บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าพืชทั้งสองชนิดตอบสนองต่อการเลี้ยงได้ค่อนข้างดี ถึงแม้ว่าจำนวนอับละอองเรณูที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เป็นผลมาจากปัจจัยหลายประการ เริ่มตั้งแต่การจัดการสภาพแวดล้อมระหว่างการปลูกซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู (Bajaj, 1990) เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้ดอกจากต้นที่ปลูกในแปลงภายนอกโรงเรือนซึ่งอยู่บนพื้นที่สูง ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถควบคุมสภาพอากาศซึ่งค่อนข้างแปรปรวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิ ความเข้มแสงหรือระยะเวลาของการได้รับแสงให้พอเพียงหรือสม่ำเสมอ นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยทางดินทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณธาตุอาหารที่พืชควรได้รับเพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด จากสภาพปัจจัยดังกล่าว Dixon (1985) พบว่ามีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของพืช ดังนั้นจึงทำให้อับละอองเรณูมีคุณภาพต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นพืชที่ปลูกในสภาพควบคุมซึ่งพบว่าละอองเรณูมีคุณภาพสูงกว่า ซึ่ง Dunwell (1985) กล่าวว่าหากไม่สามารถควบคุมสภาพปัจจัยดังกล่าวให้สม่ำเสมอได้จะส่งผลให้การตอบสนองของอับละอองเรณูที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มีความแปรปรวนสูง และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของละอองเรณูต่ำ

เนื่องจากระยะการพัฒนาของละอองเรณูเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกระยะที่ถูกต้องและเหมาะสมเพื่อชักนำให้เป็นต้นแฮพพลอยด์ง่ายยิ่งขึ้น จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะการพัฒนาของละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่กับดอกขนาดต่างๆ พบว่ามีความสัมพันธ์กันโดยตรง คือ ดอกที่มีขนาดเล็กมีระยะการพัฒนาของละอองเรณูอยู่ในระยะที่อ่อนกว่าดอกที่มีขนาดใหญ่ ส่วนดอกที่มีขนาดใกล้เคียงกันพบว่ามีระยะการพัฒนาของละอองเรณูอยู่ในระยะเดียวกันสูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองในผักกาดขาวปลี และผักกาดหัวของพิทักษ์ (2537) และใน *B. napus* ssp. *oleifera* ของ Thurling and Chay (1984) นอกจากนั้นยังพบว่าดอกคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่มีขนาดระหว่าง 2.6-3.5 มม. มีจำนวนดอกที่มีละอองเรณูอยู่ในระยะ uninucleate สูงถึงร้อยละ 90 และ 100 ตามลำดับ ดังนั้นขนาดดอกในช่วงดังกล่าว

จึงเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Keller (1984) ที่รายงานว่าขนาดดอกของพืชสกุล *Brassica* ที่อยู่ระหว่าง 2.0-4.0 มม. มีละอองเรณูในระยะ uninucleate มากที่สุด และตอบสนองต่อการเลี้ยงมากที่สุด แต่ทั้งนี้ขนาดดอกที่มีระยะ uninucleate ของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ดังเช่น ขนาดดอกของ *B. napus* ssp. *olifera* ที่อยู่ในช่วง 2.0-3.0 มม. มีละอองเรณูในระยะ uninucleate มากที่สุด (Dunwell, 1985) ในขณะที่การทดลองของ Ockendon (1988) พบว่าขนาดดอกของกะหล่ำดาวที่อยู่ระหว่าง 4.0-5.0 มม. เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงมากที่สุด

อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของพืชในสกุล *Brassica* มีรายงานไว้หลายสูตร แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารสูตร B_5 (Gamborg, 1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) และมีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครส 10%, 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 0.1 มก./ล. ซึ่งสูตรดังกล่าว Dunwell (1984) กล่าวว่าได้พัฒนาขึ้นสำหรับใช้เลี้ยงละอองเรณูของพืชในสกุล *Brassica* โดยเฉพาะ จากผลการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นพบว่าละอองเรณูของพืชทั้งสองชนิดตอบสนองต่อการเลี้ยงในลักษณะเกิดการแบ่งตัวหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งพัฒนาเป็นกลุ่มของแคลลัส (indirect androgenesis) แต่ไม่สามารถเจริญเป็นเอมบริโอได้โดยตรง (Bajaj, 1990) ซึ่งการเกิดลักษณะเช่นนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต หรือปริมาณน้ำตาลซูโครส อย่างไรก็ตามจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเปรียบเทียบการพัฒนาของอับละอองเรณูของทั้งสองพืช พบว่าบร็อคโคลี่ตอบสนองต่อการเลี้ยงได้ดีกว่า สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็วและเจริญได้ดีกว่าคะน้าจีน

ฮอร์โมนจัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารและมีผลต่อความถี่ของการชักนำให้อับละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอหรือแคลลัส จากการพัฒนาสูตรอาหารโดยศึกษาความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA ที่เหมาะสม พบว่าอาหารสูตร 2 ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 0.5 มก./ล. เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนในครั้งนี้มากที่สุด สามารถชักนำให้อับละอองเรณูคะน้าจีนเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ 35.4% ซึ่งให้ผลดีกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ ส่วนผลการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูบร็อคโคลี่ในอาหารสูตร 4 ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. เหมาะสมมากที่สุดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 33.3% แต่ไม่ต่างจากอาหารสูตร 9 ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 1.0 มก./ล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด โดยมีแคลลัสเกิดขึ้นเฉลี่ย 30.2% แต่แคลลัสส่วนใหญ่ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเนื่องจากเกิดรากเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามผลการทดลองของบร็อคโคลี่ในครั้งนี้แตกต่างจากการรายงานของ Keller *et al.* (1978) ที่พบว่าอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่พันธุ์ Green mountain เกิดเอมบริโอเพิ่ม

ขึ้นสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 1.0 มก./ล. ซึ่งการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA ที่เหมาะสมแตกต่างกันนั้น Ferrie *et al.* (1995) กล่าวว่าเป็นผลมาจากความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมของพืช

นอกจากนั้นจากผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าการใช้ auxin ในความเข้มข้นสูง ดังเช่นอาหารสูตร 9 มีผลทำให้เกิดรากเป็นจำนวนมากบนแคลลัส ดังนั้นอาหารสูตร 4 จึงเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูบร็อคโคลี่ครั้งนี้มากที่สุด เพราะนอกจากสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุดและไม่เกิดราก ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้ค่อนข้างต่ำ ทำให้ประหยัดและไม่สิ้นเปลือง เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ (สูตร 10) พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน คืออับละอองเรณูไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า 2,4-D และ NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำอับละอองเรณูคะน้าจีนและบร็อคโคลี่พัฒนาเป็นแคลลัส ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Dunwell (1985) ที่พบว่าในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ มีผลทำให้การพัฒนาของละอองเรณูของพืชบางชนิดต่ำ แต่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของพืชตระกูล Solanaceae ซึ่ง รังสฤษดิ์ (2541) ได้รายงานว่าสามารถพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ เลย ซึ่งความแตกต่างกันนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพืช

การเลือกใช้ชนิดของฮอร์โมน และความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญต่อการชักนำให้อับละอองเรณูของพืชแต่ละชนิดพัฒนาเป็นเอมบริโอหรือแคลลัสแตกต่างกันไป จากการวิเคราะห์ผลการใช้ 2,4-D ในการทดลองนี้พบว่ามีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ให้เจริญเป็นแคลลัสมากกว่า NAA ถึงแม้ว่าฮอร์โมนดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการใช้ 2,4-D และ NAA ในกะหล่ำดาวของ Ockendon and Clenaghan (1993) นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้ 2,4-D ที่ระดับ 0.1 มก./ล. เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในคะน้าจีนมากที่สุด ในขณะที่การเพิ่มระดับ 2,4-D ให้สูงขึ้นเป็น 0.5 และ 1.0 มก./ล. มีผลทำให้จำนวนแคลลัสของคะน้าจีนลดลงตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามการเลี้ยงอับละอองเรณูบร็อคโคลี่ในอาหารที่มี 2,4-D สูงขึ้น คือ 0.5 และ 1.0 มก./ล. มีผลทำให้จำนวนแคลลัสเพิ่มขึ้นซึ่งแตกต่างจากที่ระดับ 0.1 มก./ล. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Keller and Armstrong (1978) ที่พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ในอาหารเป็น 1.0 มก./ล. (เพิ่มเป็น 10 เท่า) ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอมบริโอเพิ่มมากขึ้น

น้ำตาลเป็นสารช่วยรักษาแรงดันออสโมติก และเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญระหว่างการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู พืชแต่ละชนิดต้องการน้ำตาลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป จากการทดลองนี้พบว่าระดับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 4% เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของคะน้าจีนมากที่สุด สามารถชักนำให้อับละอองเรณูเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ 27% แต่ไม่แตกต่างการใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 6% ซึ่งมีจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น 24.0% ในขณะที่น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 4% เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูบร็อคโคลี่เช่นกัน โดยพบว่ามีแคลลัสที่เกิดขึ้นเฉลี่ยสูงสุดคือ 34.9% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำตาล 6% ซึ่งมีจำนวนแคลลัสเกิดขึ้นเฉลี่ย 32.0% ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างจากการรายงานของ Keller (1984) ที่ว่าระดับน้ำตาลซูโครส 10% เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของพืชสกุล *Brassica* มากที่สุด นอกจากนั้นไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Dunwell *et al.*(1985) ที่พบว่าระดับน้ำตาลที่ความเข้มข้น 20% เหมาะสมต่อการเลี้ยงละอองเรณูของ *B. napus* ssp. *oleifera* มากกว่าการใช้น้ำตาลในระดับต่ำ ซึ่ง Roulund *et al.* (1991) กล่าวว่าการตอบสนองต่อระดับน้ำตาลที่เหมาะสมแตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดหรือสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามระดับน้ำตาลที่ 4 และ 6% สามารถพัฒนาให้อับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่เกิดแคลลัสมากที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำตาลในระดับความเข้มข้นนี้ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

การกระตุ้นดอก (pretreatment) ของพืชสกุล *Brassica* บางชนิดโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จากการรายงานของ Dunwell (1985) พบว่าสามารถชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับ Keller (1984) ซึ่งกล่าวว่าละอองเรณูของ *B. juncea* พัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มขึ้นหากเก็บช่อดอกไว้ที่อุณหภูมิ 10 °ซ เป็นระยะเวลา 2-15 วัน ก่อนนำอับละอองเรณูมาเพาะเลี้ยง แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าอับละอองเรณูคะน้าจีนที่ไม่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ 27.1% ไม่แตกต่างกับการกระตุ้นโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ซึ่งมีจำนวนอับละอองเรณูที่เกิดแคลลัส 24.0% ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Keller (1984) ในข้างต้น อย่างไรก็ตาม Dunwell (1985) กล่าวว่าพืชแต่ละชนิดต้องการการจัดการดอกแตกต่างกันไป แต่ในการทดลองนี้พบว่าช่อดอกบร็อคโคลี่ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นใด ๆ เลยสามารถให้จำนวนแคลลัสซึ่งไม่แตกต่างจากการกระตุ้นตามวิธีการของ Keller and Armstrong (1978) ซึ่งทดลองในบร็อคโคลี่พันธุ์ Green Mountain กล่าวได้ว่าวิธีการกระตุ้นช่อดอกคะน้าและบร็อคโคลี่ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากความแตกต่างของพันธุ์และสภาพแวดล้อมระหว่างการปลูก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Dixon (1985) ที่กล่าวว่าพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละพันธุ์ต้องการวิธีการกระตุ้นดอกและระยะเวลาที่เหมาะสมแตกต่างกันไป

เนื่องจากการทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ในครั้งนี้พัฒนาเป็นแคลลัส ซึ่งสอดคล้องการการทดลองของ Quazi (1978) แต่แตกต่างจากการรายงานของ Keller (1984) ที่สามารถเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูให้สามารถพัฒนาเจริญเป็นเอมบริโอได้โดยตรง ซึ่งในการทดลองนี้สามารถชักนำให้แคลลัสคะน้าจีนพัฒนาเกิดยอดบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BAP 0.1 มก./ล., IAA 1.0 มก./ล. และ GA_3 1.0 มก./ล. ส่วนแคลลัสบร็อคโคลี่สามารถเกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 0.25 มก./ล., IAA 1.0 มก./ล. และ GA_3 1.0 มก./ล. และเมื่อตัดย้ายยอดมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน 5 วัน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ในพืชทั้งสองชนิด สำหรับแคลลัสของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 (สูตร 1 และ 2) พบว่าแคลลัสเจริญเติบโตและมีขนาดเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้ในพืชทั้งสองชนิด

การตรวจสอบระดับชุดโครโมโซมของพืช (ploidy level) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูนั้นมีหลายวิธีการ การตรวจนับเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณเซลล์ปากใบเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมเนื่องจากประหยัด สะดวกและค่อนข้างเร็ว ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธีการดังกล่าวในการตรวจสอบต้นคะน้าจีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูกับต้นที่ปลูกจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบของต้นคะน้าจีนปกติ (diploid) คือ 5.02 เม็ด ไม่แตกต่างกับต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูทั้ง 4 ต้น ซึ่งมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์อยู่ระหว่าง 4.72-5.61 เม็ด ดังนั้นการทดลองนี้จึงไม่สามารถสร้างคะน้าจีนที่เป็นต้น haploidได้ ในขณะที่การเปรียบเทียบจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ระหว่างบร็อคโคลี่ที่เป็น diploid กับต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติโดยต้น diploid มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่เซลล์ปากใบ 5.27 เม็ด ส่วนต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเรณูทั้ง 3 ต้น มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.40-10.61 เม็ด นอกจากนั้นต้นที่ได้ยังมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์แตกต่างกันทางสถิติด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูครั้งนี้ไม่ใช่ต้น haploid หรือ diploid แต่เป็นต้นที่มีระดับ ploidy ที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นที่ได้อาจเกิดจากการพัฒนาของละอองเรณู แต่ต่อมาเกิด endomitosis (Keller *et al.*, 1975) ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตมากเกินไป (Reynolds, 1987) หรือต้นที่ได้อาจเกิดจากส่วนของผนังอับละอองเรณูซึ่งพัฒนาได้ดีกว่าละอองเรณู อย่างไรก็ตามการแยกเอาเฉพาะละอองเรณูมาเลี้ยงเพียงอย่างเดียวจะช่วยลดโอกาสการพัฒนาของผนังอับละอองเรณู และทำให้มีโอกาสได้ต้น haploid สูงขึ้น

2. การรวมโปรโตพลาสต์

2.1 การแยกโปรโตพลาสต์

อายุของใบคะน้าและบร็อคโคลี่ที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อจำนวนและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ ซึ่ง สมปอง (2539) กล่าวว่าต้นพืชที่มีอายุน้อยหรืออยู่ระหว่างการเจริญเติบโตจะให้โปรโตพลาสต์ที่มีคุณภาพสูง นอกจากนี้ใบที่มีอายุน้อยเซลล์ไม่แก่ ช่วยทำให้การย่อยของเอ็นไซม์ง่ายยิ่งขึ้น ในการแยกโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่โดยใช้ใบจากคู่ที่ 2-4 จากต้นคะน้าและบร็อคโคลี่ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้ออายุ 3-4 สัปดาห์ พบว่าได้ปริมาณโปรโตพลาสต์จำนวนมากและความมีชีวิตค่อนข้างสูง และเนื่องจากใบคะน้ามีลักษณะบางและอ่อนจึงทำให้การย่อยง่ายกว่าใบบร็อคโคลี่ซึ่งมีลักษณะใบแข็งและหนากว่า ดังนั้นจึงพบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากน้ำหนักใบสดในปริมาณที่เท่ากันจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนสูงกว่าบร็อคโคลี่

ชนิด ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ และระยะเวลาที่ใช้แยกขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้แยก โดยทั่วไปเอ็นไซม์ที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย pectinase และ cellulase ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ส่วนผสมของเอ็นไซม์ 2 ชนิด คือ cellulase เข้มข้น 0.5 % และ macerozyme R-10 เข้มข้น 0.3 % ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่นิยมใช้แยกโปรโตพลาสต์จากใบของพืชสกุล *Brassica* (Vamling and Glimelius, 1990) และพบว่าความเข้มข้นดังกล่าวพอเพียงต่อการทำให้แต่ละเซลล์แยกจากกัน และง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ใช้อาจแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้แยกด้วย นอกจากนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรโตพลาสต์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้ ระยะเวลาการย่อยที่น้อยกว่า 3 ชม. ทำให้ได้ปริมาณโปรโตพลาสต์น้อย แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าระยะเวลาการย่อย 4.5 ชม. ทำให้ได้ปริมาณโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ค่อนข้างมากและเพียงพอต่อการนำมาเพาะเลี้ยง ขณะเดียวกันความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้มีเปอร์เซ็นต์สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vamling and Glimelius (1990) ที่กล่าวว่าระยะเวลาการย่อยใบของพืชสกุล *Brassica* โดยทั่วไปควรอยู่ระหว่าง 4-5 ชั่วโมง การใช้ระยะเวลาย่อยนานเกินไปมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ถูกเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์มากเกินไปจนกระทั่งเซลล์แตก

เทคนิคการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ภายหลังการแยกเป็นการคัดเลือกเพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่ดี แข็งแรง ไม่แตกง่าย และทนทานต่อสารละลายเอ็นไซม์ ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะดังกล่าวจะง่ายต่อการชักนำให้เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ สำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์โดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตมีกระบวนการดังนี้คือ หลังจากที่โมเลกุลของสีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีเอ็นไซม์เอสเทอเรสไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตทำให้เกิดสีฟลูออเรสเซนส์ และเกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียวเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ (Power and Davey, 1990) ซึ่งจากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลูกผสมไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ และอาจกล่าวได้ว่าการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าในระหว่างการรวมไม่มีผลต่อจำนวนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

2.2 การรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้า

ในการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ครั้งนี้ใช้กระแสไฟฟ้ากระแสสลับ AC 2 ช่วง เพื่อกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวอยู่ในแนวเดียวกัน ในความถี่ 1 MHz คือ primary AC voltage 10 V และ secondary AC voltage 10 V โดยมีระยะห่างของช่วงความต่างศักย์ที่ใช้ในช่วงที่ให้กระแสตรง (pulse width) ช่วงละ 20 μs ซึ่งประสาทพร (2541) รายงานว่าค่า pulse width นี้อาจมีค่าอยู่ระหว่าง 10-120 ms แต่การตั้งค่านี้สูงมากจะทำให้เซลล์ถูกทำลายมาก ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ระยะเวลาในการให้ไฟฟ้ากระแสสลับ (initial time) แต่ละช่วงไม่เกิน 10 วินาที การให้ระยะเวลา (initial time) นานเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวกันยาวมากขึ้น ดังนั้นค่าช่วงที่เหมาะสม คือค่าช่วงที่เกิดการเรียงตัวเพียง 2 โปรโตพลาสต์ สำหรับไฟฟ้ากระแสตรง pulse height (DC voltage) เป็นกระแสไฟฟ้าที่ทำให้เยื่อหุ้มโปรโตพลาสต์เกิดการฉีกขาดและเกิดการรวมกันของไซโตพลาสซึม ซึ่งค่า DC voltage ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ 10 V ส่วนค่า electric field strength ที่ใช้ คือ 0.03 kV/cm ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่เครื่องคำนวนขึ้นมาให้โดยอัตโนมัติ ในขณะที่การทดลองนี้ให้ช่วงระยะเวลาที่ให้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) (pulse repeat interval) นานครั้งละ 1.5 วินาที โดยตั้งค่าให้มีจำนวนครั้งที่ต้องการให้เกิดการรวมตัวกัน (pulse number) เท่ากับ 3 ซึ่งรวมระยะเวลา final time ที่เกิดขึ้น 10 วินาที อย่างไรก็ตามค่าที่ใช้ในการรวมกันของพืชแต่ละชนิดอาจเหมาะสมแตกต่างกันไป ทั้งนี้เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่สามารถรวมกันได้เพียง 2 เซลล์มากที่สุด ขณะเดียวกันโปรโตพลาสต์ลูกผสมยังสามารถเจริญและเกิดการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องได้

2.3 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวได้รับความนิยมกันมาก เพราะโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้เร็ว และเนื่องจากในระยะแรกโปรโตพลาสต์ไม่มีการสร้างผนังเซลล์ การเติมสารรักษาแรงดันออสโมติกลงไปในอาหารช่วยทำให้เกิดการรักษาสภาพสมดุลย์ของเซลล์ และเกิดการแลกเปลี่ยนของโมเลกุลสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง ทำให้สามารถสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ใหม่ได้ ในการทดลองครั้งนี้ได้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ในอาหารเหลว ซึ่งพบว่าโปรโตพลาสต์สามารถเจริญ สร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ใหม่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Yang *et al.* (1994) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกะหล่ำดอกในอาหารเหลวช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ได้ดีและเกิดขึ้นเร็ว ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้หลังจากเพาะเลี้ยง 24 -72 ชั่วโมง และเริ่มเกิดการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเลี้ยง 3 วัน

สารที่ใช้รักษาแรงดันออสโมติกมีหลายชนิด mannitol เป็นน้ำตาลอัลกอฮอล์อีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันทั่วไป แต่ความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดพืช (ประสาทพร, 2541) ในการทดลองนี้ใช้ mannitol ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นสารสำหรับรักษาแรงดันออสโมติกให้กับโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ ทั้งในส่วนผสมของเอ็นไซม์และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จากการตรวจสอบโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีลักษณะกลม เต่ง ไม่เหี่ยว สามารถมองเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์ที่อยู่ภายในเซลล์ได้ชัดเจน นอกจากนั้นหลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน เริ่มสังเกตพบว่าโปรโตพลาสต์มีลักษณะรี ยาว ผนังเริ่มหนามีสีเขียวเข้มขึ้น และเซลล์เริ่มคอด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแบ่งเซลล์กำลังเริ่มเกิดขึ้น

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารมีผลต่อการเจริญและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะพัฒนาการด้านการแบ่งเซลล์ การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในปริมาณที่แน่นเกินไปมีผลทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการแก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน และมีผลทำให้พัฒนาการด้านแบ่งเซลล์เกิดขึ้นช้า ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในความหนาแน่น 1×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมล. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pua (1993) ที่เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนที่ระดับความหนาแน่น 0.2-1.0 $\times 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมล. และพบว่าที่ความหนาแน่นดังกล่าวโปรโตพลาสต์มีอัตราการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นในปริมาณสูง แต่ Vamling and Glimelius

(1990) ได้รายงานว่าความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* ควรอยู่ระหว่าง 2.5-5.0 X 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมล. หรืออาจมากกว่านี้หากโปรโตพลาสต์นั้นแยกมาจากส่วนของใบ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในปริมาณที่น้อยเกินไปมีผลทำให้โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญได้ (*Blackhall et al.*, 1994)

อาหารและองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์โดยเฉพาะในด้านการแบ่งเซลล์ ซึ่ง Zhao *et al.* (1995) กล่าวว่าอาหารที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันไป สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีน บร็อคโคลี่ และโปรโตพลาสต์ลูกผสมในอาหารสูตร PS (1981) ที่ดัดแปลงเติม NAA 2.25 มก./ล. , Zeatin 0.75 มก./ล. และเติมสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์ โดยเลี้ยงในที่มืดและมีอุณหภูมิ 25 °ซ เป็นระยะเวลา 5 วัน ก่อนย้ายมาเลี้ยงในสภาพที่ควบคุมความชื้นของบรรยากาศ 85% อุณหภูมิ 25 °ซ และให้ได้รับแสง 800-1,200 mol $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบการเจริญของโปรโตพลาสต์ สังเกตได้จากโปรโตพลาสต์บางส่วนเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน ซึ่งสอดคล้องกับพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* อีกหลายชนิดที่ Vamling and Glimelius (1990) ได้รายงานว่าการสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นภายหลังจากการแยก 24-72 ชั่วโมง และเกิดการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยง 2-5 วัน แต่การแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์ในการทดลองนี้เกิดขึ้นช้ากว่าการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์คะน้าจีนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PC ซึ่ง Pua (1993) รายงานว่าเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 36-48 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง

ในการตรวจนับเปอร์เซ็นต์ของการแบ่งเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ (3, 5, 7 และ 10 วัน) ชี้ให้เห็นว่าโปรโตพลาสต์คะน้าจีน บร็อคโคลี่ และโปรโตพลาสต์ลูกผสมมีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงในช่วง 7 วันแรก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Narasimhulu *et al.* (1993) ที่พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ *B. nigra* มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 62% หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน ในขณะที่ Zhao *et al.* (1995) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ของ *B. campestris, B. oleracea* และ *B. napus* เริ่มเข้าสู่การแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และการแบ่งเซลล์จะเพิ่มเป็น 40% ในช่วง 1-7 วันหลังการเพาะเลี้ยง แต่เปอร์เซ็นต์ของการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในการทดลองนี้หลังเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานในข้างต้น โดยคะน้าจีนมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด คือ 11.99% รองลงมา

คือ บร็อคโคลี่ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 8.05% ในขณะที่โปรโตพลาสต์ลูกผสมมีการแบ่งน้อยที่สุดคือ 3.67% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของคะน้าจีนกับบร็อคโคลี่เป็นผลมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืช ดังนั้นจึงทำให้โปรโตพลาสต์มีความต้องการอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกัน (Zhao *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลูกผสมกับโปรโตพลาสต์คะน้าจีนและบร็อคโคลี่พบว่าต่ำกว่ามาก ถึงแม้ว่าเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพเดียวกันก็ตาม อาจกล่าวได้ว่าปัจจัยที่ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลูกผสมต่ำนั้นเป็นผลมาจากการใช้สี neutral red ย้อมโปรโตพลาสต์ ซึ่งประสาทพร (2541) รายงานว่าการใช้ในความเข้มข้นมากเกินไป ทำให้มีผลต่อกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์และสามารถทำให้เซลล์ตายได้ หลังการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมเปลี่ยนเป็นสีแดง ทั้งนี้เป็นผลมาจากเกิดขบวนการขับสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายในให้ออกจากเซลล์ นอกจากนั้นการเปลี่ยนถ่ายอาหารโดยการดูดเอาอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารชนิดเดิมลงไป เพื่อเจือจางความเข้มข้นของสารละลาย neutral red ที่อยู่ในอาหารหลังการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง อาจทำให้เกิดการชะงักการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ และทำให้โปรโตพลาสต์ลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำ

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์คะน้าจีน บร็อคโคลี่และโปรโตพลาสต์ลูกผสมในอาหารสูตร PS (1981) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารโดยดูดเอาอาหารเก่าออกบางส่วน แล้วเติมอาหารใหม่สูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3.0%, 2,4-D 0.1 มก./ล., BAP 1.0 มก./ล. และสารละลาย mannitol เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ลงไป อีก 3 วันต่อมาตรวจพบว่าโปรโตพลาสต์มีลักษณะซีด เริ่มเหี่ยว แฟบ และบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล บางเซลล์แตก นอกจากนั้นโปรโตพลาสต์ที่กำลังอยู่ระหว่างการแบ่งตัวหยุดชะงักและไม่แบ่งต่อไป พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่สามารถสร้างผนังมาคั้นทำให้เกิดการแบ่งได้เพียง 2 เซลล์เท่านั้น จากพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่หยุดชะงักหลังการเปลี่ยนอาหารใหม่อาจเป็นผลมาจากชนิดและความเข้มข้นของอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ส่วนการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยใช้อาหารสูตร PS (1981) เป็นสูตรอาหารหลัก แต่ดัดแปลงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าพัฒนาการของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นเช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น เมื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลูกผสมหลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าอาหารสูตร PS (1981) ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล., NAA 1.0 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์ของการแบ่งเซลล์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น ๆ

ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ และการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างคะน้าจีนในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานหรือใช้เป็นแนวทางใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University