บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกและระยะการพัฒนาของละอองเรณูคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

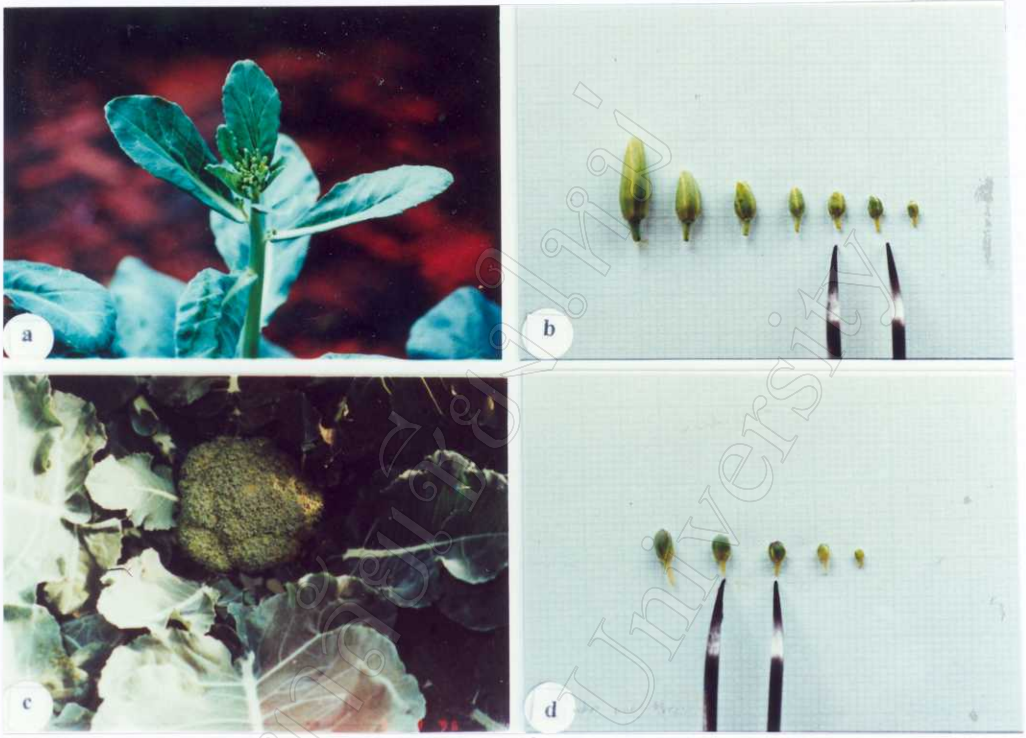
คะน้าจีนและบร็อคโคลี่เริ่มเข้าสู่ระยะแทงช่อดอกหลังจากย้ายปลูกลงแปลงปลูกประมาณ 45 และ 70 วันตามลำดับ หลังจากเก็บดอกตูมขนาดต่างๆ มาตรวจสอบหาระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแบ่งขนาดดอก (วัดจากฐานรองดอกถึงปลายดอก) ออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ 1.1-1.5, 1.6-2.5, 2.6-3.5, 3.6-4.5 และมากกว่า 4.5 มม. (ภาพที่ 1) ผลการตรวจดูการพัฒนาของละอองเรณูพบว่าสามารถแบ่งระยะการพัฒนาออกเป็นระยะต่างๆ ดังนี้

1) ระยะ pollen mother cell เป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะเริ่มแรก มีลักษณะกลม และมีการแบ่งตัวแบบ meiosis เพื่อเตรียมเข้าสู่ระยะ pollen tetrad แต่ไม่สามารถมองเห็นการแยกตัวของโครโมโซมได้ หลังแยกออกจากกันจะมี cellulose มาห่อหุ้ม (ภาพที่ 2a)

2) ระยะ pollen tetrad หลังจากที่ pollen mother cell แบ่งแบบ meiosis เสร็จสิ้นแล้ว เริ่มเข้าสู่ระยะ pollen tetrad ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ 4 เซลล์ ที่เรียงกันอยู่ภายในถุง cellulose (ภาพที่ 2b)

3) ระยะ uninucleate หลังจาก cellulose ที่มีลักษณะคล้ายถุงสลายตัว เซลล์เดี่ยว ๆ แยกออกจากกันและเข้าสู่ระยะ uninucleate ซึ่งละอองเรณูระยะนี้มีลักษณะกลม ผนังบาง นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ ต่อมานิวเคลียสเริ่มหดตัว ขนาดเล็กลง และขณะเดียวกันจะค่อย ๆ เคลื่อนที่จากกลางเซลล์ไปยังขอบเซลล์ ผนังละอองเรณูหนาขึ้น และมีลักษณะเว้าเข้า 3 ด้าน (ภาพที่ 2c)

4) ระยะ starch grain ละอองเรณูในระยะนี้มีการสร้างแป้งมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในระยะนี้ได้ ผนังที่เว้าเข้า 3 ด้าน มีลักษณะกลมและหนาขึ้น ละอองเรณูมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 2d)



ภาพที่ 1 ระยะพัฒนาการของดอกคะน้าจีนและบร็อคโคลี่สำหรับเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู
a-b) ลักษณะช่อดอกคะน้าจีน และขนาดดอกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง
c-d) ลักษณะช่อดอกบร็อคโคลี่ และขนาดดอกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

ผลการตรวจดูระยะการพัฒนาของละอองเรณูกับขนาดของดอก พบว่ามีความสัมพันธ์กันโดยตรง คือ ดอกที่มีขนาดเดียวกันส่วนใหญ่มีระยะการพัฒนาของละอองเรณูอยู่ในระยะเดียวกัน โดยพบว่าดอกคะน้าจีนที่มีขนาดดอกอยู่ระหว่าง 2.6-3.5 มม. มีละอองเรณูระยะ uninucleate มากที่สุด คือ 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เช่นเดียวกับดอกบร็อคโคลี่ที่มีขนาด 2.6-3.5 มม. ตรวจพบระยะ uninucleate มากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ดังนั้นดอกขนาด 2.6-3.5 มม. จึงเหมาะสมต่อการนำอับละอองเรณูไปเพาะเลี้ยงมากกว่าดอกขนาดอื่น ๆ

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ดอกคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ที่มีการพัฒนาของละอองเรณูในระยะต่าง ๆ

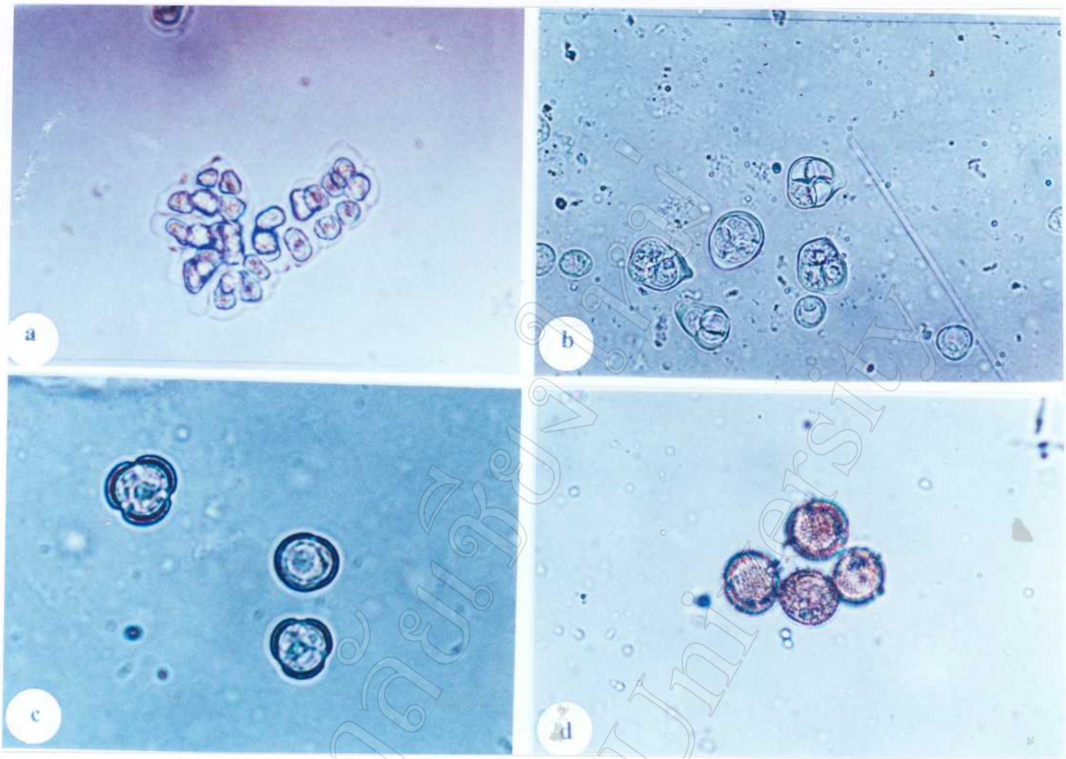
ขนาดดอก (มม.)	เปอร์เซ็นต์ดอกที่มีการพัฒนาของละอองเรณูในระยะต่าง ๆ			
	Pollen mother cell	Pollen tetrad	Uninucleate	Starch grain
1.1-1.5	90	10	-	-
1.6-2.5	20	30	50	-
2.6-3.5	-	10	90	-
3.6-4.5	-	-	10	90
มากกว่า 4.5	-	-	-	100

<u>หมายเหตุ</u> จำนวนดอกคะน้า 20 ดอก คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ดอกบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่มีการพัฒนาของละอองเรณูในระยะต่าง ๆ

ขนาดดอก (มม.)	เปอร์เซ็นต์ดอกที่มีการพัฒนาของละอองเรณูในระยะต่าง ๆ			
	Pollen mother cell	Pollen tetrad	Uninucleate	Starch grain
1.1-1.5	100	-	-	-
1.6-2.5	10	45	45	-
2.6-3.5	-	-	100	-
3.6-4.5	-	-	20	80
มากกว่า 4.5	-	-	-	100

<u>หมายเหตุ</u> จำนวนดอกบร็อคโคลี่ 20 ดอก คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์



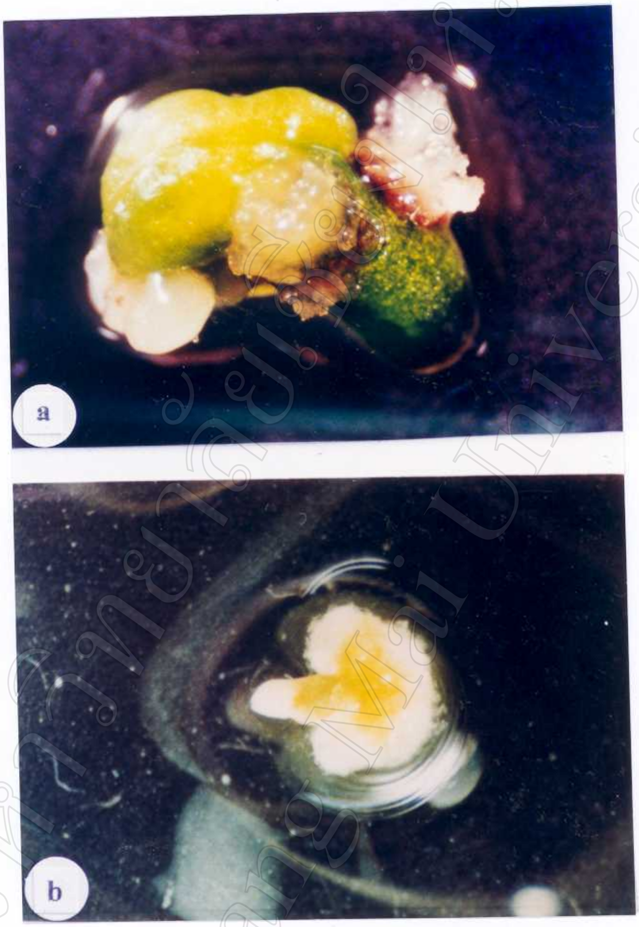
ภาพที่ 2 ระยะการพัฒนาของละอองเรณู a) ระยะ pollen mother cell b) ระยะ pollen tetrad c) ระยะ uninucleate d) ระยะ pollen grain

1.2 การพัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณู

1.2.1 ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ NAA ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

ผลการเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีน และบร็อคโคลี่ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร B_5 ทุกสูตร พบว่าอับละอองเรณูสามารถพัฒนาเป็นแคลลัส (indirect embryogenesis) แต่ไม่พบการเจริญเป็นต้นได้โดยตรง (direct embryogenesis) ในคะน้าตรวจพบการสร้างแคลลัสหลังจากเลี้ยงได้ 15 วัน โดยส่วนใหญ่แคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณส่วนปลายของอับละอองเรณู และมีสีเขียวอ่อน ลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) แต่บางอับละอองเรณูพัฒนาแตกต่างไป คือ อับละอองเรณูเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ขยายขนาดใหญ่หรือบวมขึ้น และเกิดลักษณะคล้ายแคลลัสสีขาวดันผนังอับละอองเรณูแตกออกมา (ภาพที่ 3a) สำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูบร็อคโคลี่ พบแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณส่วนปลายขั้วอับละอองเรณู มีลักษณะเกาะกันแน่น สีเขียวอ่อนบางแคลลัสสีเขียว

เข้ม (ภาพที่ 3b) แต่อับละอองเรณูของบร็อคโคลี่พัฒนาเป็นแคลลัสเร็วกว่าอับละอองเรณูของคะน้า ส่วนใหญ่ตรวจพบหลังจากเลี้ยงในอาหารประมาณ 10-12 วัน หลังจากนั้นแคลลัสเจริญขยายขนาดอย่างรวดเร็ว บางแคลลัสสามารถเจริญปกคลุมทั้งอับละอองเรณูได้ภายในเวลา 20 วัน



ภาพที่ 3 a) การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับละอองเรณูของคะน้าจีน
b) การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับละอองเรณูบร็อคโคลี่

ผลการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA จำนวน 3 ระดับ ที่เติมลงในอาหารต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ให้เจริญเป็นแคลลัส พบว่าจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสของพืชทั้งสองชนิดที่เลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลต่อจำนวนอับละอองเรณูของคะน้าและบร็อคโคลี่ที่พัฒนาเป็นแคลลัส โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีจำนวนอับละอองเรณูของคะน้าที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดคือ 20.1% แตกต่างกับ

ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. ซึ่งมีจำนวนอับละอองเรณูของคะน้าที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 11.8 และ 10.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 0.1 มก./ล. มีจำนวนอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 6.3% แตกต่างกันทางสถิติกับที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. ซึ่งมีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสได้สูงสุดเฉลี่ย 22.9 และ 20.5% อับ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ในขณะที่ผลของความสัมพันธ์ร่วมระหว่าง 2,4-D และ NAA พบว่ามีผลต่อจำนวนอับละอองเรณูของคะน้าที่พัฒนาเป็นแคลลัส แต่ไม่มีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ (ตารางภาคผนวกที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์จำนวนอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ที่พัฒนาเป็นแคลลัส ในอาหารสูตร B_5 ที่เติม 2,4-D และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น 2,4-D (มก./ล.)	ระดับความเข้มข้น NAA (มก./ล.)			
	0.1	0.5	1.0	เฉลี่ย
0.1	15.6	35.4	9.4	20.1a
0.5	12.5	7.3	15.6	11.8b
1.0	15.6	6.3	9.4	10.4b
เฉลี่ย	14.6	16.3	11.5	14.12

$LSD_{0.05}$ = 4.27 (2,4-D)

CV = 36.14%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์จำนวนอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่พัฒนาเป็นแคลลัส ในอาหารสูตร B_5 ที่ดัดเติม 2,4-D และ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น 2,4-D (มก./ล.)	ระดับความเข้มข้น NAA (มก./ล.) 0.1	0.5	1.0	เฉลี่ย
0.1	6.3	4.2	8.3	6.3b
0.5	33.3	11.5	24.0	22.9a
1.0	13.5	17.7	30.2	20.5a
เฉลี่ย	17.7	11.1	20.8	16.55

$LSD_{0.05}$ = 9.27 (2,4-D)

CV = 66.9%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนในอาหารเหลวสูตร B_5 ดัดแปลงจำนวน 10 สูตร พบว่าจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสมีความแตกต่างกัน โดยในอาหารสูตรที่ 2 จำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ 35.4% แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสในอาหารสูตรที่ 1, 3, 4, 6, 7 และ 9 ซึ่งมีจำนวนอับละอองเรณูที่เกิดแคลลัสเฉลี่ย คือ 15.6, 9.4, 12.5, 15.6, 15.6 และ 9.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ในขณะที่อาหารสูตรที่ 10 ที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ พบว่าอับละอองเรณูส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์จำนวนอับละอองเรณูคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ที่พัฒนาเป็นแคลลัสในอาหารเหลวดัดแปลงสูตรต่าง ๆ

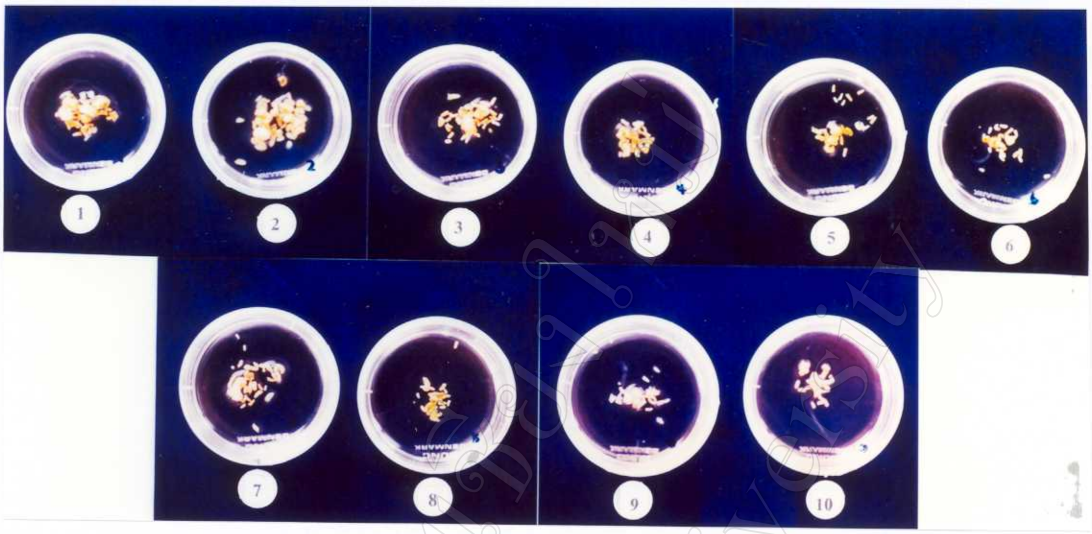
สูตรอาหาร	จำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%)
1	15.6b
2	35.4a
3	9.4bc
4	12.5bc
5	7.3c
6	15.6b
7	15.6b
8	6.3c
9	9.4bc

$LSD_{0.05}$ = 7.4

CV = 36.14%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ส่วนผลการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ในอาหารเหลวสูตร B_5 ดัดแปลง จำนวน 10 สูตร พบว่าจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสมีความแตกต่างเช่นเดียวกันกับคะน้า คือ ในอาหารสูตรที่ 4 และ 9 มีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสได้เฉลี่ยสูงสุด คือ 33.3 และ 30.2% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรที่ 6 และ 8 ที่มีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 24.0 และ 17.7% ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารสูตรที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 ซึ่งมีแคลลัสเกิดขึ้นเฉลี่ยเพียง 6.3, 4.2, 8.3, 11.5 และ 13.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ในอาหารสูตรที่ 10 ที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ พบว่าไม่มีอับละอองเรณูที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้



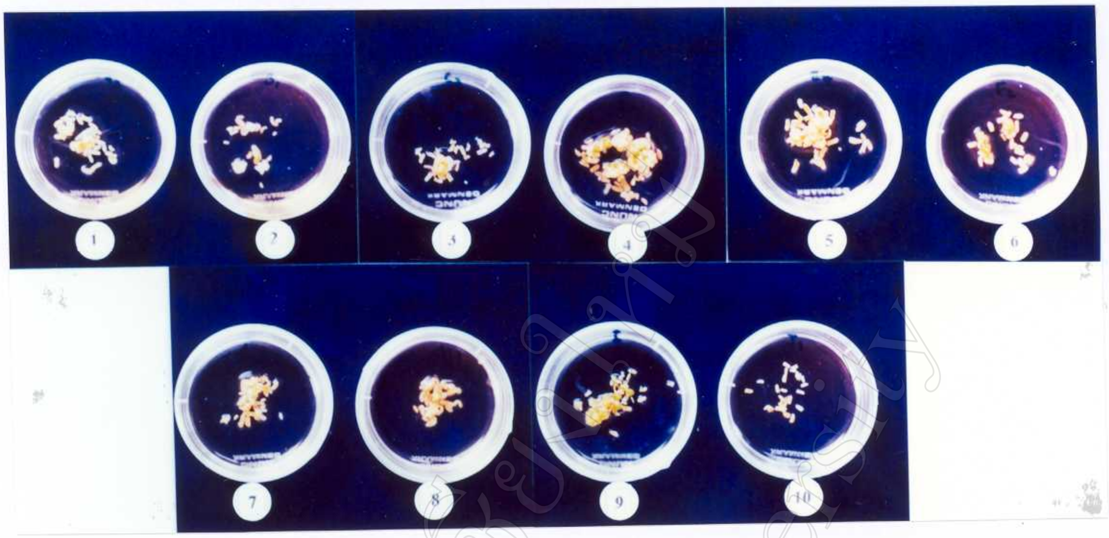
ภาพที่ 4 การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับละอองเรณูคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ในอาหารสูตร B_5 ดัดแปลงสูตรต่างๆ จำนวน 10 สูตร

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์จำนวนอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่พัฒนาเป็นแคลลัสในอาหารเหลวดัดแปลงสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	จำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%)
1	6.3c
2	4.2c
3	8.3bc
4	33.3a
5	11.5bc
6	24.0ab
7	13.5bc
8	17.7abc
9	30.2a

$LSD_{0.05}$ = 16.07 CV = 66.9%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 5 การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับละอองเรณูบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ในอาหารสูตร B_5 ดัดแปลงสูตรต่างๆ จำนวน 10 สูตร

1.2.2 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

จากการเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนบนอาหารสูตร B_5 ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล. และบร็อคโคลี่บนอาหารสูตรเดียวกันที่เติม 2,4-D 0.5 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. น้ำตาลในระดับความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครสในแต่ละความเข้มข้นมีผลต่อจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสได้ต่างกัน กล่าวคือ อับละอองเรณูของคะน้าจีนที่เลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาให้จำนวนแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดคือ 27.1% ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 24.0 และ 17.7% ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้น 2 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นเฉลี่ยเพียง 10.42 และ 15.3% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์จำนวนอับละอองเรณูคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ที่พัฒนาเป็นแคลลัสในอาหารสูตร B_5 ที่เติมน้ำตาลซูโครสในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	จำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%)
2	10.4c
4	27.1a
6	24.0ab
8	17.7abc
10	15.6bc

$LSD_{0.05}$ = 10.54

CV = 36.88%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สำหรับจำนวนอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 34.4% ในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารที่เติมน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเกิดขึ้นเฉลี่ย 32.3% แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่เติมน้ำตาล 2, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 8.3, 17.7 และ 22.9% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

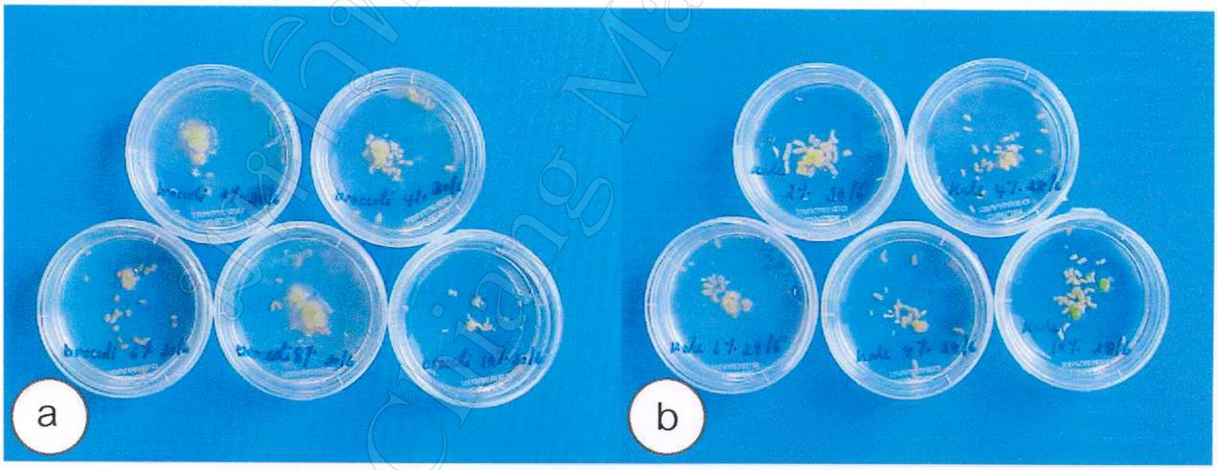
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์จำนวนอับละอองเรณูบร๊อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่พัฒนาเป็นแคลลัสในอาหารสูตร B_5 ที่เติมน้ำตาลซูโครสในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล (%)	จำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส
2	8.3d
4	34.4a
6	32.3ab
8	17.7cd
10	22.9bc

$LSD_{0.05}$ = 10.66

CV = 30.59%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 6 ระดับน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นแคลลัสของอับละอองเรณู a) คะน้าจีน b) บร็อคโคลี่

1.3 การเปรียบเทียบวิธีการ pretreatment ดอกคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และดอกบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ต่อการพัฒนาอับละอองเรณูให้เป็นแคลลัส

ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นดอกคะน้าจีน โดยการเก็บช่อดอกไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติของจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสที่เก็บไว้ในระยะเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยพบว่าช่อดอกคะน้าจีนที่ไม่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ มีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ 27.1% แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเก็บที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 24 และ 17.7% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติกับการเก็บไว้ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย 8.3% (ตารางที่ 11)

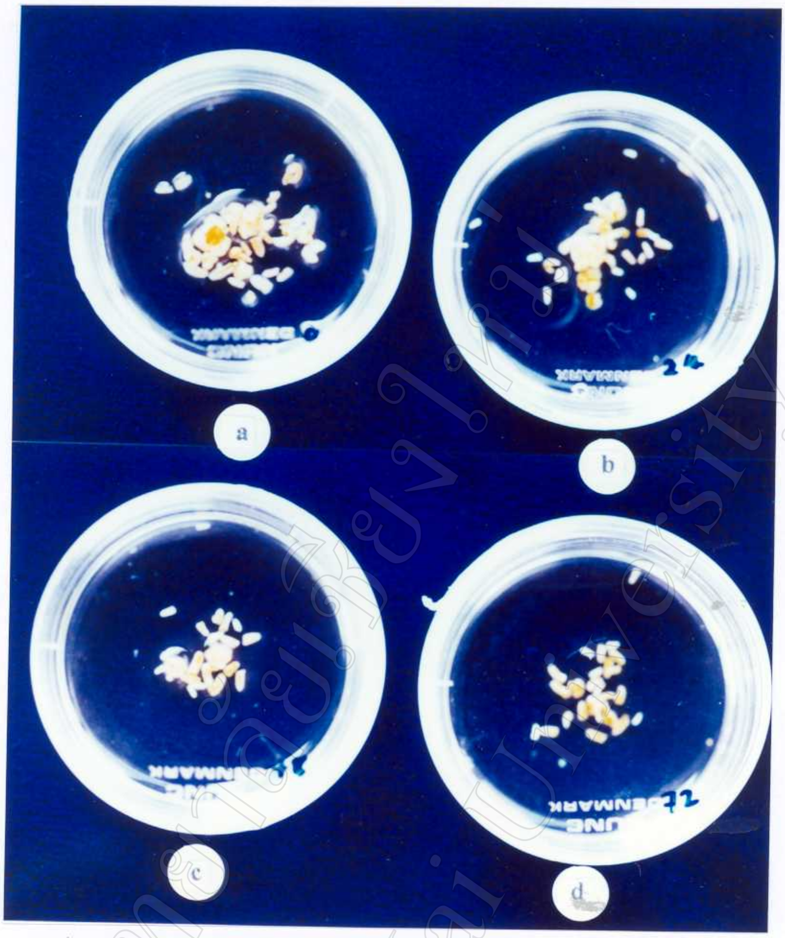
ตารางที่ 11 จำนวนอับละอองเรณูที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ที่ผ่านการ pretreat ช่อดอกที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลา pretreat (ชั่วโมง)	จำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส
0	27.1a
24	24.0a
48	17.7ab
72	8.3c

$LSD_{0.05}$ = 9.53

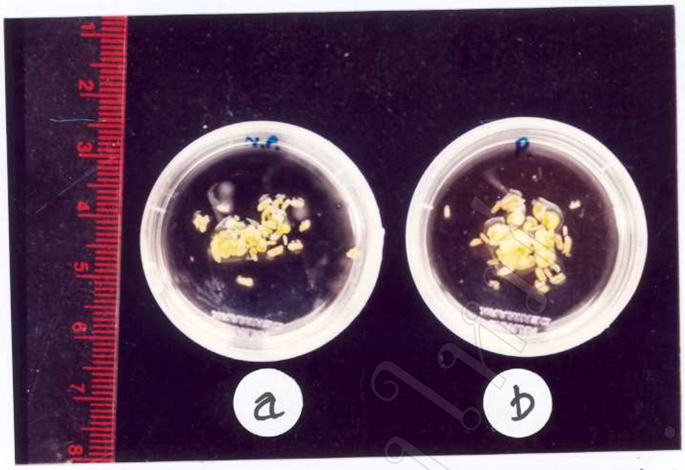
CV = 32.13%

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 7 การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับละอองเรณูของดอกคะน้าจีนที่ผ่านการเก็บดอกไว้ที่อุณภูมิต่ำ 4 °ซ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ a) ไม่ผ่านการ pretreatment b-d) ผ่านการ preatreat ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ

สำหรับการกระตุ้นอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่โดยการนำช่อดอกแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตามด้วย 40 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำอับละอองเรณูมาเพาะเลี้ยง พบว่ามีจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 18.8% แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับช่อดอกที่ไม่ผ่านการกระตุ้น โดยมีจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ย คือ 21.9%



ภาพที่ 8 การพัฒนาของแคลลัสของอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่

a) ไม่ผ่านการ pretreatment

b) ผ่านการแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย 40 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.4 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัสให้เจริญเป็นต้นในคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green king

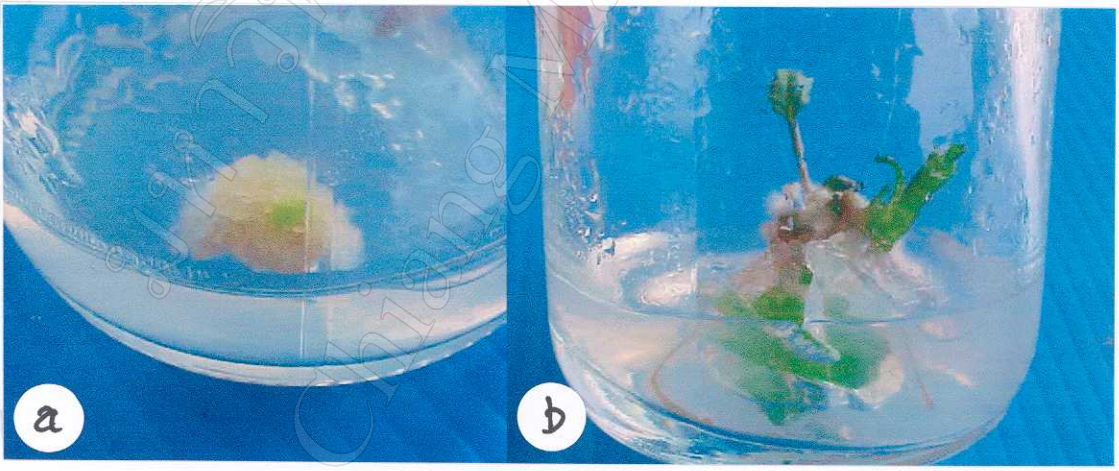
เมื่อย้ายแคลลัสของคะน้าจีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูบนอาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดยเติมฮอร์โมน 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. มาชักนำให้พัฒนาเป็นต้น โดยเปรียบเทียบสูตรอาหารดัดแปลง B_5 และ MS จำนวน 7 สูตร พบว่าหลังจากเลี้ยง 60 วัน เกิดยอดบนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ BAP 0.1 มก./ล. IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล. (อาหารสูตร 4) ในขณะที่แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 ทั้งสองสูตร (อาหารสูตร 1 และ 2) แคลลัสมีสีเขียวอ่อน มีขนาดใหญ่กว่าเดิม แต่ไม่พบการพัฒนาของยอด สำหรับการพัฒนาของแคลลัสในอาหารสูตรอื่น ๆ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 12 สำหรับการเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสของบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูในอาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดยเติมฮอร์โมน 2,4-D 0.5 มก./ล.ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. ให้เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าหลังจากเลี้ยง 45 วัน แคลลัสของบร็อคโคลี่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ BAP 0.25 มก./ล., IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.(อาหารสูตร 5) ในขณะที่แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 ทั้งสองสูตร (อาหารสูตร 1 และ 2) แคลลัสขยายขนาดใหญ่กว่าเดิม มีสีเขียวอ่อน แต่ไม่พบการพัฒนาของยอด สำหรับการพัฒนาของแคลลัสในอาหารสูตรอื่น ๆ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาพที่ 9 พัฒนาการของต้นอ่อนคะน้าจีนจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

a) ลักษณะแคลลัสที่ได้จากเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5

b) การพัฒนาเป็นต้นบนแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.1 มก./ล., IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.



ภาพที่ 10 พัฒนาการของต้นอ่อนบร็อคโคลี่จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

a) ลักษณะแคลลัสที่ได้จากเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5

b) การพัฒนาเป็นต้นบนแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.25 มก./ล., IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

ตารางที่ 12 พัฒนาการของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 ให้เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตร อาหาร	การพัฒนาของแคลลัสคะน้า หลังจากเลี้ยงบนอาหาร 60 วัน				
	ขนาด	สี	ลักษณะเซลล์	ยอด	ราก
1	+++	แคลลัสมีสีขาวอมเขียว แต่บางแคลลัสเป็นสีขาวอมเหลืองอ่อน	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	เกิดรากฝอย สีขาว ต่อมาเกิดรากขนาดใหญ่
2	++++	แคลลัสมีสีขาวอมเหลือง แต่บางแคลลัสมีสีขาวอมเขียวเล็กน้อย	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	เกิดรากฝอย สีขาวต่อมาเกิดรากขนาดใหญ่
3	+++	แคลลัสมีสีขาวอมเขียวอ่อน บางแคลลัสมีสีขาวอมเหลือง	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก
4	+++	แคลลัสส่วนใหญ่มีสีขาวซีด บางส่วนมีสีขาวอมเขียวและสีเขียวเข้ม	เกาะกันแน่น	มีการสร้างยอด	เกิดรากหลังจากเกิดยอด
5	++	แคลลัสมีสีขาวอมเหลือง บางอันเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก
6	++	แคลลัสส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีขาวอมเหลือง บางอันสีขาวซีด	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก
7	+++	แคลลัสมีลักษณะขาวออกเหลือง แต่บางส่วนมีสีน้ำตาลเข้ม	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก

<u>หมายเหตุ</u> ++++ หมายถึงขนาดของแคลลัสเพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากกว่า 0.8 มม. +++ ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้น 0.5 มม. ++ ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้น 0.3 มม. + ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 0.3 มม.

ตารางที่ 13 การพัฒนาของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเรณูบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	การพัฒนาของแคลลัสบร็อคโคลี่ ที่เลี้ยงบนอาหาร 45 วัน				
	ขนาด	สี	ลักษณะเซลล์	ยอด	ราก
1	++++	แคลลัสส่วนใหญ่มีสีขาวอมเขียว แต่บางแคลลัสเป็นสีขาวหรือเหลืองซีด	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	เกิดรากฝอย สีขาว
2	++++	แคลลัสมีสีขาวอมเขียว แต่บางแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวเล็กน้อย	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	เกิดรากฝอย สีสีขาว
3	++	แคลลัสส่วนใหญ่มีสีขาวซีด บางแคลลัสมีสีเหลืองออกน้ำตาลดำ	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก
4	+++	แคลลัสมีสีขาวซีด บางส่วนมีสีน้ำตาล	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก
5	++	แคลลัสมีสีขาวอมเขียว บางแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม และสีขาวซีด	เกาะกันแน่น	เกิดยอดบนแคลลัส	ไม่พบการเกิดราก
6	+	แคลลัสส่วนใหญ่เป็นสีน้ำตาลเข้ม	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก
7	++	แคลลัสมีลักษณะขาวซีด แต่บางแคลลัสมีสีน้ำตาลเข้ม	เกาะกันแน่น	ไม่สร้างยอด	ไม่พบการเกิดราก

หมายเหตุ++++ หมายถึงขนาดของแคลลัสเพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากกว่า 0.8 มม. +++ ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้น 0.5 มม. ++ ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้น 0.3 มม. + ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 0.3 มม.

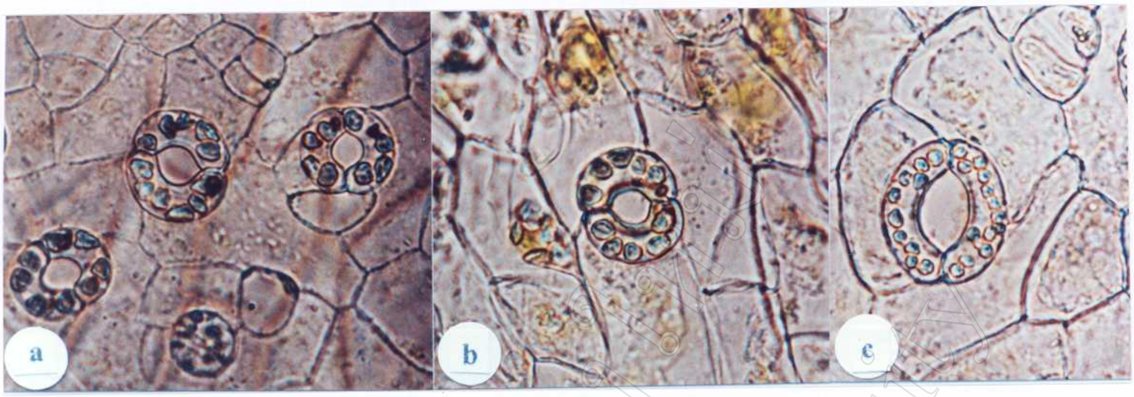
2. การตรวจสอบระดับชุดโครโมโซม (ploidy level) ของต้นคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูโดยการตรวจนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณเซลล์ปากใบ

ผลการตรวจนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณเซลล์ปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของต้นคะน้าจีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจำนวน 4 ต้น เปรียบเทียบกับต้นปกติ (2n) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่เลี้ยงภายใต้สภาพปลอดเชื้อ พบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่ของเซลล์ปากใบของต้นคะน้าจีนทั้ง 4 ต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับต้นคะน้าปกติ คือ มีจำนวนเฉลี่ยของเม็ดคลอโรพลาสต์ต่อคู่ของเซลล์ปากใบของต้นที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 4.72, 5.61, 5.57 และ 5.43 เม็ด ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบของต้นคะน้าจีนปกติ คือ 5.06 เม็ด สำหรับการตรวจนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณเซลล์ปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของต้นบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูจำนวน 3 ต้น เปรียบเทียบกับต้นบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด (2n) ที่เลี้ยงภายใต้สภาพปลอดเชื้อ พบว่าต้นบร็อคโคลี่ต้นที่ 1 และ 2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบเท่ากับ 10.14 และ 10.61 เม็ด ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับต้นบร็อคโคลี่ต้นที่ 3 ที่มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบ 6.407 และในขณะเดียวกันต้นบร็อคโคลี่ทีได้จากการเลี้ยงอับละอองเรณูทั้ง 3 ต้น มีความแตกต่างกันกับต้นบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ซึ่งมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบ 5.275 เม็ด (ดังตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบของต้นบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและต้นบร็อคโคลี่ปกติ (2n)

ต้นที่	จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อเซลล์คู่ปากใบ
1	10.41a
2	10.61a
3	6.40b
4	5.27c

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 %

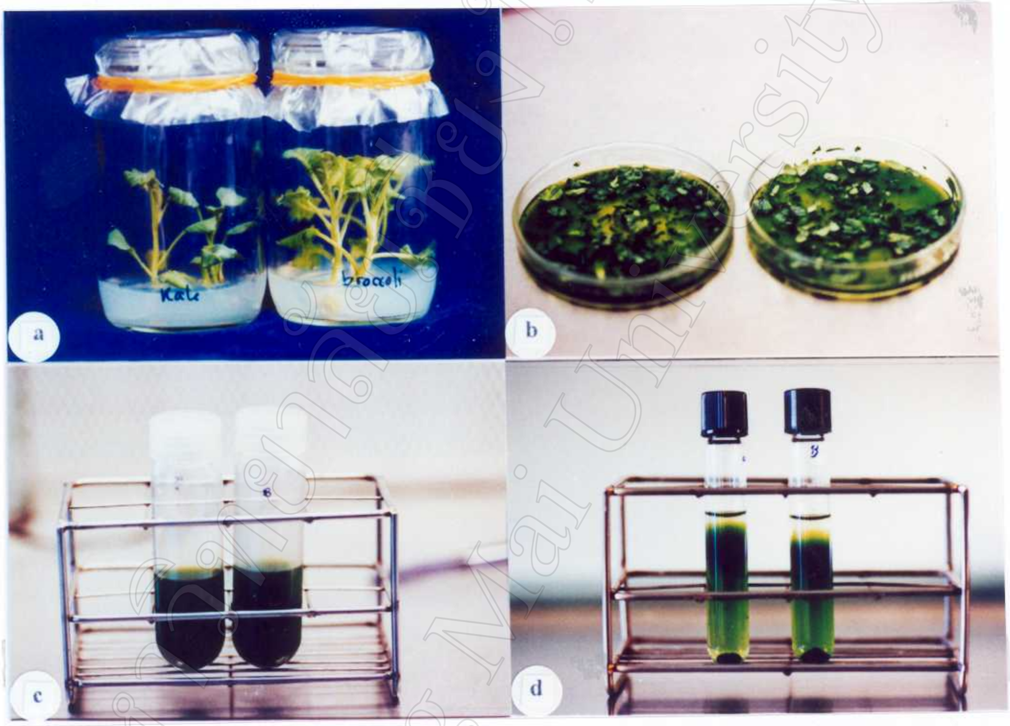


ภาพที่ 11 เซลล์ปากใบและการเรียงตัวของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู a) ต้นคะน้าจีน (diploid) b) ต้นบร็อคโคลี่ (diploid) และ c) ต้นบร็อคโคลี่ (polyploid)

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างคะน้าจีนและบร็อคโคลี่

การทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบคู่ที่ 2-4 ของต้นคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ในสภาพปลอดเชื้อที่มีอายุ 3-4 สัปดาห์ พบว่าการลอกเซลล์บริเวณด้านใต้ท้องใบของคะน้าจีนค่อนข้างยากกว่าใบบร็อคโคลี่ เนื่องจากใบอ่อนและบาง ฉีกขาดง่าย ในขณะที่ใบบร็อคโคลี่แข็ง หนา และเหนียวกว่า หลังจากผึ่งทิ้งไว้สักครู่ช่วยทำให้ลอกง่าย และฉีกขาดน้อยกว่า การแช่ใบพืชทั้งสองชนิดในสารละลายเอนไซม์เพื่อย่อยให้เซลล์หลุดจากกันนั้น พบว่าเซลล์ของคะน้าจีนถูกย่อยให้หลุดจากกันได้ง่ายกว่าบร็อคโคลี่ และเมื่อเปรียบเทียบการแยกโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดของใบคะน้าซึ่งมีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 20-23 ใบ กับใบบร็อคโคลี่ซึ่งมีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 15-17 ใบ หลังจากแยกและนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนมีลักษณะกลม เต่ง ใส สามารถมองเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์ได้ชัดเจน ในขณะที่โปรโตพลาสต์ของบร็อคโคลี่มีลักษณะกลม เต่ง เช่นเดียวกันแต่ขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย สามารถมองเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวขนาดใหญ่ที่กระจายอยู่ทั่วภายในโปรโตพลาสต์ หลังจากหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ที่ได้ลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ แล้วนำไปตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนที่ได้ $5x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อมล.ต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนบร็อคโคลี่ได้มีจำนวน $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมล.ต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งปริมาณดังกล่าวเพียงพอต่อการรวมโปรโตพลาสต์ ในการย้อมโปรโตพลาสต์บร็อคโคลี่ด้วยสารละลาย neutral red เพื่อให้เกิดความแตกต่างกับโปรโตพลาสต์ของ

คะน้าจีนนั้น พบว่า การใช้สารละลาย neutral red ที่ความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 250 µl ผสมกับ mannitol 1 มล. และย้อมโปรโตพลาสต์เป็นระยะเวลา 30 นาที สามารถย้อมติดส่วนของ vacuole เป็นสีแดง แต่เมื่อนำโปรโตพลาสต์ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์มีลักษณะแฟบ หลังจากล้างโปรโตพลาสต์ด้วย washing solution เซลล์กลับกลม และเต่งขึ้น



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่

a) ต้นคะน้าจีน (ซ้าย) และบร็อคโคลี่ (ขวา) ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

b) เซลล์ของใบคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่ถูกย่อย หลังจากแช่ในส่วนประกอบของเอนไซม์ 4 .5 ชั่วโมง

c) โปรโตพลาสต์ของคะน้าจีน (ซ้าย) และบร็อคโคลี่ (ขวา) ในอยู่ในสารละลายเอนไซม์

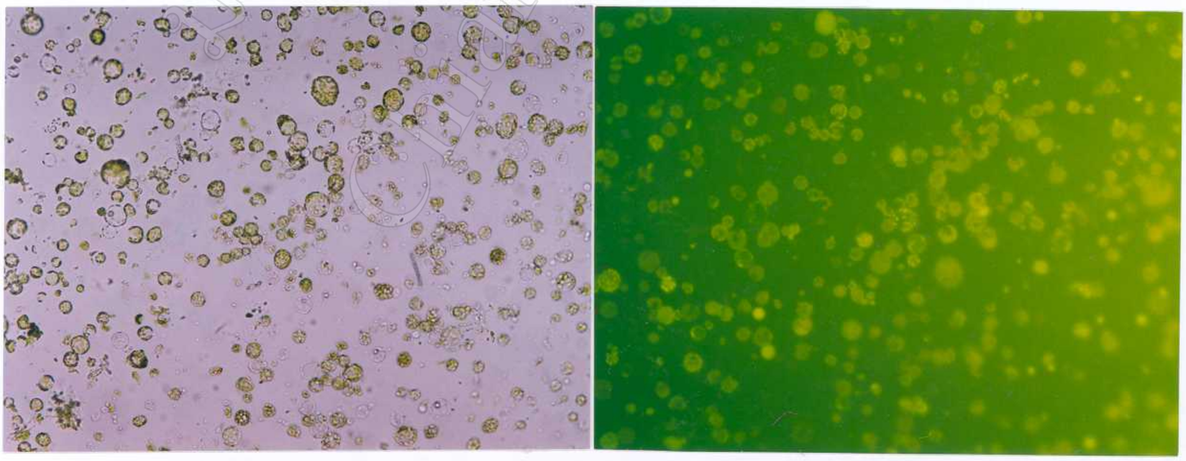
d) การเตรียมโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์โดยการปั่นบนน้ำตาลซูโครส 25% คะน้าจีน (ซ้าย) บร็อคโคลี่ (ขวา)

ในการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์คะน้าจีน บร็อคโคลี่ และโปรโตพลาสต์ลูกผสมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และ mannitol 0.5 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสทำปฏิกิริยากับ FDA แล้วเกิดการเรืองแสงสีเขียวภายใต้คลื่นอุลตราไวโอเลต เมื่อวัดความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ดังกล่าวพบว่าโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด คือ 77.99% รองลงมาคือ โปรโตพลาสต์ของบร็อคโคลี่ และโปรโตพลาสต์ลูกผสมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 70.54 และ 69.38% ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์คะน้าจีน บร็อคโคลี่และโปรโตพลาสต์ลูกผสม

แหล่งโปรโตพลาสต์	จำนวนโปรโตพลาสต์	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง	% ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์
คะน้าจีน	97.95a	76.25a	77.99
บร็อคโคลี่	86.75b	61.25b	70.57
คะน้าจีนxบร็อคโคลี่	86.25b	56.00b	69.38
$LSD_{0.01}$	6.87	7.94	NS
CV (%)	4.76	7.69	7.35

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



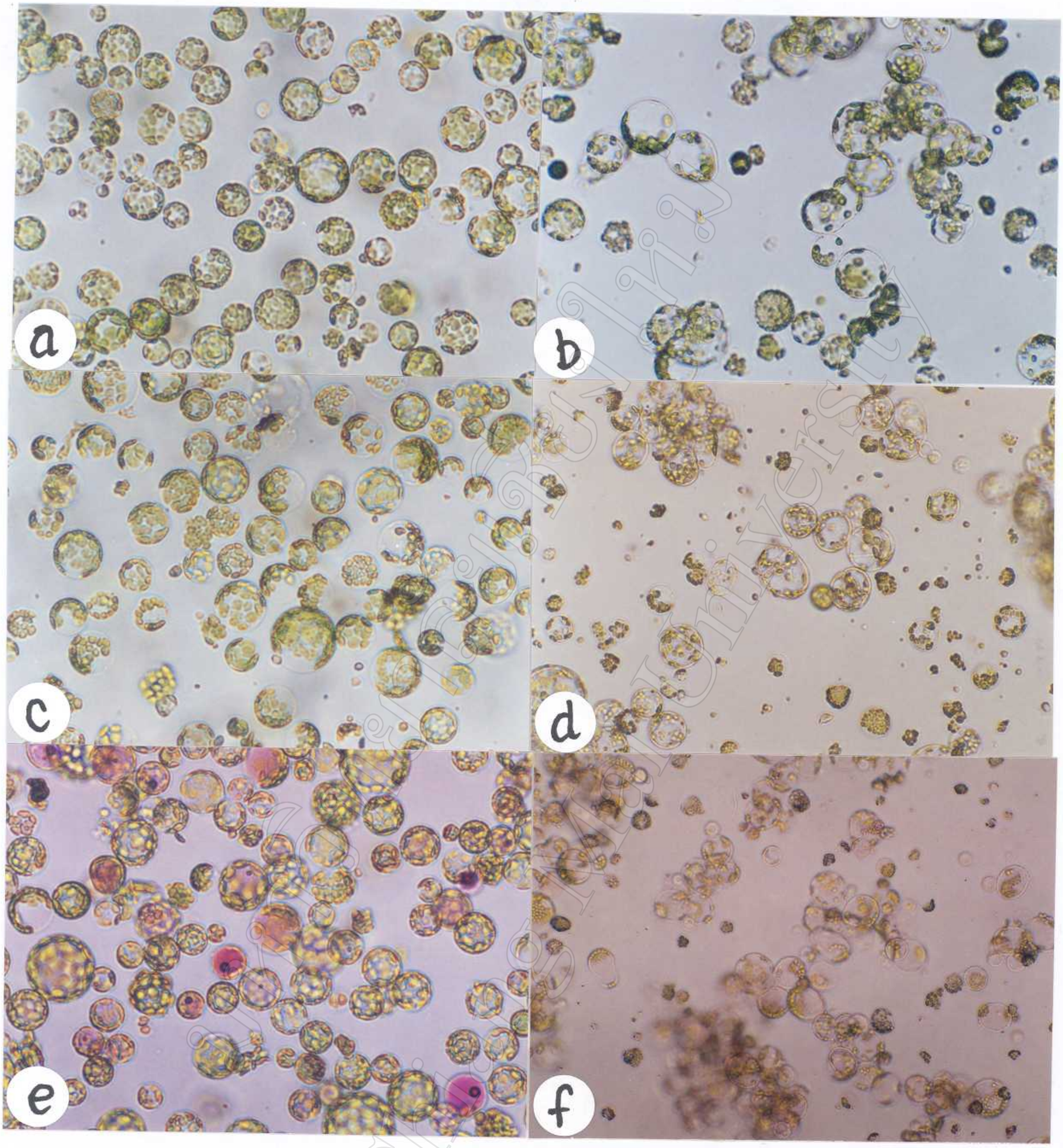
ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลูกผสม ในอาหารสูตร PS (1981) หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน

ผลการตรวจสอบพัฒนาการโปรโตพลาสต์ หลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์ดังกล่าวในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และ mannitol 0.5 โมลาร์ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 24-72 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่เริ่มสร้างผนังเซลล์ และสามารถสร้างได้เร็วกว่าโปรโตพลาสต์ลูกผสมเล็กน้อย สำหรับพัฒนาการโปรโตพลาสต์ด้านการแบ่งเซลล์ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน บางโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่มีลักษณะกลม เต่ง ใส สามารถมองเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์ และ cytoplasmic stand ภายในเซลล์ได้ชัดเจน นอกจากนั้นบางโปรโตพลาสต์เริ่มเกิดการแบ่งเซลล์ โดยพบว่าเซลล์มีลักษณะรี ยาว บริเวณกลางเซลล์เริ่มคอดเว้าเข้าหากันเล็กน้อย สีของผนังเซลล์เข้มและหนาขึ้น เม็ดคลอโรพลาสต์กระจายทั่วเซลล์และมีสีเขียวเข้มขึ้น โดยเปอร์เซ็นต์ของโปรโตพลาสต์คะน้าจีนเกิดการแบ่งเซลล์สูงสุดคือ 7.08% รองลงมาคือ บร็อคโคลี่และโปรโตพลาสต์ลูกผสม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เกิดขึ้น 5.76 และ 2.28% ตามลำดับ ส่วนอัตราการแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง 5 วัน ของโปรโตพลาสต์คะน้าจีน บร็อคโคลี่และโปรโตพลาสต์ลูกผสม พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 8.76, 6.64 และ 3.18% ตามลำดับ ในขณะที่หลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 11.99, 8.05 และ 3.67% ตามลำดับ แต่หลังการเพาะเลี้ยง 10 วัน เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของคะน้าจีนลดลงเหลือ 11.74 ในขณะที่บร็อคโคลี่ และลูกผสมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือ 8.34 และ 3.55% ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในระยะเวลาต่าง ๆ (วัน) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และเติมสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์

แหล่งโปรโตพลาสต์	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ในระยะเวลาต่าง ๆ (วัน)			
	3	5	7*	10
คะน้าจีน	7.08	8.79	11.99	11.74
บร็อคโคลี่	5.76	6.64	8.05	8.34
คะน้าจีน x บร็อคโคลี่	2.82	3.18	3.67	3.55

* หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน จึงดูดเอาอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3.0%, 2,4-D 0.1 มก./ล. BAP 1.0 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.4 โมลาร์



ภาพที่ 14 a) ลักษณะโปรโตพลาสต์คะน้าจีนหลังแยกมีสีเขียวเข้ม
b) โปรโตพลาสต์คะน้าจีนหลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน
c) ลักษณะโปรโตพลาสต์บร็อคโคลี่หลังแยกมีสีเขียวอ่อนใส
d) โปรโตพลาสต์บร็อคโคลี่หลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน
e) ลักษณะโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างคะน้าจีนและบร็อคโคลี่
f) โปรโตพลาสต์ลูกผสมหลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน

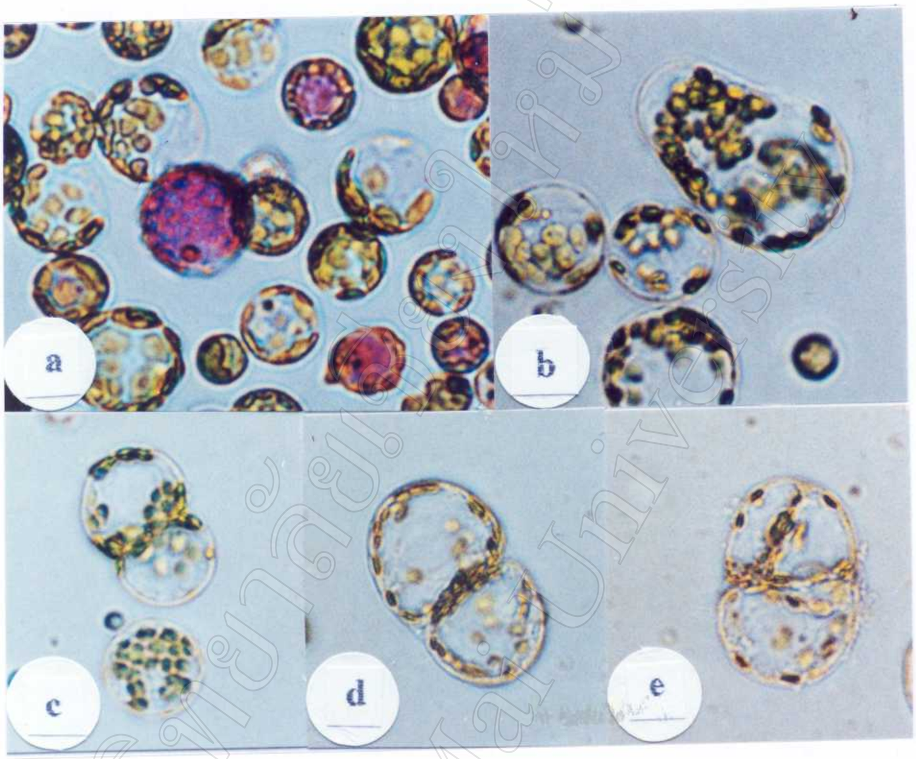
การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลูกผสมหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวดัดแปลงสูตรต่าง ๆ พบว่าในช่วง 2-3 วันแรกมีปริมาณการแบ่งเซลล์น้อย แต่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุ 5 และ 7 วัน โดยพบว่าในอาหารสูตร 3 ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล., NAA 1.0 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นสูงสุดคือ 9.70% รองลงมาคือ อาหารสูตร 2, 1 และ 4 ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ คือ 8.16, 4.10 และ 3.52% ตามลำดับ (ตารางที่ 16) หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน จึงเปลี่ยนเอาอาหารเก่าออก แล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล., BAP 1.0 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.4 โมลาร์ลงไป เมื่อตรวจสอบพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังจากเปลี่ยนอาหาร 3 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์เกิดการชะงักการแบ่งเซลล์ และไม่มีการสร้างผนังเซลล์มากั้นต่อ หลังจากนั้นเซลล์ค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีพัฒนาการต่อ และพบว่าเซลล์เริ่มเหี่ยวแฟบ

ตารางที่ 16 พัฒนาการโปรโตพลาสต์ลูกผสมในอาหารสูตรต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน

สูตรอาหาร	พัฒนาการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ [1] (%) หลังเพาะเลี้ยง 7 วัน
1	4.10c
2	8.16b
3	9.70a
4	3.52c
$LSD_{0.05}$	1.18
CV (%)	11.99

อักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[1] หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน จึงดูดเอาอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3.0%, 2,4-D 0.1 มก./ล. BAP 1.0 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.4 โมลาร์



ภาพที่ 15 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ เมื่อเพาะ เลี้ยงในอาหารสูตร PS ที่ดัดแปลงเติม 2,4-D 0.1 มก./ล., NAA 1.0 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และ mannitol 0.5 โมลาร์

a) โปรโตพลาสต์หลังผ่านกระบวนการรวมกันด้วยกระแสไฟฟ้า

b) ช่วงเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน

c-e) ลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลูกผสม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University