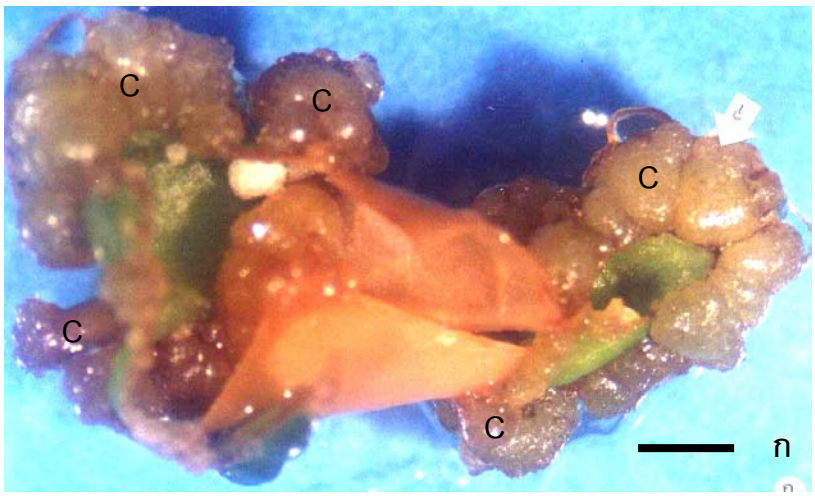
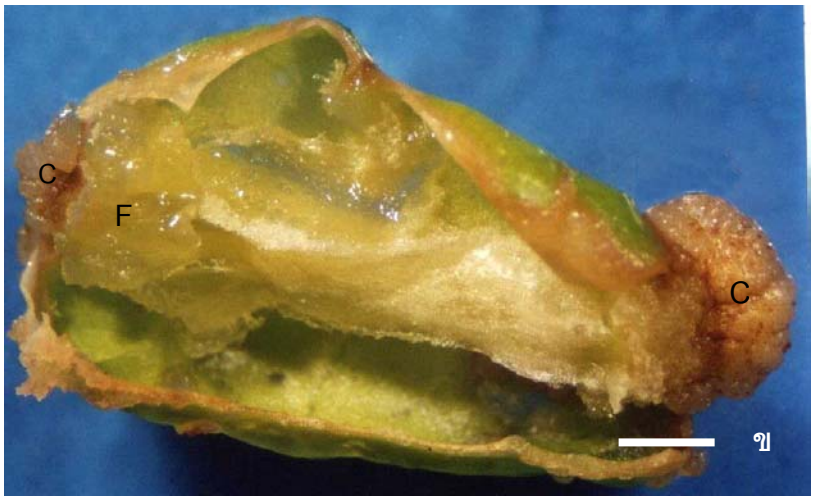
บทที่ 3

ผล

1. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนสะเดาช้าง

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบสะเดาช้างบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ส่วนใหญ่ชิ้นส่วนใบสร้างแคลลัสบริเวณรอยตัดรอบชิ้นส่วน และบนแผ่นใบ โดยเริ่มสร้างจากรอยตัดก่อนจากนั้นจึงสร้างจากแผ่นใบ แคลลัสที่ชักนำบนอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA หรือ KN เป็นประเภทคอมแพคแคลลัส มีโนดูล (noduls) ขนาดประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร มีสีเขียวใส (ภาพที่ 1 ก) ส่วนแคลลัสที่ชักนำบนอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ KN เป็นประเภทฟรายเอเบิลแคลลัส ยกเว้นแคลลัสที่ชักนำบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีทั้งประเภทคอมแพคแคลลัสและฟรายเอเบิลแคลลัส รวมกันในชิ้นส่วนเดียว มีสีเหลือง (ภาพที่ 1 ข) อาหารเติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างคอมแพคแคลลัส สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโนดูลเฉลี่ย 10.7 โนดูล รองลงมาคือ อาหารเติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างคอมแพคแคลลัส 97.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโนดูล 11.9 โนดูล (ตารางที่ 1 และ3) อาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างฟรายเอเบิลแคลลัส สูงสุด 90.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ 2,4-D ร่วมกับ BA เข้มข้นชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างฟรายเอเบิลแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และ 3)





ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบสะเดาช้างเป็นเวลา 3 สัปดาห์

(ก) อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (คอมแพคแคลลัส; C) (บาร์ = 0.5 มิลลิเมตร)

(ข) อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (คอมแพคแคลลัส และฟรายเอเบิลแคลลัส; F) (บาร์ = 0.5 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA หรือ KN ต่อการสร้างแคลลัสของใบสะเดาช้างหลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

ออกซิน (มก./ล.)	ไซโตไคนิน (มก./ล.)	การสร้างแคลลัส (%) ± SD	จำนวนโนดูล ± SD	ประเภทแคลลัส	สีแคลลัส
NAA	BA				
0.5	0.2	36.0±33.6	3.1±1.3	C	เขียวเหลือง
0.5	0.5	30.0±30.0	4.6±2.2	C	เขียวเหลือง
0.5	1.0	57.5±25.0	5.6±1.9	C	เขียวเหลือง
1.0	0.2	90.0±11.5	6.4±2.6	C	เขียวเหลือง
1.0	0.5	73.3±32.6	4.1±0.6	C	เขียว
1.0	1.0	80.0±10.0	7.2±1.7	C	เขียวเหลือง
2.0	0.2	97.5±5.0	11.9±5.9	C	เขียวเหลือง
2.0	0.5	88.0±13.0	6.0±0.4	C	เขียวเหลือง
2.0	1.0	62.5±5.0	4.7±2.0	C	เขียวเหลือง
NAA	KN				
0.5	0.2	0.0	0.0	-	-
0.5	0.5	0.0	0.0	-	-
0.5	1.0	0.0	0.0	-	-
1.0	0.2	0.0	0.0	-	-
1.0	0.5	13.7±15.2	1.5±0.5	C	เขียวเหลือง
1.0	1.0	53.3±25.1	7.2±0.1	C	เขียว
2.0	0.2	40.5±18.0	3.7±2.6	C	เขียวเหลือง
2.0	0.5	100.0±0.0	10.7±2.5	C	เขียวเหลือง
2.0	1.0	94.0±8.9	10.9±3.8	C	เขียวใส

C = คอมแพคแคลลัส

- = ไม่บันทึกเนื่องจากไม่มีแคลลัส

±SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ KN ต่อการสร้างแคลลัสของใบสะเดาช้างหลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

ออกซิน (มก./ล.)	ไซโตไคนิน (มก./ล.)	การสร้างแคลลัส (%) ± SD	จำนวนโนดูล ± SD	ประเภทแคลลัส	สีแคลลัส
2,4-D	BA				
0.5	0.2	30.0±14.1	0.0	F	เหลือง
0.5	0.5	60.0±15.1	0.0	F	เหลือง
0.5	1.0	90.0±14.1	5.1±1.9	C, F	เหลือง
1.0	0.2	-	-	-	-
1.0	0.5	13.3±23.1	0.0	F	ครีม น้ำตาล
1.0	1.0	6.6±11.5	0.0	F	ครีม น้ำตาล
2.0	0.2	0.0	0.0	-	-
2.0	0.5	0.0	0.0	-	-
2.0	1.0	0.0	0.0	-	-
2,4-D	KN				
0.5	0.2	-	-	-	-
0.5	0.5	22.5±24.9	0.0	F	เหลือง
0.5	1.0	0.0	0.0	-	-
1.0	0.2	0.0	0.0	-	-
1.0	0.5	0.0	0.0	-	-
1.0	1.0	4.0±8.9	0.0	F	ครีม
2.0	0.2	0.0	0.0	-	-
2.0	0.5	6.7±11.5	0.0	F	ครีม
2.0	1.0	0	0	-	-

C = คอมแพคแคลลัส, F = ฟรายเอเบิลแคลลัส

- = ไม่บันทึกเนื่องจากไม่เกิดแคลลัส และเกิดการปนเปื้อน

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

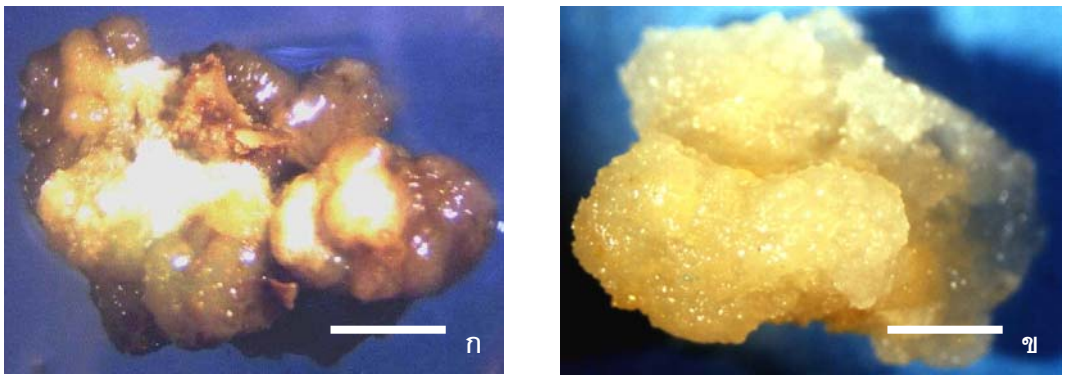
ตารางที่ 3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของใบสะเดาช้าง หลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				การสร้างแคลลัส	จำนวนโนดูล	ประเภทแคลลัส	สีแคลลัส
NAA	2,4-D	BA	KN	(%) ±SD	±SD		
2.0	0.0	0.2	0.0	97.5±5.0	11.9 ±5.9	C	เขียว-เหลือง
2.0	0.0	0.0	0.5	100.0±0.0	10.7±2.5	C	เขียว-เหลือง
0.0	0.5	1.0	0.0	90.0 ±14.1	5.1±1.9	C,F	เหลือง
0.0	0.5	0.0	0.5	22.5 ±24.9	0.0	F	เหลือง

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มขนาดคอมแพคแคลลัสได้ใหญ่ที่สุด 4.2 มิลลิเมตร รองลงมาคือ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2 ก) เพิ่มขนาดคอมแพคแคลลัส 2.9 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม NAA ร่วมกับ KN เป็นเวลาเกิน 3 สัปดาห์ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 1 และไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA สามารถเพิ่มปริมาณต่อไปได้ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA เข้มข้นชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มขนาดฟรายเอเบิลแคลลัสได้ใหญ่ที่สุด 7.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4, 5 และภาพที่ 2 ข)



ภาพที่ 2 ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) คอมแพคแคลลัส บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 1.7 มิลลิเมตร)

(ข) ฟรายเอเบิล บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มขนาดของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		ขนาดที่เพิ่มขึ้น (มม.) ±SD	ลักษณะแคลลัส
NAA	BA		
2	0.1	2.7±1.7	C
2	0.2	2.5±1.1	C
2	0.5	2.8±1.0	C
2	1.0	2.9±0.9	C
NAA	KN		
2	0.1	1.9±1.0	C
2	0.2	2.2±0.8	C
2	0.5	2.5±1.0	C
2	1.0	4.2±0.5	C
2,4-D	BA		
0.5	0.2	2.1±0.1	F
0.5	0.5	7.5±0.0	F
0.5	1.0	5.6±3.4	F
1.0	0.2	0.4±0.5	F
1.0	0.5	1.4±0.8	F
1.0	1.0	1.7±1.4	F
2,4-D	KN		
0.5	0.2	1.9±0.5	F
0.5	0.5	2.4±2.3	F
0.5	1.0	3.1±1.3	F
1.0	0.2	0.4±0.4	F
1.0	0.5	0.5±0.3	F
1.0	1.0	0.6±0.8	F

C = คอมแพคแคลลัส, F = ฟรายเอเบิลแคลลัส

±SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

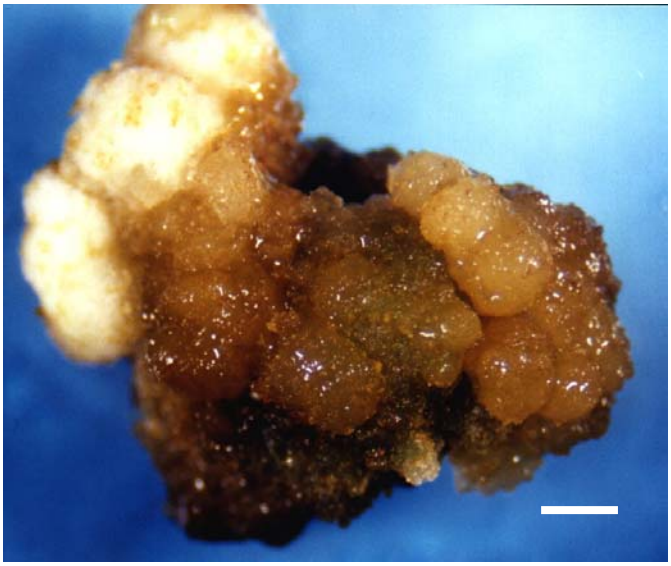
ตารางที่ 5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มขนาดของแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				ขนาดที่เพิ่มขึ้น (มม.) ±SD	ประเภทแคลลัส
NAA	2,4-D	BA	KN		
2.0	0.0	1.0	0.0	2.9± 0.9	C
2.0	0.0	0.0	1.0	4.2±0.5	C
0.0	0.5	0.5	0.0	7.5±0.0	F
0.0	0.5	0.0	1.0	3.1±1.3	F

±SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ผลของความเข้มข้นของ BA ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะเป็นปมเฉลี่ย 6.2 ปมต่อแคลลัส และให้แคลลัสสีเขียวสูงสุด 46.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามพบว่า ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้



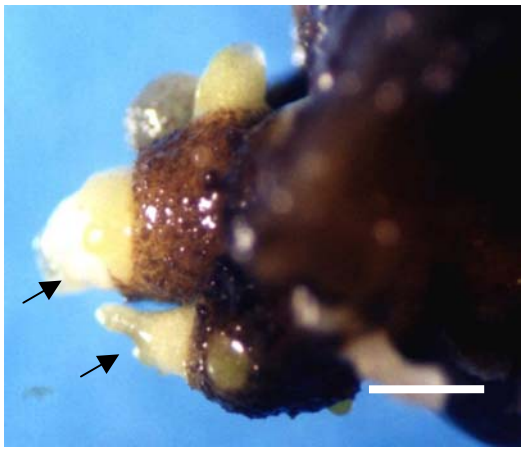
ภาพที่ 3 ลักษณะปมของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1.25 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของ BA ต่อการเกิดปม และเปอร์เซ็นต์การให้แคลลัสที่มีสีเขียว

ความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	จำนวนปมต่อชิ้นส่วนแคลลัส	การเกิดแคลลัสสีเขียว (%)
0.0	0.0	30.7
0.1	0.0	30.7
0.2	6.2	46.1

4. **ผลของเคซีนไฮโดรไลเสทต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส**

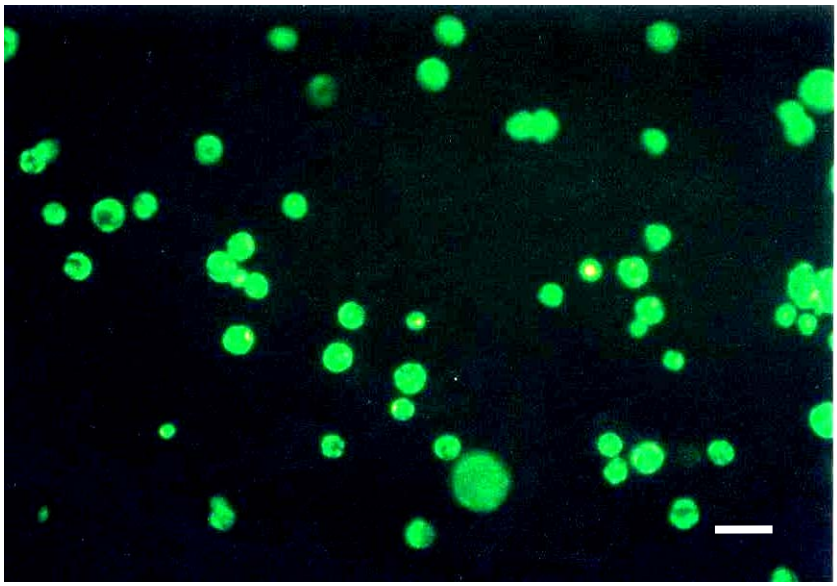
หลังจากนำแคลลัสจากการทดลองที่ 3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารเติมเคซีนไฮโดรไลเสทให้การสร้างตายอด 11.9 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 4 ตายอดต่อแคลลัส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเกิดตายอด (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 มิลลิเมตร)

5. ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสะเดาช้าง

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากใบของสะเดาช้างนอกหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ใช้เวลาอินคูเบทใบด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และอินคูเบทใบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เป็นเวลา 10 ชั่วโมงพบว่า เอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 30.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 5.0×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำ 45.81 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด 82.63 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) และให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.4×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด ดังนั้นในการทดลองแยกโปรโตพลาสต์ของใบสะเดาช้างในครั้งต่อไปจึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 5 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ เห็นการเรืองแสงสีเขียว-เหลือง (บาร์ = 40 ไมโครเมตร)

ตารางที่ 7 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ

ความเข้มข้นของเอนไซม์			จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)	ความมีชีวิต (%)
CRS (%)	เซลลูเลส (unit)	MR-10 (%)		
1.0	0.0	1.0	2.2 e	59.2 bc
1.0	0.0	2.0	1.9 e	58.0 bc
2.0	0.0	1.0	13.9 c	82.6 a
2.0	0.0	2.0	12.9 c	66.0 abc
0.0	15.0	1.0	7.3 d	77.6 ab
0.0	15.0	2.0	10.8 c	48.5 c
0.0	30.0	1.0	50.3 a	45.8 c
0.0	30.0	2.0	30.1 b	25.1 d
F-test			*	*
C.V. (%)			14.7	22.6

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

CRS = เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส

MR-10 = มาเซอโรไซม์อาร์-10

6. ผลของชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายออสโมติคัมชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า แมนนิทอลให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด การใช้แมนนิทอลร่วมกับซอร์บิทอลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำสุด แมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $8.91x10^6$ รองลงมา คือ แมนนิทอล เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $6.21x10^6$ ส่วนความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (ภาพที่ 5) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างออสโมติคัมชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 8) ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้แมนนิทอลในการปรับความดันออสโมติกในสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ

ออสโมติคัม (โมลาร์)		จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^6$)	ความมีชีวิต (%)
แมนนิทอล	ซอร์บิทอล		
0.50	0.00	8.91 a	63.67
0.60	0.00	6.21 b	75.95
0.70	0.00	5.19 bc	69.17
0.00	0.50	4.83 cd	78.30
0.00	0.60	3.44 e	68.34
0.00	0.70	2.76 e	70.34
0.25	0.25	3.58 de	62.88
0.30	0.30	2.96 e	62.64
0.35	0.35	2.20 e	77.02
F-test		*	ns
C.V. (%)		20.29	18.20

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

7. ผลของขนาดใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากใบขนาดต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าใบที่มีความกว้าง 3.1-4.0 เซนติเมตร ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ $6.1x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามพบว่าให้ความมีชีวิตต่ำสุด 66.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) ส่วนใบที่มีความกว้าง 2.1-3.0 ให้จำนวนโปรโตพลาสต์รองลงมา $4.8x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้ความมีชีวิตสูงสุด คือ 76.7 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้ ใบที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ ใบที่มีความกว้าง 2.1-3.0 เซนติเมตร ซึ่งให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง และให้จำนวนโปรโตพลาสต์เพียงพอต่อการนำไปใช้เพื่อศึกษาการทดลองต่อ ๆ ไป

ตารางที่ 9 ผลของขนาดใบต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ

ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	จำนวนโปรโตพลาสต์ / กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)	ความมีชีวิต (%)
1.5-2.0	7.4 c	76.0
2.1-3.0	48.3 b	76.7
3.1-4.0	60.5 a	66.5
F-test	*	ns
C.V. (%)	19.7	11.7

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

8. ผลของวิธีการเตรียมใบสะเดาช้างที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากใบที่เตรียมด้วยวิธีการต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ใบสดให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ $5.4x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสดและ 91.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การแช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำสุด คือ $1.9x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลของวิธีการเตรียมใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

วิธีการเตรียมใบ	จำนวนโปรโตพลาสต์ /กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$) $\pm$ SD	ความมีชีวิต (%) $\pm$ SD
ใบสด	54.6$\pm$0.8	91.2$\pm$1.2
วางใบบนอาหารเก็บไว้ในที่มืด	32.4$\pm$0.0	82.1$\pm$0.1
วางใบในจานเพาะเลี้ยงเก็บในที่มืด	39.2$\pm$2.8	79.7$\pm$3.3
แช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์	1.9$\pm$0.0	88.4$\pm$3.8

$\pm$ SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

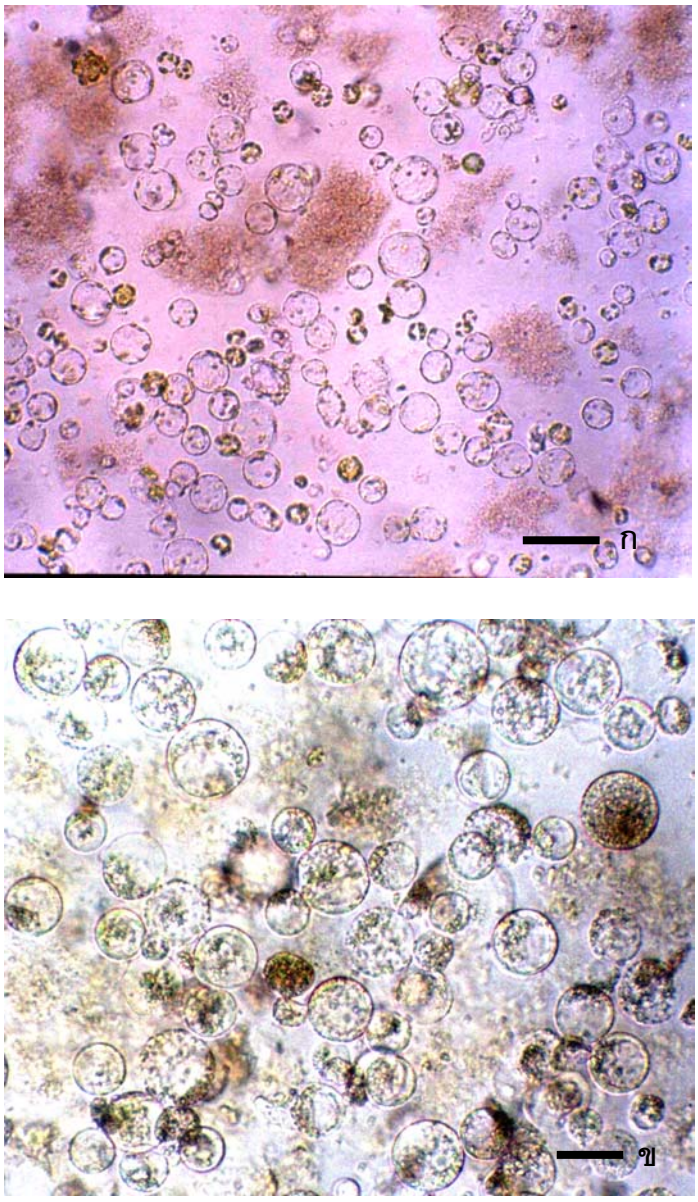
9. ผลของแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด ($3.8x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด) รองลงมาคือ แคลลัส ($5.4x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด) ส่วนเซลล์ซัสเพนชั่นให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำสุด ($3.5x10^4$ ต่อกรัมน้ำหนักสด) (ตารางที่ 11) โปรโตพลาสต์จากใบมีขนาด 20 ไมโครเมตร (ภาพที่ 6 ก) ในขณะที่โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัสมีขนาดประมาณ 40 ไมโครเมตร (ภาพที่ 6 ข) เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากทั้งสามแหล่งแบบฝังเลี้ยง ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นเริ่มแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน ในขณะที่โปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัสเริ่มแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน และหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นมีการแบ่งเซลล์สูงสุด (27.9 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือโปรโตพลาสต์จากแคลลัส (8.2 เปอร์เซ็นต์) ส่วนโปรโตพลาสต์จากใบให้การแบ่งเซลล์ต่ำสุด (2.5 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์จากแคลลัสสามารถแบ่งเซลล์ได้สูงสุดจำนวน 6 เซลล์ (2 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 7 ก) ในขณะที่แหล่งอื่น ๆ แบ่งเซลล์ได้จำนวน 2 เซลล์ (ภาพที่ 7 ข และ ค) สำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์เหี่ยวและตายหมด ส่วนโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นเกิดการปนเปื้อน จึงไม่สามารถตรวจสอบผลการทดลองได้

ตารางที่ 11 ผลของแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

แหล่งของโปรโตพลาสต์	จำนวนโปรโตพลาสต์ /กรัมน้ำหนักสด ± SD	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%) ± SD		ระยะเวลา ที่เริ่มแบ่งเซลล์ (วัน)
		การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ	
ใบ	$3.8\pm2.7x10^6$	2.5±0.9	0.9±1.3	3
เซลล์ซัสเพนชั่น	$3.5\pm0.7x10^4$	27.9±0.9	9.9±1.1	1-2
แคลลัส	$5.4\pm27.7x10^5$	8.2±2.2	2.9±0.6	3

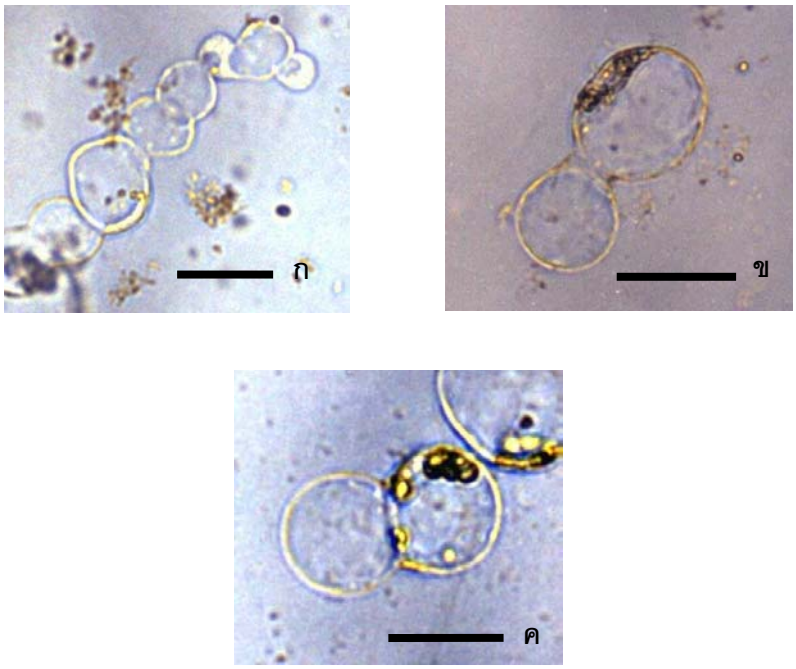
± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 6 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแหล่งชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

(ก) ใบ (บาร์ = 40 ไมโครเมตร)

(ข) แคลลัส (บาร์ = 40 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 7 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกันในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 4 วัน

(ก) แคลลัส (บาร์ = 35 ไมโครเมตร)

(ข) เซลล์ซัสเพนชั่น (บาร์ = 40 ไมโครเมตร)

(ค) ใบ (บาร์ = 20 ไมโครเมตร)

10. การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ ให้การแบ่งเซลล์ครั้งที่ 1 และ 2 สูงสุด คือ 3.0 และ 1.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มีการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ 12) อย่างไรก็ตาม หลังจากเติมอาหารที่ลดออสโมติคัมเป็น 0.3 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อไป 1 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์เหี่ยวและไม่มีพัฒนาการใด ๆ เกิดขึ้น

ตารางที่ 12 ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์และแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ จากใบ หลังเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)	การแบ่งเซลล์ (%) ± SD		การแตกหน่อ (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
$5x10^4$	0.0	0.0	0.0
$1x10^5$	2.0±1.4	0.0	0.0
$5x10^5$	3.0±2.2	1.4±0.7	0.0
$1x10^6$	2.4±1.4	0.0	0.0

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

11. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบ

11.1 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ KN

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบด้วยความหนาแน่น $1.0x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ KN ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 2.9 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่า มีการแตกหน่อ 2.2 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์ 2.8 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการแตกหน่อ (ตารางที่ 13 และ 15) อย่างไรก็ตามพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ โดยลดออสโมติคัมของอาหารลง สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว และไม่มีพัฒนาการใด ๆ

ตารางที่ 13 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ KN ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบ หลังจากเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)			การแบ่งเซลล์ (%) ± SD	การแตกหน่อ (%) ± SD
2,4-D	BA	KN		
1.0	0.5	0.0	2.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0
2.0	0.5	0.0	1.8 ± 2.5	1.7 ± 2.4
3.0	0.5	0.0	1.6 ± 2.2	2.6 ± 0.9
4.0	0.5	0.0	2.6 ± 0.3	0.0 ± 0.0
5.0	0.5	0.0	0.8 ± 1.2	0.0 ± 0.0
1.0	0.0	0.5	2.7 ± 1.6	1.8 ± 0.6
2.0	0.0	0.5	2.9 ± 0.9	2.2 ± 0.2
3.0	0.0	0.5	1.7 ± 1.2	4.2 ± 0.4
4.0	0.0	0.5	0.5 ± 0.7	2.3 ± 2.1
5.0	0.0	0.5	1.2 ± 1.7	3.4 ± 2.1

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

11.2 ผลของ dicamba ร่วมกับ BA

หลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบด้วยความหนาแน่น $1.0x10^5$ แบบฝังเลี้ยงในอาหารเติม dicamba ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า อาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 2.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14 และ 15) รองลงมาคือ dicamba เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองความเข้มข้นให้เปอร์เซ็นต์การแตกหน่อสูงสุด 4.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) หลังจากเติมอาหารที่ลดความเข้มข้นของออสโมติคัมลง สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์เหี่ยว และไม่มีพัฒนาการใด ๆ ในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นของ dicamba ร่วมกับ BA ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
dicamba	BA	± SD	± SD
0.5	1.0	2.8±3.9	4.2±2.0
0.5	2.0	1.6±1.0	2.1±0.7
0.5	3.0	1.4±2.0	2.2±0.1
0.5	4.0	1.2±1.6	3.0±1.5
0.5	5.0	1.1±1.5	2.3±0.1
1.0	0.5	1.6±2.2	2.9±0.4
2.0	0.5	1.5±2.1	2.6±0.1
3.0	0.5	1.5±2.1	3.3±0.5
4.0	0.5	2.5±1.5	4.2±0.3
5.0	0.5	1.4±2.0	2.1±0.7

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 15 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
2,4-D	dicamba	BA	KN		
1.0	0.0	0.5	0.0	2.8± 0.8	0.0
2.0	0.0	0.0	0.5	2.9± 0.9	2.2± 0.2
0.0	0.5	1.0	0.0	2.8± 3.9	4.2± 2.0

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

12. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและการลดออสโมติคัมหลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

12.1 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA

หลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้างด้วยความหนาแน่น $1.0x10^5$ แบบฝังเลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว เมื่อแบ่งโปรโตพลาสต์เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเติมอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.3 โมลาร์ และอีกส่วนไม่เติมอาหาร (0.4 โมลาร์) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.3 โมลาร์ ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 10.9 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการแตกหน่อ อย่างไรก็ตามพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงนานเกิน 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยวจนถึงสัปดาห์ที่ 3 โปรโตพลาสต์เหี่ยวหมด และไม่มีพัฒนาการใด ๆ ในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบ เมื่อลดหรือไม่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอล หลังจากเพาะเลี้ยง 2 วัน

2,4-D	BA	แมนนิทอล (โมลาร์)			
		0.3		0.4	
มก./ล.		การแบ่งเซลล์ (%) ± SD	การแตกหน่อ (%) ± SD	การแบ่งเซลล์ (%) ± SD	การแตกหน่อ (%) ± SD
0.5	0.5	2.4±1.9	0.4±0.5	2.5±0.9	0.9±1.3
1.0	0.5	4.0±2.3	0.0	2.0±1.0	0.0
1.0	1.0	1.9±1.6	0.0	1.27±0.3	1.1±1.5
2.0	0.5	6.9±3.6	0.0	4.5±2.2	0.0
2.0	1.0	10.9±12.8	0.0	0.6±0.8	0.0
เฉลี่ย		5.2±3.7	0.1±0.2	2.2±1.5	0.4±0.5

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

12.2 ผลของ NAA ร่วมกับ BA หรือ KN

หลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบด้วยความหนาแน่น $1.0x10^5$ แบบฝังเลี้ยงในอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA หรือ KN ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว เมื่อแบ่งโปรโตพลาสต์เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเติมอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.3 โมลาร์ และอีกส่วนไม่เติมอาหาร (0.4 โมลาร์) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า อาหารเติม NAA เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 2.4 เปอร์เซ็นต์ การแตกหน่อ 1.04 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม อาหารที่เติม NAA ร่วมกับ KN พบว่า NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.3 โมลาร์ ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 2.0 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการแตกหน่อ (ตารางที่ 17) เมื่อเติมอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอลลง สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ ในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลานานเกิน 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยวและไม่มีพัฒนาการใด ๆ

ตารางที่ 17 ผลของ NAA ร่วมกับ BA หรือ KN ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบ เมื่อลดหรือไม่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอล หลังจากเพาะเลี้ยง 1 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)			แมนนิทอล (โมลาร์)			
			0.3		0.4	
NAA	BA	KN	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ
1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.5	0.0	0.0	0.0	2.3±1.4	0.0
3.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.3±0.6	0.0
4.0	0.5	0.0	0.0	1.0±1.4	2.4±3.4	1.04±1.5
5.0	0.5	0.0	1.4±1.9	1.8±2.5	1.2±1.7	0.0
1.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.6±0.9	0.0
2.0	0.0	0.5	2.0±2.8	0.0	1.7±0.1	0.8±1.1
3.0	0.0	0.5	1.7±0.2	0.0	1.1±1.5	0.0
4.0	0.0	0.5	1.0±1.3	2.5±0.8	1.2±0.9	0.5±0.7
5.0	0.0	0.5	-	-	1.8±0.8	0.6±0.8
เฉลี่ย			1.2±0.9	0.6±1.2	1.3±0.5	0.4±0.3

- = ไม่บันทึก เนื่องจากเกิดการปนเปื้อน

± SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน