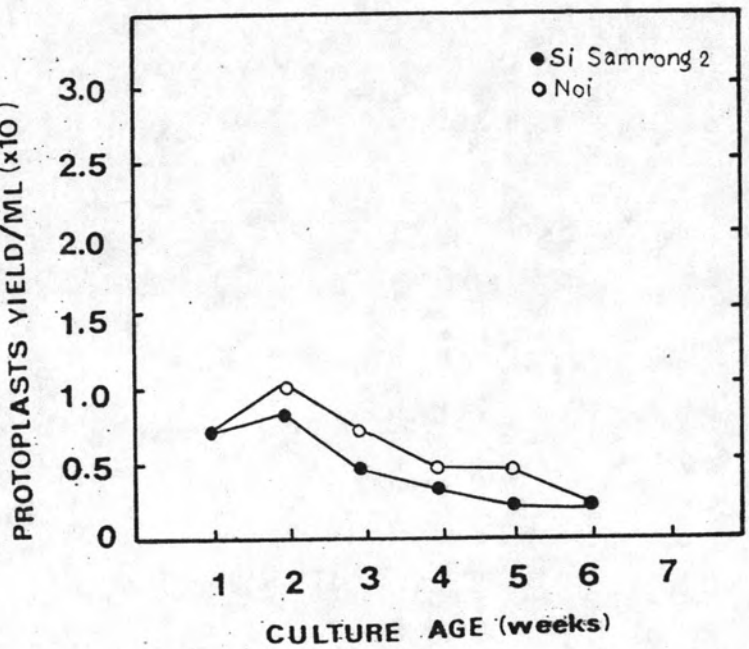
รูปที่ 42 ผลของสารอินทรีย์ที่เติมลงไปในสารละลายเอนไซม์ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยของฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และ ฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 2 % macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชั่วโ อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



รูปที่ 43 ผลของอายุเซลล์แขวนลอยต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังของฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

สภาวะที่ใช้ cellulase 2 %, macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ pH 5.6 ระยะเวลาการทำงานของเอนไซม์ 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 °ซ. เขย่า 110-120 รอบต่อนาที ในที่มืด ตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ตามภาคผนวกที่ 6)



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.8 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและลักษณะบางประการที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยในพันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

ผลการทดลอง (ตารางที่ 13) พบว่า เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังของเซลล์แขวนลอย (สารละลายเอนไซม์ที่มี cellulase 2 % macerozyme 0.6 % mannitol 0.7 โมลาร์ เสริมด้วย $CaCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ pH 5.6 อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มืด เขย่าที่ความถี่ 110-120 รอบ ต่อนาที จากฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 ให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $0.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 35.7 % เทียบกับเซลล์เริ่มต้น ความมีชีวิต 68.8 % และความสามารถในการสังเคราะห์แสง 65.9 %

ส่วนของเซลล์แขวนลอยจากพันธุ์ฝ้ายน้อยให้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $1.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 50 %เทียบกับเซลล์-เริ่มต้น ความมีชีวิต 69.2 % และความสามารถในการสังเคราะห์แสง 67.9% แสดงให้เห็นว่าฝ้ายน้อยมีศักยภาพของการเกิดเซลล์ไร้ผนังได้สูงกว่าพันธุ์ศรีสำโรง 2

3.7.9 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากเซลล์แขวนลอยด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยของฝ้ายทั้ง 2 พันธุ์ มาตรวจดูความมีชีวิต และความสามารถในการสังเคราะห์แสง (ตามวิธีข้อ 2.19.2 และ 2.19.3) ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตจะเกิดการเรืองแสงขึ้น สังเกตเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์ชัดเจน และความสามารถในการสังเคราะห์แสงเมื่อย้อมด้วยไนโตร-บลูเตตราโซเลียม เซลล์ไร้ผนังที่สังเคราะห์แสงได้จะติดสีม่วงน้ำตาล (รูปที่ 44 และ 45) ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกันกับเซลล์ไร้ผนังที่เกิดจากแคลลัส

ตารางที่ 13 ความหนาแน่น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความสามารถในการสังเคราะห์แสงของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย

Cultivar	Experiment no.	Protoplast yield[1] ($x10^5$/ml)	Viable protoplast yield[2] (%)	Photosynthetic activity[3] (%)
Si Samrong 2				
	1	0.4	60.7	64.2
	2	0.6	90.4	76.4
	3	0.5	55.5	57.1
	Total	0.5(35.7%)	68.8	65.9
Noi	1	1.0	78.9	76.1
	2	0.8	58.3	54.5
	3	0.6	70.5	73.3
	Total	1.0(50.0%)	69.2	67.9

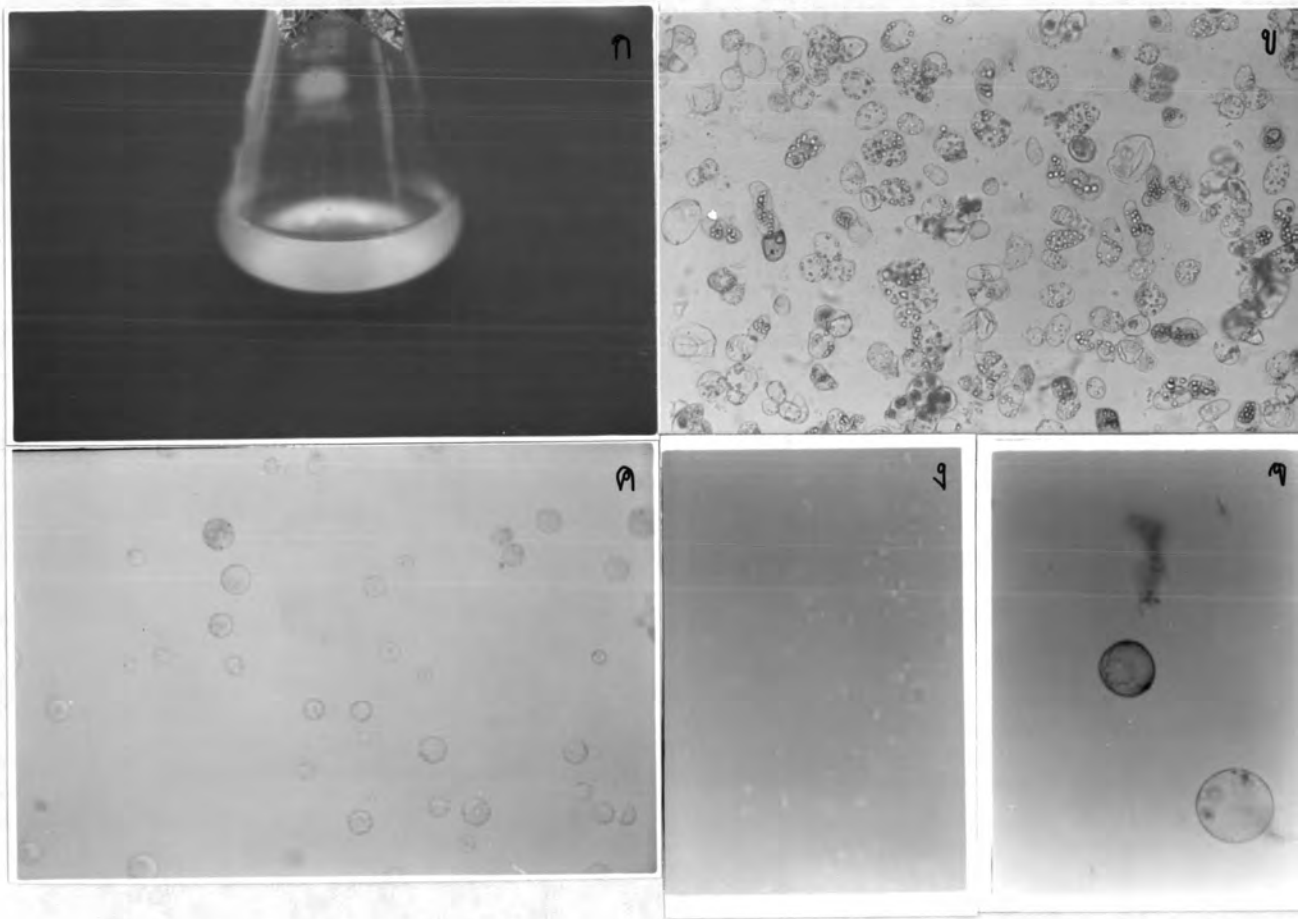
[1] ข้อมูลจากการทดลองแต่ละครั้ง 3 ซ้ำ จำนวนเซลล์ไร้ผนังตรวจนับโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

[2] ความมีชีวิตตรวจนับจากการย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 0.5 เปอร์เซ็นต์

[3] ความสามารถในการสังเคราะห์แสงตรวจนับจากย้อมด้วยไนโตร-บูล เตตราโซเลียม 0.01 เปอร์เซ็นต์

พันธุ์ศรีสำโรง 2 จำนวนเซลล์เริ่มต้น $1.4x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ฝ้ายน้อย จำนวนเซลล์เริ่มต้น $1.6x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 44 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนัง จากส่วนเซลล์แขวนลอยในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2

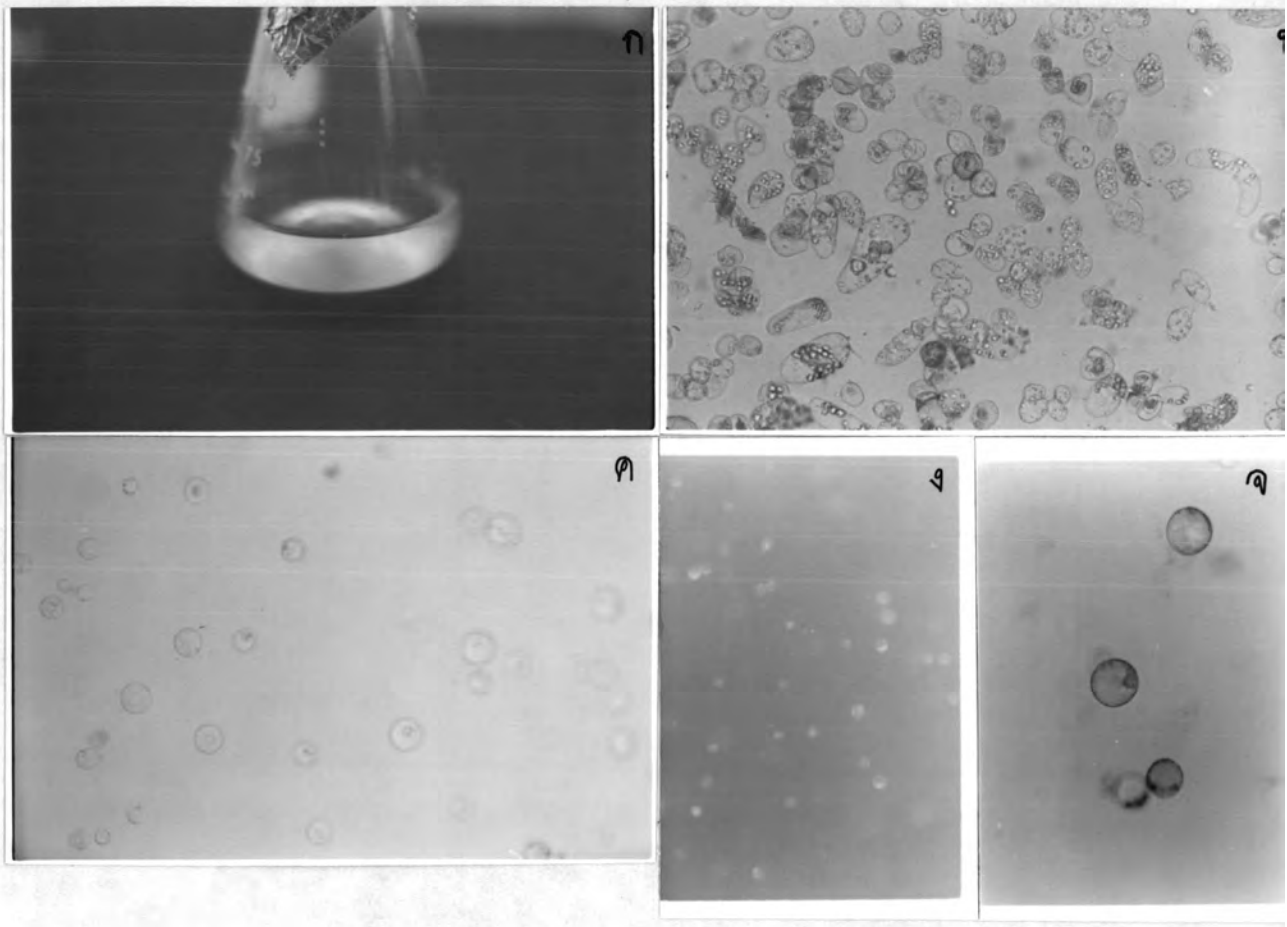
ก. ลักษณะของเซลล์แขวนลอย

ข. ลักษณะเซลล์ของเซลล์แขวนลอย (กำลังขยาย 25 เท่า)

ค. เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอย (กำลังขยาย 25 เท่า)

ง ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตโดยย้อม ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท ตามวิธีข้อ 2.19.2 (กำลังขยาย 25เท่า)

จ. ลักษณะการติดสีของเซลล์ไร้ผนังที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยย้อมด้วยไนโตร-บลู เตตราโซเลียม ตามวิธีข้อ 2.19.3 (กำลังขยาย 50 เท่า)



รูปที่ 45 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนเซลล์แขวนลอยในฝ้ายน้อย

ก. ลักษณะของเซลล์แขวนลอย

ข. ลักษณะเซลล์ของเซลล์แขวนลอย (กำลังขยาย 25 เท่า)

ค. เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอย (กำลังขยาย 25 เท่า)

ง. ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนัง ที่มีชีวิต โดยย้อมด้วย ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท ตามวิธีข้อ 2.19.2 (กำลังขยาย 25 เท่า)

จ. ลักษณะการติดสีของเซลล์ไร้ผนังที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยย้อมด้วยไนโตร-บลู เตตราโซเลียม ตามวิธีข้อ 2.19.3 (กำลังขยาย 50 เท่า)

3.8 การวัดขนาดของเซลล์ไร้ผนัง

นำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยง แคลลัสและเซลล์แขวนลอยในสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกเซลล์ไร้ผนังในแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อฝ้ายที่นำมาแยก ทำการวัดขนาดด้วยไมโครมิเตอร์ ตามวิธีข้อ 2.20 พบว่า ขนาดของเซลล์ไร้ผนังในทุกส่วนของพันธุ์ศรีสำโรง 2 จะมีขนาดใหญ่กว่าฝ้ายน้อย โดยพันธุ์-ศรีสำโรง 2 มีขนาดเซลล์ไร้ผนังอยู่ในช่วง 20-45 ไมโครเมตร สำหรับพันธุ์ฝ้ายน้อยขนาดของเซลล์ไร้ผนังอยู่ในช่วง 10-40 ไมโครเมตร (รูปที่ 46)

3.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง

ภายหลังจากการแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยง แคลลัสและเซลล์แขวนลอยของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยได้แล้ว เพื่อที่จะให้เซลล์ไร้ผนังมีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์พร้อมที่จะพัฒนาต่อไปเป็นกลุ่มเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง จึงทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของเซลล์ไร้ผนัง คือ สารอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต รวมทั้งความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง

3.9.1 ผลของสารอาหารต่อการเจริญของเซลล์ไร้ผนัง

เมื่อนำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยมาเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS, MS เต็มสูตร เสริมด้วยวิตามิน ตามสูตรของ UM (ภาคผนวกที่ 3) สภาวะของการเพาะเลี้ยงอยู่ในที่มืดลักษณะการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 47) พบว่า สูตรอาหาร MS เต็มสูตร อาหารที่เตรียมจะตกตะกอน ส่วนเมื่อนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ไร้ผนังจะเกิดการเหี่ยวหรือแตกไป ลักษณะการเหี่ยว ดังรูปที่ 48 สำหรับสูตรอาหาร 1/2 MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร UM พบว่า เซลล์ไร้ผนังยังคงรักษาดุลยภาพของเซลล์ไว้ได้

รูปที่ 46 ขนาดของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยง แคลลัส และเซลล์แขวนลอยของฝ้าย จากการวัดขนาดด้วยไมโครมิเตอร์ตามวิธีข้อ 2.2

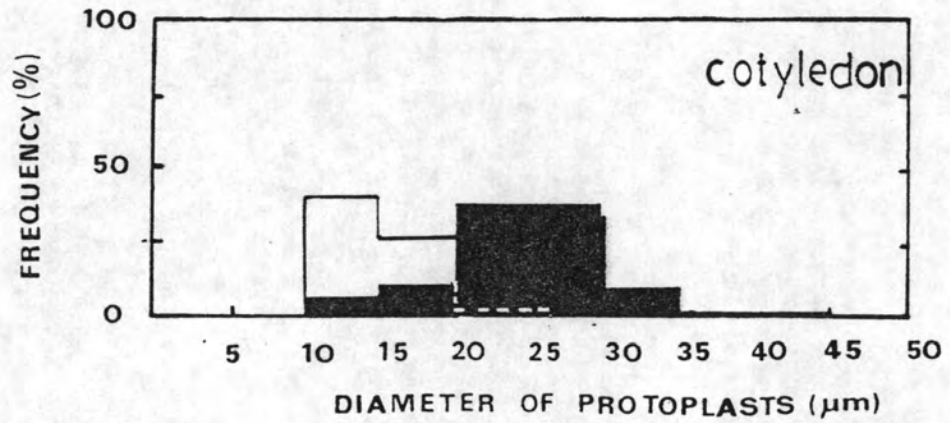
ก. ส่วนใบเลี้ยง

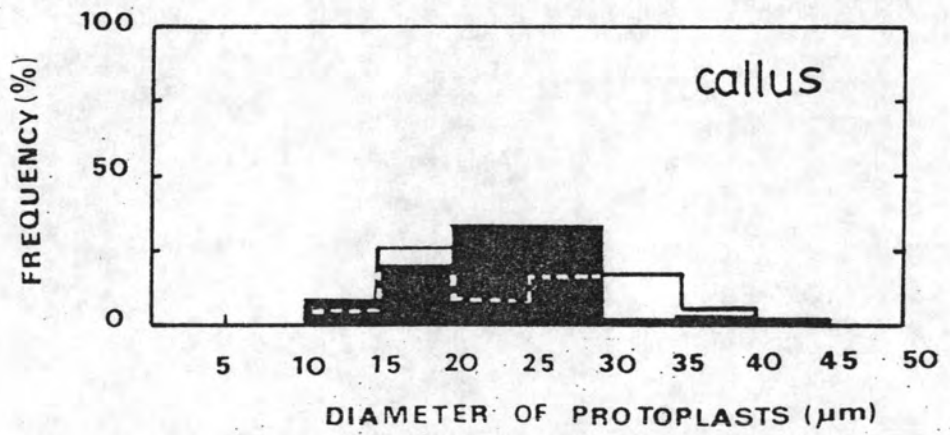
ข. ส่วนแคลลัส

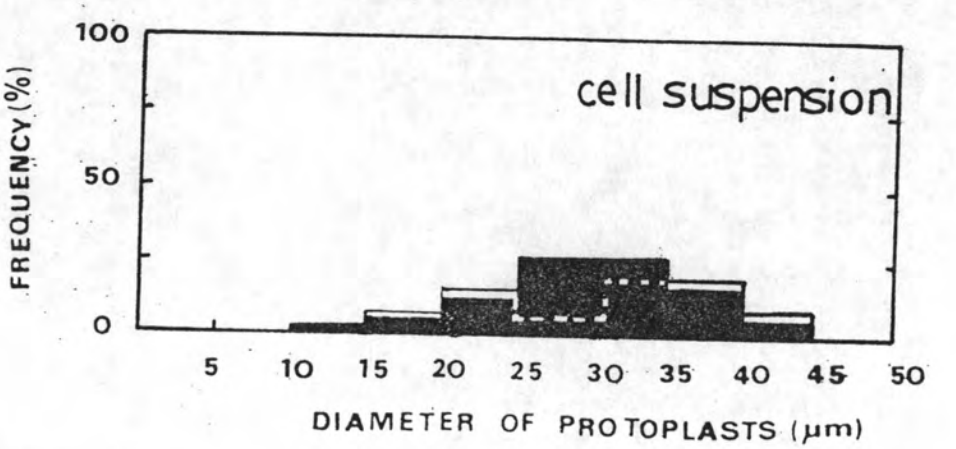
ค. ส่วนเซลล์แขวนลอย

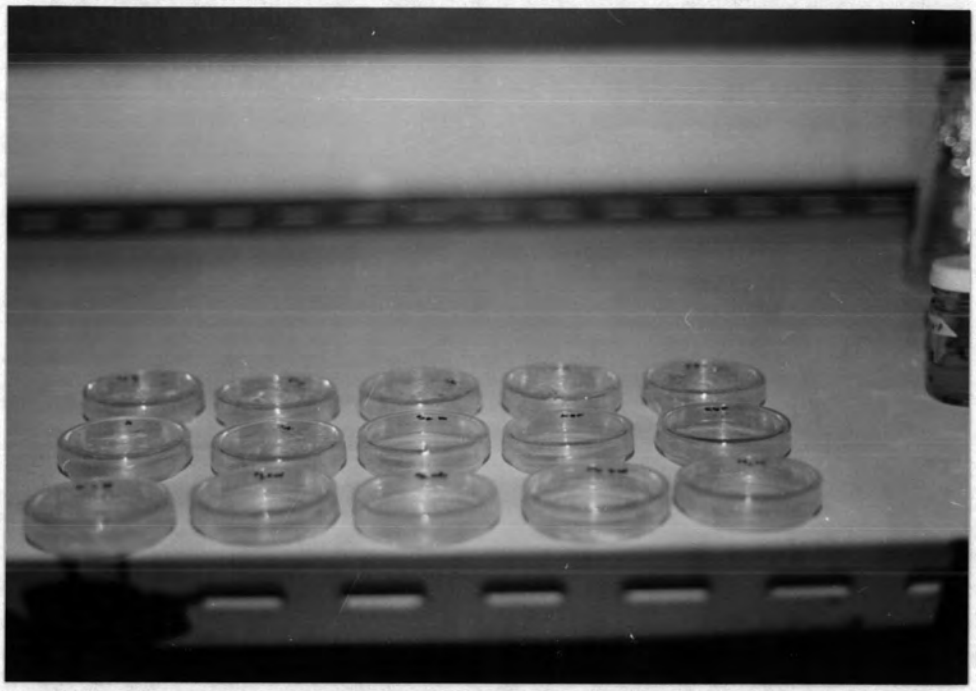
โดยที่ ■ ศรีสำโรง 2

□ ฝ้ายน้อย

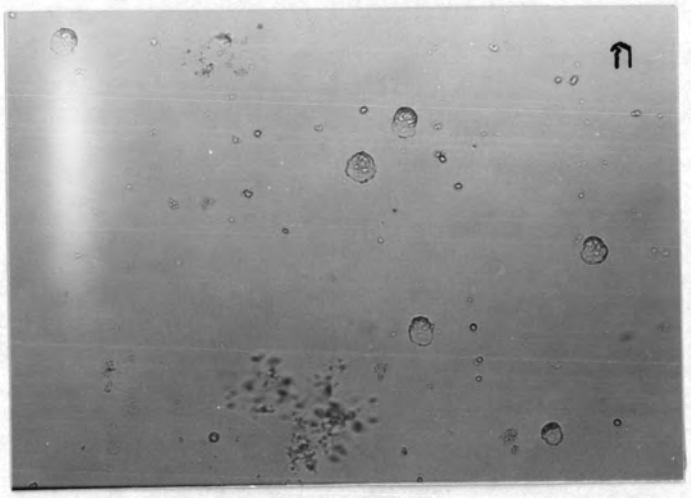


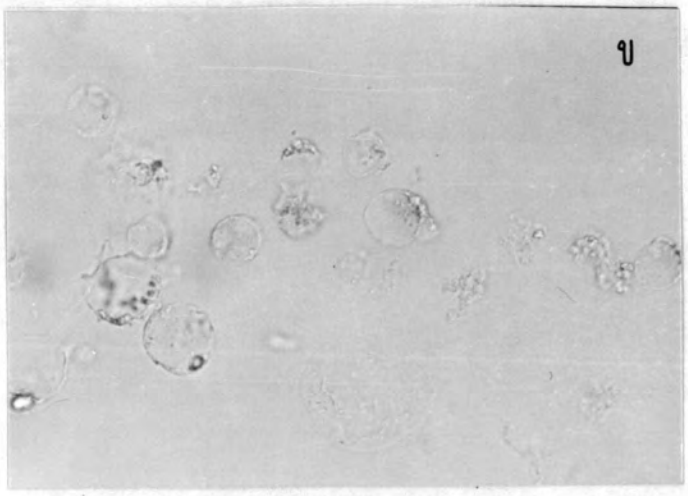






รูปที่ 47 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังในอาหารเหลว 1/2 MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ UM ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มืด





รูปที่ 48 ลักษณะการเหี่ยวและแตกของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสของฝ้ายที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ UM ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มืด

ก. ศรีสำโรง 2 (กำลังขยาย 25 เท่า)

ข. ฝ้ายน้อย (กำลังขยาย 50 เท่า)

จากการตรวจดูการสร้างผนังเซลล์ด้วย calcofluor white (ตามวิธีข้อ 2.21)และติดตามการแบ่งเซลล์โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจพบเซลล์ไร้ผนังมีการสร้างผนังเซลล์ได้ แต่ยังไปพบการแบ่งเซลล์ หลังจากนั้น คอยติดตามดูความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท พบว่า ความมีชีวิตของเซลล์ไร้ผนังลดลงอยู่ได้เพียง 10-15 วัน (ตารางที่ 14) ในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังได้ทำการวัด pH ของอาหารที่เพาะเลี้ยง พบว่า pH ที่ใช้เพาะเลี้ยงเดิม 5.7 หลังจากเลี้ยงไประยะหนึ่งจะลดลงอยู่ในช่วง 4.0-4.5

3.9.2 <u>ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าวต่อการเจริญของเซลล์ไร้ผนัง</u>

สูตรอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของเซลล์ไร้ผนัง คือ สูตร 1/2 MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร UM ซึ่งมีผลต่อการรักษาคุณภาพของเซลล์มากที่สุด อย่างไรก็ตาม เซลล์ไร้ผนังจะเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปขึ้นกับความเหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารบางอย่างที่อาจมีผลต่อการเจริญ ได้ลองแปรผันปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโต และปริมาณน้ำมะพร้าว พบว่า NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล. kinetin 0.2 มก./ล. และ zeatin 0.2 มก./ล. เมื่อมีน้ำมะพร้าวอยู่ด้วยปริมาณ 10 % สามารถทำให้เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากแคลลัสแบ่งเซลล์ได้จาก 1 เป็น 2 เซลล์ โดยพันธุ์ศรีสำโรง 2 แบ่งเซลล์ 3.0 % ขณะที่ฝ้ายน้อยแบ่งเซลล์ 12.6 % (ตารางที่ 15) ลักษณะของการเกิดผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ดังรูปที่ 49

หลังการเลี้ยงประมาณ 5 วัน pH ของอาหารเปลี่ยนบ้างจากเดิม 5.7 มาอยู่ในช่วง 5.0-5.4 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การเติมน้ำมะพร้าวลงไป

ตารางที่ 14 ผลของการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ UM ที่มี NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล. kinetin และzeatin อย่างละ 0.2 มก./ล. ต่อการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังในฝ้าย ที่อุณหภูมิ 25± 2 °ซ.

Species, cultivar	Yield ($x10^5$ protoplasts/ml)	% Cell wall regeneration	Source of tissue	% cell division
G. hirsutum	1	17.8	Cotyledon	0
cv.Si Samrong2	1	24.8	Callus	0
	1	14.1	Cell suspension	0
G. arboreum	1	8.4	Cotyledon	0
cv. Noi	1	34.2	Callus	0
	1	11.7	Cell suspension	0

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตรวจดูผลหลังการเลี้ยง 4 วัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายในอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มืด นาน 2 วัน

Species, cultivar	Yield ($x10^5$ protoplasts/ml)	Sourse of tissue	Division frequency(%)			
			H1	H2	H3	H4
G. hirsutum	1	Cotyledon	0	0	0	0
cv.Si Samrong	1	Callus	0	0	0	3.0
	1	Cell suspension	0	0	0	0
G. arboreum	1	Cotyledon	0	0	0	0
cv. Noi	1	Callus	0	0	1	12.6
	1	Cell suspension	0	0	0	0

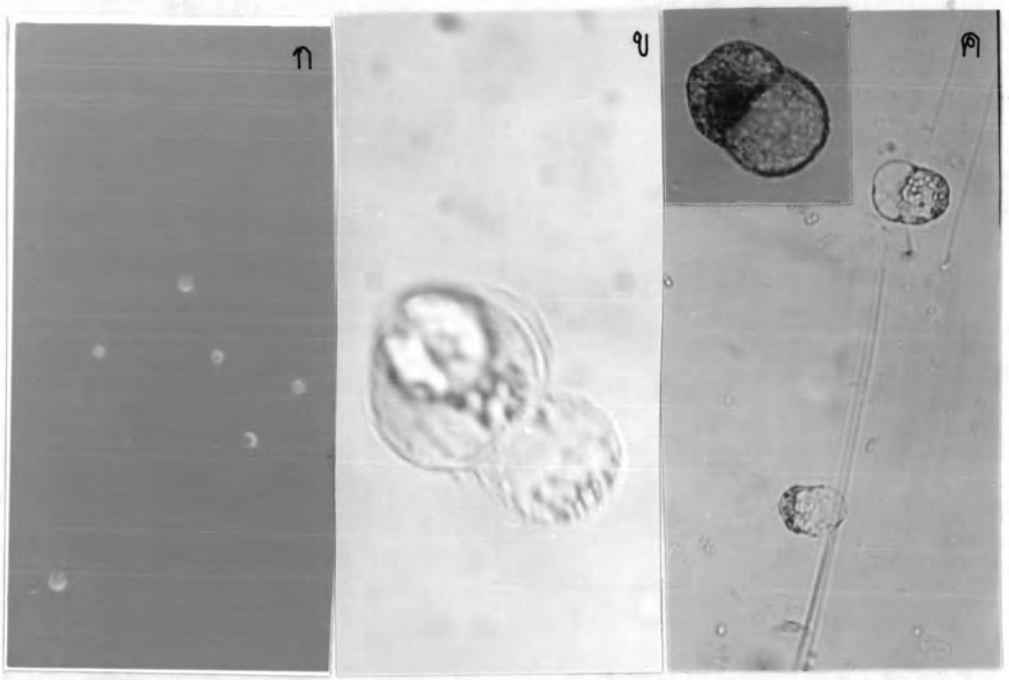
การทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน 5 การทดลอง ในการทดลองแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

H1 คือ NAA 1 มก./ลิตร 2,4-D 0.5 มก./ลิตร kinetin และ zeatin อย่างละ 0.5 มก./ลิตร เติมน้ำมะพร้าว 5 %

H2 คือ NAA 1 มก./ลิตร 2,4-D 0.5 มก./ลิตร kinetin และ zeatin อย่างละ 0.5 มก./ลิตร เติมน้ำมะพร้าว 10 %

H3 คือ NAA 1 มก./ลิตร 2,4-D 0.5 มก./ลิตร kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ลิตร เติมน้ำมะพร้าว 5 %

H4 คือ NAA 1 มก./ลิตร 2,4-D 0.5 มก./ลิตร kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ลิตร เติมน้ำมะพร้าว 10 %



รูปที่ 49 ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังเมื่อเกิดผนังเซลล์ขึ้น โดยย้อมด้วยคอลโคฟลูออร์ไวท์ และการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2 MSเสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ UM ที่มี NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล., kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง อายุ 2 วัน

ก. การเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังเมื่อเกิดผนังเซลล์ขึ้น (กำลังขยาย 25 เท่า)

ข. การแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังในฝ่ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 (กำลังขยาย 100 เท่า)

ค. การแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังในฝ่ายน้อย (กำลังขยาย 100 เท่า)

น่าจะมีส่วนช่วยรักษาสภาพความเป็นกรด - ด่างของอาหาร และช่วยให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้ดีขึ้น

3.9.3 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังต่อการเจริญของเซลล์ไร้ผนัง

จากปัจจัยที่ทำการศึกษามาข้างต้น การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังใช้ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $1.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงได้ทำการทดสอบถึงความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังระดับต่างๆ ($0.5x10^5$, $2.0x10^5$ $5.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ว่า จะมีผลต่อความชีวิตรอด และความสามารถในการแบ่งเซลล์ โดยใช้เซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนแคลลัสมาศึกษา เนื่องจากให้ผลตอบสนองต่อการเลี้ยงสภาวะของการเพาะเลี้ยงดี สภาวะการเพาะเลี้ยงใช้อาหารสูตร 1/2 MS สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มก./ล. 2,4-D 0.5 มก./ล. kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ล. น้ำมะพร้าว 10 % pH 5.7 ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ในที่มืด ผลการทดลองเป็นดังในตารางที่ 16 พบว่า ที่ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $0.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรไม่มีการแบ่งเซลล์และความมีชีวิตรอดลดลงเมื่อเลี้ยงไปนาน ๆ ขณะที่ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $1.0x10^5$, $2.0x10^5$, $5.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีผลให้เซลล์ไร้ผนังแบ่งเซลล์ แต่ที่สภาวะเดียวกันนี้ที่ความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนัง $1.0 x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์สูงสุดในเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไป เซลล์ไร้ผนังจะมีอยู่ได้ประมาณ 1 เดือน ความมีชีวิตและจะลดลงเรื่อย ๆ

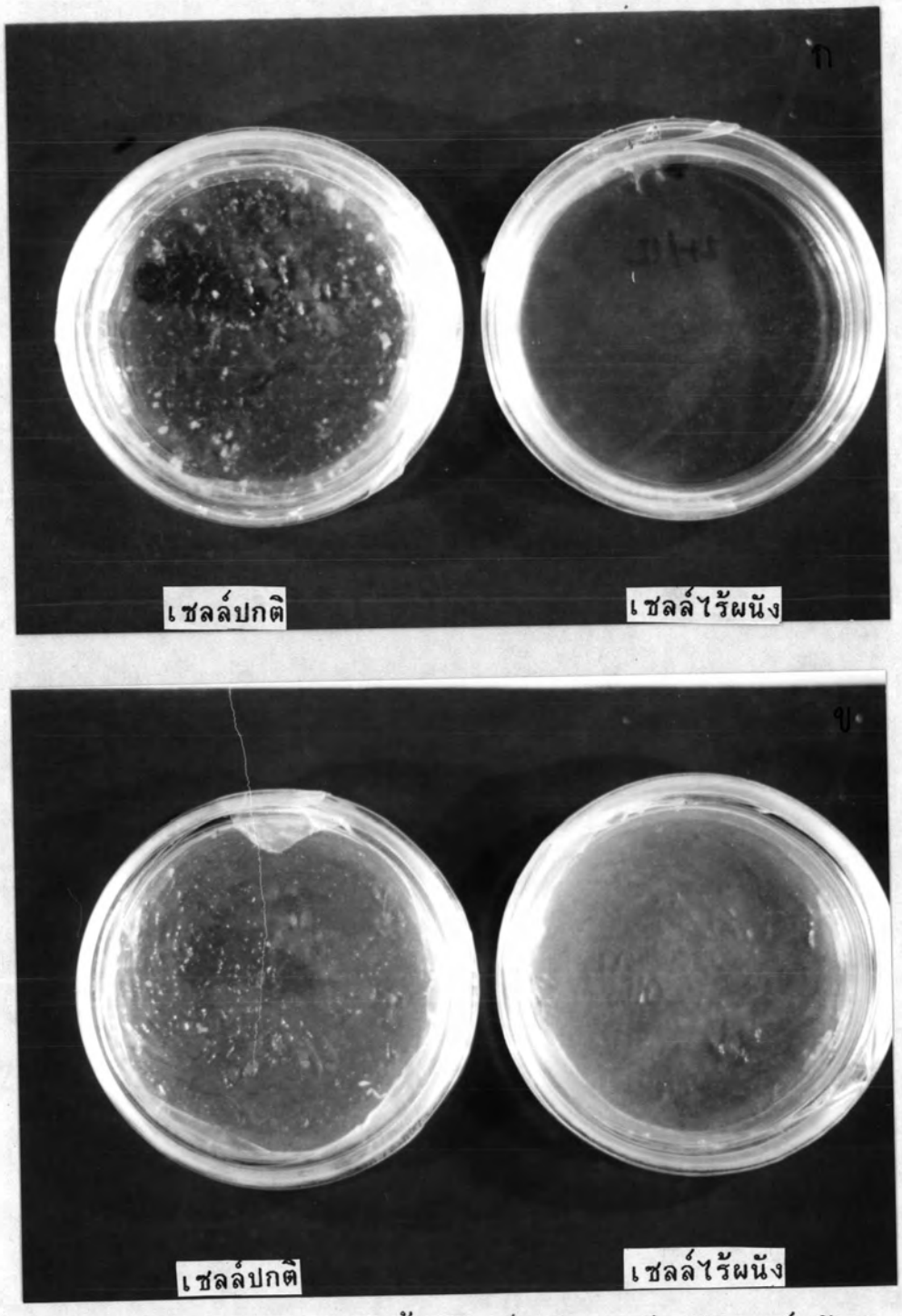
ภายหลังการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังเกิดขึ้นประมาณ 4-7 วัน ย้ายเซลล์ไร้ผนังลงไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิม

ตารางที่ 16 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนแคลลัสต่อความมีชีวิตและการแบ่งเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังสูตรมาตรฐานของการทดลอง

Cutivar	Protoplast density (protoplasts/ml in2 ml culture medium	Viability(%) at days			Division(%) at days		
		0	7	21	0	7	21
Si Samrong2	0.5×10^5	40.0	28.5	26.7	0	0	0
	1.0×10^5	33.3	30.0	16.6	0	2.0	2.2
	2.0×10^5	38.5	35.7	29.6	0	2.0	1.9
	5.0×15^5	43.7	36.3	35.0	0	1.0	2.0
Noi	0.5×10^5	42.8	37.5	35.0	0	0	0
	1.0×10^5	50.0	44.4	42.8	0	10.5	8.1
	2.0×10^5	71.4	40.0	35.0	0	5.0	3.0
	5.0×10^5	58.3	54.5	50.0	0	7.0	10.0

หมายเหตุ เฉลี่ยจากที่ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 การทดลอง

แต่ให้ได้รับความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (ตามวิธีข้อ 2.18) เทียบกับการเลี้ยงเซลล์ปกติ ที่มีการสร้างเป็นกลุ่มเซลล์ขึ้นมาได้ ส่วนเซลล์ไร้ผนังที่เพาะเลี้ยงไม่สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์(รูปที่ 50) ผลการทดลองที่เกิดขึ้นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่า การสร้างผนังเซลล์ที่เกิดขึ้นไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะทำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการเจริญจึงไม่เพียงพอ ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ต่ำ



รูปที่ 50 ลักษณะการเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ เทียบกับเซลล์ไร้ผนังในอาหารแข็งสูตรมาตรฐานของการทดลอง

ก. ศรีสำโรง 2

ข. ฝ้ายน้อย