บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบ

ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืช ความสำเร็จของการชักนำให้เกิดต้นมักขึ้นกับชนิดและพันธุ์ของพืช พืชบางชนิดง่ายต่อการชักนำมากกว่าพืชชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ ในแต่ละพันธุ์ยังพบว่าพันธุ์ที่ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง (reluctant cultivars) อาจเกิดต้นแฮพลอยด์เมื่อได้รับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ส่วนพันธุ์ที่ยากต่อการเพาะเลี้ยง (reculcitant cultivars) จะไม่เกิดต้นแฮพลอยด์แม้ได้รับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแล้วก็ตาม จากการทดลองนี้ ยาสูบทั้งสองพันธุ์สามารถถูกชักนำเป็นต้นได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เริ่มตั้งแต่การควบคุมสภาพการเจริญเติบโตของยาสูบก่อนที่จะนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยง เช่น ควบคุมอุณหภูมิในโรงเรือนประมาณ 25 °C และปลูกในช่วงแสงที่สั้น (8 ชั่วโมง) และมีความเข้มของแสงสูง (16,000 ลักซ์) บำรุงรักษาโดยการใส่ปุ๋ยและฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ เพื่อลดความแปรปรวนในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงให้ได้มาก และให้ผลดีที่สุดต่อการพัฒนาของละอองเรณู (Bajaj, 1990)

อายุของต้นพืช ส่วนใหญ่พบว่า ต้นพืชที่อยู่ในระยะเริ่มออกดอก (Flower stage) จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดต่อระยะการพัฒนาของละอองเรณู เพราะการจำแนกระยะการพัฒนาที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้จำนวนละอองเรณูมากที่สุด และสามารถชักนำให้เป็นต้นแฮพลอยด์ได้ดี จากการทดลองนี้ พบว่าช่วงที่เหมาะสมที่สุด คือ ช่วงที่ละอองเรณูอยู่ในระยะ uninucleate ซึ่งเป็นระยะที่เพิ่งมองเห็นกลีบดอกอยู่เหนือกลีบเลี้ยงเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sunderland and Wicks (1969) ที่รายงานว่า ช่วงที่กลีบดอกมีขนาด 8-16 มม. ละอองเรณูอยู่ในระยะ uninucleate เป็นช่วงสำคัญที่สุดในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากการเลี้ยงอับเรณูยาสูบได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานถึงระยะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูแตกต่างกันไป ดังตัวอย่างในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของ *N. rustica* จะใช้ดอกที่มีความยาว 6.5-7.5 มม. ซึ่งละอองเรณูอยู่ในระยะ "Stage-2" หรือเป็นระยะที่ละอองเรณูแบ่งตัวแบบไมโตซีสครั้งที่ 1 (1^{st}PGM) (ประศาสตร์, 2536; Nitsch and Nitsch, 1969; Kyo, 1996)

เทคนิคการกระตุ้นอับเรณู (pretreatment) ก่อนที่จะเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญในการชักนำที่จะทำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของละอองเรณู การศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูในพืชหลายชนิดบ่งชี้ว่า การนำอับเรณูไปบ่มในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำมาเพาะเลี้ยงจะช่วยให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของละอองเรณูมีประสิทธิภาพดีขึ้น สำหรับในยาสูบ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลาหนึ่ง สามารถช่วยเพิ่มจำนวนต้นอ่อนที่เกิดจากอับเรณูนั้น ซึ่งการทดลองนี้ได้บ่มอับเรณูยาสูบซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3-5 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่า ให้ผลต่อการพัฒนาของละอองเรณูได้ดีที่สุด เทคนิคการกระตุ้นอับเรณูยาสูบที่ประสบความสำเร็จมีรายงานไว้หลายวิธี เช่น การบ่มอับเรณูในที่มืดและในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนทำการเพาะเลี้ยง คือ 12 วัน ที่ 7 °C (ประศาสตร์, 2536; Tomes *et al*, 1982) หรือ การเก็บอับเรณูไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิอยู่ในระหว่าง 7-9 °C เป็นเวลา 14-21 วัน ที่อุณหภูมิ 14 °C เป็นเวลา 7 วัน ที่ 20 °C เป็นเวลา 4 วัน หรือที่ 25 °C เป็นเวลา 2 วัน (Sunderland, 1984)

อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีข้อควรพิจารณาหลายประการ เช่น สถานะของอาหาร อาหารแข็งที่เติมวุ้นลงไปมักมีผลเสียต่อการอยู่รอดของละอองเรณู แต่การเลี้ยงในอาหารเหลวก็ทำให้มีการเจริญเติบโตของต้นอ่อนได้น้อยกว่าเนื่องจากสภาพการขาดอากาศจากการที่อับเรณูจมอยู่ใต้อาหาร ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบบนอาหารแข็งที่เติมผงถ่านลงไปเพื่อช่วยในการดูดซับสารที่เป็นพิษไว้ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Reinert and Bajaj (1977) ที่รายงานในยาสูบพันธุ์ Badischer-Burley ว่า ผงถ่านที่เติมลงไปในอาหารที่ความเข้มข้น 2.0% มีผลไปเพิ่มเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของละอองเรณูจาก 41% เป็น 91% และมีรายงานความสำเร็จของการเติมผงถ่านในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชอีกหลายชนิดในการส่งเสริมกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซิส เช่น มันฝรั่ง ข้าวโพด และพริก ซึ่งพืชเหล่านี้มีการผลิตสารประกอบฟีนอลที่จะเป็นพิษในระหว่างการเพาะเลี้ยงอับเรณู (Ferrie *et al.*, 1995) ส่วนสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบ คือ Nitsch and Nitsch (1969) ที่ให้ผลดีกว่าอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Sunderland (1984) ยังมีรายงานความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบในสูตรอาหารอื่นอีกหลาย ๆ สูตร คือ สูตร H medium (Nitsch, 1972) N_6 medium (Chu, 1978) หรือ Modified MS medium (Dixon, 1985)

ในด้านความเข้มข้นของน้ำตาลซึ่งมีผลต่อความดันออสโมติก ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 2.0% ให้ผลดีต่อพัฒนาการของละอองเรณู ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Gleba and Sytnik (1984) รายงานการใช้น้ำตาลซูโครสในปริมาณเพียง 2.0% ในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชในสกุล *Datura* และ *Nicotiana* ส่วนงานทดลองอื่น ๆ ที่ประสบความสำเร็จในการใช้น้ำตาลซูโครสเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส 2.0% รวมกับวุ้น 0.8% และเติมพวกเกลือแร่ (Nitsch and Nitsch, 1969) น้ำตาลซูโครส 8.5% และเติมสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ glutamine และ serine (Tomes *et al.*, 1982) และอาหารวุ้นที่มีเฉพาะน้ำตาลซูโครสในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงจะต้องการพวกแร่ธาตุอาหารอื่น ๆ (Bhojavani and Razdan, 1983)

สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ขนาดและลักษณะของภาชนะที่ใช้เลี้ยงมีส่วนช่วยในการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ประสบผลสำเร็จ การเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชโดยทั่วไปต้องการอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ คือ ในช่วง 15-20 °C แต่ในยาสูบจะตอบสนองได้ดีที่อุณหภูมิ 25 °C และให้แสงปกติ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า แสงมีผลน้อยมากต่อการพัฒนาของละอองเรณู ดังรายงานของ Kasperbauer and Collins (1974) พบว่าจะงอกเกิดต้นเล็ก ๆ เป็นจำนวนมากในสภาพการเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบที่อุณหภูมิ 26 °C มากกว่าที่อุณหภูมิ 21 °C และกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซิสในช่วงแรก ๆ จะไม่ต้องการแสงแต่จะมีความจำเป็นในช่วงหลังจากที่งอกเป็นต้นพืชแล้ว จากการทดลองได้วางขวดเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบบ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายมาในที่ที่มีแสงประมาณ 8 ชั่วโมงต่อวัน สำหรับปริมาณของอากาศภายในภาชนะ รวมทั้งความหนาแน่นของอับเรณูในภาชนะที่อยู่ในระดับพอเหมาะก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง โดยในการทดลองนี้ วางอับเรณูยาสูบจำนวน 5 อันต่อขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 9 ออนซ์ ที่มีปริมาตรอาหารประมาณ 50 มล. พบว่า ละอองเรณูสามารถพัฒนาได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Dunwell (1979) ที่ว่า ความถี่ที่เหมาะสมของละอองเรณูในการเกิดเป็นเอ็มบริโอได้ดี คือ เมื่อเลี้ยงในปริมาตรอาหาร 15.0 มล. ต่อ 1 อับเรณู ทั้งนี้ องค์ประกอบของก๊าซต่าง ๆ ในบรรยากาศระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น เอทธิลีน, คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนจะเป็นตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการงอกของละอองเรณู

สำหรับองค์ประกอบอื่น ๆ ของอาหาร ได้แก่ ธาตุอาหาร วิตามิน ฮอร์โมน สารประกอบพวกไนโตรเจน และแหล่งของคาร์บอนนั้น พืชแต่ละชนิดมีความต้องการแตกต่างกันไปเช่น ในพืชตระกูล Poaceae (Gramineae) และ Cruciferae มีความต้องการฮอร์โมนมาก ในขณะที่พืชใน

ตระกูล Solanaceae กลับไม่ต้องการฮอร์โมนแต่อย่างใด ดังมีรายงานว่าการใส่ฮอร์โมนพืชลงในอาหารอาจจะไม่ช่วยในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาการแต่บางทีแล้วอาจจะกลายเป็นสิ่งที่ยับยั้งการพัฒนาการไปเลยก็ได้ (Kasperbauer and Collins, 1974) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชบางชนิดจำเป็นต้องเติมสารประกอบอินทรีย์ โดยเฉพาะพวกที่เป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนลงไปในอาหารเป็นกรณีพิเศษเพื่อให้ละอองเรณูมีการพัฒนาได้ดี (Tomes *et al.*, 1982) เช่น glutamine arginine และ asparagine และสามารถส่งเสริมให้เกิดต้นพืชจากการพัฒนาของละอองเรณู ดังมีรายงานในอาหารสูตร MS (1962) ที่มี mannitol 0.4 M glutamine 3.0 mM โดยไม่ผสมฮอร์โมนชนิดใดเลย อย่างไรก็ตาม สารประกอบอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงมีผลต่อการตอบสนองที่จะเกิดขบวนการเอ็มบริโอจีนีซิสของยาสูบได้ในระยะการเจริญของละอองเรณูที่จำกัดเท่านั้น (Kyo and Harada, 1985; 1986; 1990; Reinert and Bajaj, 1977)

การตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

การเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบ ทำให้ได้ต้นยาสูบที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นครึ่งหนึ่งของต้นปกติ โดยต้นแฮพลอยด์ที่ได้จะเป็นหมันและไม่สามารถสร้างเมล็ดได้ ในการเพาะเลี้ยงสามารถผลิตต้นแฮพลอยด์ได้หลายร้อยต้นจากละอองเรณูภายในอับเรณูอันเดียว (Flick and Evans, 1984; Croughan, 1995) เมื่อตรวจสอบต้นยาสูบเล็ก ๆ ที่ได้หลังจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ 3 สัปดาห์ พบว่า เป็นยาสูบที่มีชุดของโครโมโซมเป็นครึ่งหนึ่งของต้นปกติ คือ มีจำนวน 24 โครโมโซมทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Kasperbauer and Collins (1972) อย่างไรก็ตาม หลังจากที่ย้ายต้นอ่อนออกไปเลี้ยงในอาหารที่กระตุ้นการสร้างราก แล้วปล่อยให้แคลลัสที่เหลือเจริญบนอาหารที่ใช้เลี้ยงต่อไป พบว่า สามารถเจริญเป็นต้นดิพลอยด์ และอะนิวพลอยด์ได้

วิธีการที่ดีที่สุดในการตรวจสอบความแตกต่างในระดับชุดของโครโมโซมคือ การศึกษาทางพันธุกรรมของเซลล์โดยการนับแท่งโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก แต่มีรายงานการตรวจสอบได้อีกหลายวิธีนอกเหนือไปจากวิธีการดังกล่าวที่ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ได้แก่ การนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ การวัดขนาดของรังไข่และกลีบดอก การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเกสรตัวผู้ ตลอดจนการวัดอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของใบ เป็นต้น ในการทดลองนี้พบว่า ยาสูบที่เป็นแฮพลอยด์มีขนาดของเซลล์ปากใบเล็กกว่ายาสูบดิพลอยด์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานทดลองของ Reed (1993) ที่รายงานการใช้ขนาดของเซลล์ปากใบในการตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซมที่แตกต่างกันของยาสูบพันธุ์ Ovens 52 และ Ky 15 โดย

ค่าเฉลี่ยของทั้งความกว้าง และความยาวของเซลล์ปากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (แฮพลอยด์) และยาสูบปกติ (ดิพลอยด์) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสรุปว่า ขนาดของเซลล์ปากใบจะเพิ่มขึ้นตามระดับชุดของโครโมโซม มีรายงานอื่นๆ ที่ประสบผลสำเร็จในการใช้วิธีการวัดขนาดของเซลล์ปากใบ รวมทั้งการนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบเพื่อแสดงความแตกต่างในระดับชุดของโครโมโซม ได้แก่ รายงานของ Flowers *et al.* (1967) และ Compton *et al.* (1996)

2. การรวมโปรโตพลาสต์ยาสูบ

2.1 การแยกโปรโตพลาสต์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ขึ้นกับชนิดของพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ ในขณะที่พืชหลายชนิดต้องการเอนไซม์ผสม 2 ชนิดขึ้นไปในการแยกโปรโตพลาสต์ สำหรับการทดลองนี้ได้ใช้เอนไซม์ผสม 2 ชนิด คือ Cellulase เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ Macerozyme R-10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเพียงพอต่อการทำให้เซลล์แยกเป็นอิสระ และง่ายต่อการแยกผนังเซลล์ (Carlson *et al.*, 1972; Takebe and Nagata, 1984; Dixon, 1985; Taniguchi, 1997) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่นั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นหลายประการ เช่น ชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ แม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่นำมาจากแหล่งต่างกัน คุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ก็แตกต่างกัน ดังในการทดลองนี้ ถึงแม้สามารถแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ TN 90 ได้เป็นปริมาณมากและความมีชีวิตสูง แต่สำหรับยาสูบพันธุ์ Xanthi nc กลับพบว่าแยกได้ในปริมาณค่อนข้างน้อย และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยง พบว่า โปรโตพลาสต์ที่ได้มีการพัฒนาน้อยกว่า

เมื่อทราบชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม นำข้อมูลที่ได้มาศึกษาระยะเวลาการบ่มในการย่อยโปรโตพลาสต์ได้อย่างสมบูรณ์ ในการทดลองนี้ การบ่มไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เหมาะสำหรับแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ TN 90 ในขณะที่การบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่สั้นเกินไป ทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยและอาจย่อยผนังเซลล์ออกไม่หมด แต่เมื่อใช้เวลานานขึ้น คือ มากกว่า 4 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ส่งเสริมให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากขึ้น แต่กลับทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงหลังจากการแยกประมาณ 3-5 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Takebe and Nagata (1984) ที่รายงานว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ

บ่มชิ้นพืชที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์นานขึ้น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เริ่มลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาได้มีโอกาสถูกย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ได้นานขึ้น จึงทำให้โปรโตพลาสต์แตกในที่สุด ส่วนยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มในส่วนประกอบเอนไซม์นานถึง 4 ชั่วโมงจึงจะแยกโปรโตพลาสต์ออกมาได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาในการบ่มยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดและเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์

ในการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์โดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด โมเลกุลของสีจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรสไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตดทำให้เกิดสีฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) เกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียวเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ (Power and Davey, 1990) ถ้าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง โอกาสที่โปรโตพลาสต์จะเจริญแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัสย่อมมีสูงเพิ่มขึ้นด้วยเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เทคนิคการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จึงมีประโยชน์ในเบื้องต้นเพื่อการเลือกแหล่งโปรโตพลาสต์ที่ดี มีความแข็งแรงไม่แตกง่าย ทนทานอยู่ในสารละลายเอนไซม์ได้ดี ตลอดจนสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากการทดลอง ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลูกผสมมีสูงกว่าโปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์ทั้งสองพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าในระหว่างขั้นตอนการรวมกันและทำให้ plating efficiency มีสูงขึ้นแตกต่างจากโปรโตพลาสต์ที่ไม่ได้ผ่านการรวมกัน

อายุของใบยาสูบที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อจำนวนและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากความอ่อนแก่ของใบพืชมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกัน (สมปอง, 2530) สำหรับการทดลองนี้ใช้ใบยาสูบคู่ที่ 2-3 พบว่า ส่งเสริมให้ได้โปรโตพลาสต์ในปริมาณสูง

2.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ ในอาหารเพาะเลี้ยงจึงต้องเติมสารรักษาแรงดันออสโมติกลงไปในทำนองเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์ และโดยทั่วไป ความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติกที่ใช้เพาะเลี้ยงก็ใช้เท่ากับความเข้มข้นที่ใช้แยก ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบในอาหารเหลว ซึ่งพบว่า โปรโตพลาสต์สามารถเจริญได้ดี สร้างผนังเซลล์ใหม่ และแบ่งเซลล์ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Nagata and Takebe (1970) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบในอาหารเหลวส่งเสริมการแบ่งตัวของโปร-โตพลาสต์ได้ดีที่สุด ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวและการพัฒนาก็สั้นกว่าวิธีอื่น โดยโมเลกุลของสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง และจากการทดลองโปร-โตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่หลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวภายใน 24 ชั่วโมง และแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มโคโลนีหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของเซลล์จากใบยาสูบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (ประสาทพร, 2541; Takebe and Nagata, 1984; Blackhall *et al*., 1994)

ในพืชบางชนิดความเข้มข้นของ mannitol 0.6 M ที่เติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเหมาะต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ของพืชดิพลอยด์ปกติที่แยกได้จากใบ ในขณะที่การเจริญของโปร-โตพลาสต์พืชแฮพลอยด์ของพืชต้นเดียวกันนี้ต้องการ mannitol เพียง 0.5 M (คำนูญ, 2542; Nagata and Takebe, 1970; 1971) ซึ่งจากการทดลองนี้ให้ผลในลักษณะเดียวกันคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติก 0.35 โมลาร์ โปรโตพลาสต์มีลักษณะเหี่ยวแฟบ และตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยง หรือลอยเดี่ยวในอาหาร เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโต-พลาสต์ไม่มีลักษณะกลมแต่งแต่อย่างใด แต่กลับมีสีซีด หรือเป็นสีน้ำตาล ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงในปริมาณมากและไม่มีการแบ่งเซลล์ เมื่อวางเลี้ยงต่อไปไม่พบการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ใด ๆ เกิดขึ้น หลังจากนำไปตรวจสอบพบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลง และตายหมดในที่สุดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงทดลองลดความเข้มข้นของแมนนิทอลลงเหลือ 0.25 โมลาร์ เริ่มพบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ หลังจากเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหลังจากเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง มีไซโตพลาสซึมเข้มข้น เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวมีจำนวนจนเต็มเซลล์ และบางเซลล์เริ่มมีลักษณะรี แสดงว่ามีการสร้างผนังเซลล์เพื่อเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ และเริ่มสังเกตพบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยงประมาณ 5-7 วัน ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีสูงขึ้น

หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์จะมีการพัฒนาโดยการแบ่งเซลล์และการแตกหน่อเพิ่มมากขึ้น ส่วนความเข้มข้นของสารละลายแมนนิทอล 0.30 โมลาร์ มีผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอยู่ในระดับสูงเพียงช่วง 2-3 วันแรกหลังการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเวลาผ่านไปความมีชีวิตกลับลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับแมนนิทอลในความเข้มข้นต่ำ 0.20 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ไม่สามารถมีชีวิตรอดในระยะเวลาเพียงไม่ถึงสัปดาห์

จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากแต่ละโปรโตพลาสต์มีการแพร่สาร metabolite ที่สร้างลงในอาหารเพาะเลี้ยง และมีผลไปสนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao and Michayluk, 1975) ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมอยู่ในระหว่าง $1x10^4$- $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดและสรีรวิทยาของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ในขณะนั้น (คำนูญ, 2539) สำหรับในยาสูบ ความหนาแน่นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อยู่ระหว่าง $1x10^5$-$1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (Takebe and Nagata, 1984) ความหนาแน่นที่มากเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน แต่หากน้อยเกินไปโปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญได้ และในการทดลองนี้ สอดคล้องกับ Blackhall *et al.* (1994) ที่ว่า ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการสร้างเอ็มบริออยด์ของโปรโตพลาสต์ยาสูบได้ดีที่สุด

เมื่อโปรโตพลาสต์เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่แล้วไม่จำเป็นว่าจะต้องเกิดการแบ่งเซลล์ทันที อาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์อาจไม่เหมาะต่อการแบ่งเซลล์หรือการเจริญของเซลล์ใหม่ที่ได้ ในทำนองเดียวกันอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอาจไม่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ เพราะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีอยู่อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรโตพลาสต์ขยายและแตก จึงควรเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่ช่วยในการสร้างผนังเซลล์ แล้วจึงย้ายไปยังอาหารใหม่ที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ จากการทดลองนี้ในระยะ 1-2 สัปดาห์แรกจะเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร PS (1981) ที่เติมซูโครส เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 2.25 มก./ล. และ Zeatin เข้มข้น 0.75 มก./ล. จากนั้น จึงจะย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส เข้มข้น 3.0%, 2, 4-D เข้มข้น 0.25 มก./ล., BAP เข้มข้น 2.0 มก./ล. ซึ่งโปรโตพลาสต์บางชนิดสามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่แล้วมีการแบ่งเซลล์เจริญได้ในอาหารชนิดเดียวกันก็ได้ จะเห็นได้ว่าชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ซึ่งอาหารที่ใช้ในการ

เลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป แต่ต้องเติมสารรักษาแรงดันออสโมติกไปจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ จากผลการทดลองนี้โปรโตพลาสต์ของยาสูบเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ Zeatin ในระยะเวลาหนึ่ง แล้วเปลี่ยนถ่ายเป็นอาหารสูตร MS (1962) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4—D และ BAP โดยเลี้ยงในสภาพที่ควบคุมความชื้นของบรรยากาศประมาณ 85% และความเข้มแสงประมาณ 800-1,200 ลักซ์ กลับจานพลาสติกที่เลี้ยงโปรโตพลาสต์ทุกวัน ๆ ละ 3 ครั้ง ช่วยให้การเจริญเติบโตและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์เป็นไปได้ดี โดยสามารถเข้าสู่วงจรการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน

2.3 การรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้กระแสไฟฟ้า

เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้ AC field 50 V cm^{-1} ในความถี่ 0.5 MHz และใช้กระแส DC ขนาด 0.7 kV cm^{-1} 2 ช่วง ๆ ละ 50 μs โดยแต่ละช่วงจะให้ไม่ห่างกันเกิน 1 วินาที มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของโปรโตพลาสต์ที่จะมาสัมผัสกัน, fusion efficiency, cell lysis, ความมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์ที่ได้หลังจากการรวมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ plating efficiency 7 วันหลังจากการรวมกัน เป็นต้น หลังจากการรวมกันด้วยกระแสไฟฟ้าโปรโตพลาสต์ใบยาสูบมี PE ถึง 60% (Matibiri and Mantell , 1995) ดังมีรายงานการรวมโปรโตพลาสต์ของ *Nicotiana tabacum* และ *Nicotiana rustica* ใช้กระแสไฟฟ้า DC 10-30 microsecond และ AC 1 k V/cm (Saunders *et al.*, 1996) ในการทดลองนี้ ใช้กระแสไฟฟ้าสลับ AC 2 ช่วงในความถี่ 1 MHz คือ Primary AC Voltage 12 V และ Secondary AC Voltage 10 V โดยมีระยะห่าง (Pulse width) ช่วงละ 40 μs โดยแต่ละช่วงจะมี Initial time คือจะให้ห่างกันไม่เกิน 7 วินาที และใช้กระแสไฟฟ้าตรง Pulse height (DC Voltage) อีก 10 V ซึ่งจะได้ค่า Electric field strength 0.03 kV/cm รวมระยะเวลา Final time ทั้งหมด 10 วินาทีจึงเสร็จสิ้นขบวนการ ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ ก็แตกต่างกันไปตามแต่ละพืช เช่นในการทดลองของ Suh and Lee (1986) การรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ไฟฟ้าของพืชต่างสกุลกันระหว่าง *Nicotiana tabacum* พันธุ์ Virginia 115 กับ *Pisum sativum* พันธุ์ Sparkle ใช้ AC 600 V/cm และความถี่ 800 kHz กับโปรโตพลาสต์ของยาสูบ และ 600 V/cm ในความถี่ 700 kHz กับโปรโตพลาสต์ของถั่วลันเตา ให้มาเรียงตัวกันเป็น pearl chain และให้สนามไฟฟ้ากระแสสูง DC ที่ 1 kV/cm เป็นระยะเวลา 50 microsecond จะให้ค่า PE ได้ดีที่สุด เป็นต้น

จากการทดลอง การรวมโปรโตพลาสต์มีผลต่อการเพิ่ม plating efficiency ในระหว่างการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้กระแสไฟฟ้ามีสูงกว่ายาสูบแฮพลอยด์ สอดคล้องกับงานของ Kirichenko and Gleba (1991)รายงานการรวมโปรโตพลาสต์ในยาสูบว่า ประสบผลสำเร็จได้ถึง 95% มีรายงานความสำเร็จในการผลิตลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ยาสูบทั้งระหว่างชนิดเดียวกัน ได้แก่ *Nicotiana debneyi* + *N. debneyi*, *N. plumbaginifolia* + *N. plumbaginifolia* และ *N. tabacum* + *N. tabacum* และระหว่างต่างชนิดกัน ได้แก่ *N. tabacum* + *N. alata*, *N. tabacum* + *N. glauca*, *N. tabacum* + *N. glutinosa*, *N. tabacum* + *N. knightiana*, *N. tabacum* + *N. nesophila*, *N. tabacum* + *N. otophora*, *N. tabacum* + *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* + *N. repanda*, *N. tabacum* + *N. rustica*, *N. tabacum* + *N. stocktanii* และ *N. tabacum* + *N. sylvestris* (Dixon, 1985;Gleba and Sytnik, 1984)

3. การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างในยาสูบลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์

เมื่อสำรวจหาระดับความต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างของยาสูบลูกผสม ในสภาพเรือนกระจกโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล พบอาการเป็นจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อ (local lesion) บนใบที่ปลูกเชื้อไวรัสลงไปในปริมาณน้อย แต่ส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ โดยสังเกตอาการได้หลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดในพันธุ์ยาสูบที่ต้านทานต่อไวรัสได้ คือ แต่ในพันธุ์ Xanthi nc ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรค นอกจากนี้ ยังไม่พบการแสดงอาการบนต้นยาสูบลูกผสมหลังจากปลูกเชื้อด้วย ในขณะที่พันธุ์การค้า คือ TN 90 เริ่มพบลักษณะด่างแบบ systemic ในต้นที่ปลูกเชื้อไวรัสหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน หลังจากนั้นอาการจะด่างชัดเจนขึ้น แสดงว่า ยาสูบลูกผสมมีความต้านทานต่อ TMV ในระดับสูง (highly resistant) (Todd, 1981) โดย *N* gene จากยาสูบพันธุ์ต้านทาน คือ Xanthi nc สามารถถ่ายทอดมาสู่พันธุ์ TN 90 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนการทดสอบในสภาพไร่โดยการปล่อยให้เกิดโรคตามสภาพธรรมชาติก็ให้ผลเช่นเดียวกัน จากการสำรวจหาระดับความต้านทานต่อโรค เริ่มสังเกตพบอาการของโรคใบด่างแบบ systemic ในต้นยาสูบพันธุ์ TN 90 หลังจากย้ายปลูกในไร่ได้ 20 วัน คิดเป็นอัตรา 12.5% หลังจากนั้นอาการจะด่างชัดเจนและทำความเสียหายมากขึ้น โดยทำให้ต้นยาสูบแคระแกร็น การพัฒนาของดอกช้า และการติดกระเปาะเมล็ดไม่สมบูรณ์ ในขณะที่พันธุ์ Xanthi nc ไม่พบอาการแต่อย่างใด ส่วนลูกยาสูบผสมสามารถต้านทานต่ออาการด่างแบบ systemic ได้ดี ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยสามารถใช้เป็น

แนวทางในการแก้ปัญหาความเสียหายที่เกิดจากโรคใบด่างแก่ชาวไร่ผู้ปลูกยาสูบ และใช้เป็นยาสูบพันธุ์ใหม่เผยแพร่ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University