บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

สรุป

1. ผลของการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Cattleya dowiana, Dendrobium x Jaquelyn Thomas และ Dendrobium pachyphyllum ในสูตรอาหารของ Schenk & Hildebrandt (1972) ตามวิธีการของ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ให้แคลลัสสีเขียวเข้มเจริญแบ่งตัวได้แคลลัสจำนวนมาก ส่วนการเพาะเมล็ดของ C. dowiana, Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สามารถเพาะเมล็ดในสูตรของ Schenk & Hildebrandt (1972) หรือ สูตรดัดแปลง Schenk & Hildebrandt (1972) ตามวิธีการของ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ได้ต้นที่สมบูรณ์ ใบมีสีเขียวและเจริญได้ดี

2. ผลของการเปลี่ยนอาหารของแคลลัสและต้นอ่อนกล้วยไม้ ทุก 1, 2 และ 3 สัปดาห์ พบว่าการเปลี่ยนอาหารกล้วยไม้บ่อยๆทุก 1 สัปดาห์ ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

3. ผลของความเข้มแสง 0, 1,200 และ 1,600 ลักส์ที่ให้กับกล้วยไม้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าเมื่อให้ความเข้มแสง 1,200 ลักส์ กับ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

4. ผลของการแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ เมื่อใช้ cellulase R-10 1.0% ร่วมกับ macerozyme R-10 0.5% หรือ 1.0% แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนมาก นอกจากนี้ยังแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและใบของ C. dowiana, Den. x Jaquelyn Thomas, Den. pachyphyllum ได้บ้าง

5. ผลของการใช้ mannitol เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆร่วมกับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019% แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้สกุล Dendrobium และ Acriopsis indica ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อใช้ mannitol ความเข้มข้น 9.7% และ Spathoglotis hybrid แยกโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุด เมื่อใช้ mannitol ความเข้มข้น 9.8%

6. ผลของอุณหภูมิและช่วงระยะเวลาในการบ่ม พบว่าที่อุณหภูมิ 30-32 °C แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อใช้เวลาในการบ่ม 8 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 24-27 °C ใช้เวลาในการบ่มนานขึ้น โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดเมื่อใช้เวลาในการบ่ม 12-14 ชั่วโมง และแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อใช้เวลาในการบ่ม 10-14 ชั่วโมง ตามลำดับ

7. ผลของความเข้มแสงระหว่างการบ่ม พบว่าเมื่อบ่มไว้ในที่มืดสามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าเมื่อบ่มไว้ในที่ความเข้มแสง 1,200 ลักส์

8. ผลของการใช้ผ้ากรองขนาด 20, 30 และ 40 ไมครอน พบว่าผ้ากรองขนาด 40 ไมครอน กรองโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้ดี ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

9. ผลของการ centrifuge ที่แรงเหวี่ยง 159-182 g และ 227 g พบว่าการ centrifuge โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ที่ 159-182 g ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่า ที่ 227 g

10. ผลของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารประมาณ 1 วัน โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ และโปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งตัวภายใน 3-4 วัน หลัง

จากเลี้ยง ซึ่งการเจริญของโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับแต่ละสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ว่ามีความเหมาะสมเพียงใดในการเจริญของโปรโตพลาสต์

อภิปรายผล

การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ ต้องหาแหล่งของพืชทดลองที่เหมาะสมและเพียงพอเพื่อใช้ตลอดการวิจัย ซึ่งอาจได้มาจากส่วนต่างๆของกล้วยไม้ในธรรมชาติ หรือ จากการเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อในหลอดแก้วก็ได้ เมื่อพิจารณาถึงกล้วยไม้ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติตามภูมิอากาศของประเทศไทย ประกอบกับลักษณะการเจริญของกล้วยไม้ ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่เจริญค่อนข้างช้าและเซลล์ผิวใบหนา สิ่งเหล่านี้มีผลต่อสภาพทางสรีรวิทยาและการทำงานของเซลล์โดยตรง ทั้งยังมีผลต่อปริมาณและการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้อีกต่อหนึ่ง การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถควบคุมปัจจัยในการเจริญ ตลอดจนสภาพแวดล้อมในการเจริญเหล่านี้ รวมทั้งไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆมาเป็นอุปสรรค ในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ กล้วยไม้ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นแหล่งของพืชทดลอง ที่เหมาะสมกว่ากล้วยไม้ในสภาพธรรมชาติ (Chung, 1987)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เมื่อใช้สูตรของ Schenk & Hildebrandt (1972) ซึ่งได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่สามารถเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของพืชหลายชนิด ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่เพื่อใช้เป็นสูตรทั่วไป พบว่าแคลลัสของ Cattleya dowiana, Dendrobium x Jaquelyn Thomas และ Dendrobium pachyphyllum มีสีเหลืองแต่ยังเพิ่มจำนวนแคลลัสมากขึ้นได้ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) รายงานว่าน้ำมะพร้าวมีส่วนช่วยเสริมการเจริญของกล้วยไม้ รวมทั้งแนะนำให้ลดธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากลงครึ่งหนึ่ง ลดซูโครสลงเหลือ 2.0% และใช้ฮอร์โมน NAA 0.1 ถึง 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เนื้อเยื่อของ Cattleya และ Dendrobium เจริญได้ดีขึ้น ในการทดลองนี้ เมื่อลดธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากลงครึ่งหนึ่งและใช้น้ำมะพร้าว 10.0%เพื่อเสริมสารอื่นแก่แคลลัสในสูตรดัดแปลงของ Schenk & Hildebrandt (1972) ตามวิธีการของ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ทำให้แคลลัสมีสีเขียวเข้มและเจริญได้ดีขึ้น

สำหรับการเพาะเมล็ดของ C. dowiana, Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid การใช้สูตรของ Schenk & Hildebrandt หรือสูตรดัดแปลง Schenk & Hildebrandt ตามวิธีการของ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย ให้ผลเช่นเดียวกันคือได้ protocorm สีเขียวจำนวนมากและเกิดเป็นต้นจำนวนมากเช่นกัน ซึ่งทั้งสองสูตรไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเพิ่มเติมในสารอาหารเลย เพราะเซลล์ที่เจริญจากการเพาะเมล็ดเป็นส่วนหนึ่งของเอมบริโอซึ่งมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนได้อย่างเพียงพอต่อการเจริญ

การศึกษาสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงแคลลัสและต้นกล้วยไม้ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ จากการทดลองเมื่อเปลี่ยนอาหารของต้นอ่อนกล้วยไม้ทุก 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการเปลี่ยนอาหารต้นอ่อนทุก 2-3 สัปดาห์ เป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนอาหารของต้นกล้วยไม้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้ลดการสะสมของของเสีย ในขณะเดียวกันกล้วยไม้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีขึ้น จึงมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่ง Vasil (1976) อธิบายว่าการกระตุ้นให้ต้นพืชมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ทำให้ลดการสะสมของลิกนินในเซลล์ ซึ่งลิกนินทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้ยาก Opatrny และคณะ (1980) (อ้างถึง ใน Evans and Bravo, 1983) ทดลองกับ Solanum tuberosum ให้ผลเช่นเดียวกันคือ การเปลี่ยนอาหารให้ต้นพืชบ่อยๆช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญดีขึ้น เมื่อนำมาแยกโปรโตพลาสต์จึงได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก Gamborg และคณะ (1983) พบว่าเซลล์ของ Glycine sp. ที่มีอายุ 3-6 วัน หลังการเปลี่ยนอาหารใช้แยกโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด และ Wilson และคณะ (1985) พบว่าเมื่อเปลี่ยนอาหารอย่างน้อย 2 ครั้งในช่วง 4 วันให้กับ cell suspension ของ Psophocarpus tetragonolobus ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ทำให้เซลล์ส่วนใหญ่มีรูปทรงกลม และมีไซโตพลาสซึมเข้มข้นเหมาะกับการแยกโปรโตพลาสต์ และ Nishimaki และคณะ (1985) รายงานว่าการเปลี่ยนอาหารให้แคลลัสของมันเทศ (Ipomoea batatus) ทุก 6 วัน ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด ส่วนการให้แสงแก่พืชทดลองก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์นั้น ในการทดลองนี้การให้แสงความเข้มแสง 1,200 ลักส์ ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้มากกว่าไว้ในที่มืดและที่ความเข้มแสง 1,600 ลักส์ คาดว่าความเข้มแสง 1,200 ลักส์ เป็นความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด Cassels และ Barlass (1976) (อ้างถึงใน Pua,1987) อธิบายว่าการปลูกมะเขือเทศ

ในสภาพความเข้มแสงต่ำ ทำให้ใบสังเคราะห์ pectate ซึ่งมาสะสมที่ผนังเซลล์ได้น้อย ปี 1987 Dai และคณะ รายงานว่าต้นอ่อนของ Solanum sp. เมื่อไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ไม่สามารถแยกโปรโต-พลาสต์ได้เลย และ Tavazza และ Ancora (1986) พบว่า Solanum tuberosum ที่ปลูกในที่อุณหภูมิสูง ถ้าได้รับความเข้มแสงมาก ทำให้การอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ลดลง

ในการนำพืชทดลองมาแยกโปรโตพลาสต์นั้น เอนไซม์ที่ใช้มีอยู่หลายชนิด แต่จัดได้เป็น 2 กลุ่มคือ pectinase เพื่อย่อย middle lamella ทำให้เซลล์แยกจากกัน และ cellulase, hemicellulase เพื่อย่อยผนังเซลล์ การใช้เอนไซม์อาจผสมเอนไซม์จากทั้ง 2 กลุ่มเข้าด้วยกัน หรือใช้ pectinase ก่อนแล้วจึงใช้ cellulase ก็ได้ การทดลองนี้ใช้ cellulase และ macerozyme ในการแยกโปรโตพลาสต์จากกล้วยไม้ 6 พันธุ์ พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้แตกต่างกันในกล้วยไม้ต่างสกุลและต่างพันธุ์ นอกจากนั้นส่วนของกล้วยไม้ที่นำมาแยกก็ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่างกัน โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าแยกจากแคลลัส เนื่องจากเซลล์ใบอยู่กันค่อนข้างหลวม ขณะที่เซลล์ของแคลลัสค่อนข้างหนาแน่น มีความแตกต่างในขั้นตอนการเจริญมากกว่าและเซลล์บางส่วนมีการสร้างลิกนิน ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica ซึ่งโดยธรรมชาติเป็นกล้วยไม้อากาศ กับ Spathoglotis hybrid ซึ่งเป็นกล้วยไม้ดิน โดยใช้เซลล์จากการเลี้ยงในหลอดแก้ว กลับปรากฏว่าจำนวนโปรโต-พลาสต์ที่แยกได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นการใช้เซลล์จากการเลี้ยงต้นกล้วยไม้ในหลอดแก้ว น่าจะทำให้เกิดความสม่ำเสมอขององค์ประกอบทางสรีรวิทยาของเซลล์พืชตามธรรมชาติได้ในระดับหนึ่ง โดยเฉพาะใบของพืชที่เลี้ยงในหลอดแก้วมีลักษณะค่อนข้างบางกว่าในธรรมชาติ (ถาวร วัชราภัย แนะนำส่วนตัว) กล่าวได้ว่าลักษณะทางกายภาพและขั้นตอนการเจริญของพืชทดลองมีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ ซึ่งในพืชอื่นก็มีรายงานเช่นเดียวกัน เช่น Nakagawa และคณะ(1984) พบว่าขั้นตอนการเจริญของเซลล์ในแคลลัส Spinacia oleracea มีผลต่อจำนวนและการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ ในปี ค.ศ. 1984 Glimelius (อ้างถึงใน Pua, 1987) พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้มากกว่าเซลล์ที่เจริญช้า ซึ่งมีการสังเคราะห์สารพิษ เช่น phenolic ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเจริญของเซลล์ และในปี ค.ศ. 1987 Ochatt และคณะรายงานว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์จาก cell suspension ของ colt cherry ได้มากกว่าใบ

และเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุดจาก cell suspension มีความเข้มข้นสูงกว่าเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์จากใบมาก ในการทดลองนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ cellulase 1.0% และ macerozyme 0.5% เมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ ถึงแม้จะได้โปรโตพลาสต์มากขึ้นแต่ก็ยังเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ได้ (มนทกานติ วัชราภัย แนะนำส่วนตัว) ซึ่งตรงกับรายงานของ Lee และ Wetzstein (1988) ที่รายงานว่าการใช้ cellulase และ macerozyme ที่มีความเข้มข้นสูงทำให้การอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ของอุ่นลดลง ทั้งนี้เอนไซม์ที่ใช้กันมักมีสารประกอบและเอนไซม์อื่นเจือปนอยู่ ซึ่งแม้จะช่วยในการย่อยสลายผนังเซลล์ที่มีความซับซ้อนได้ดีขึ้น แต่ก็เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์เช่นกัน (Vasil,1976) นอกจากนั้นเอนไซม์บางชนิดอาจเป็นผลเสียต่อโปรโตพลาสต์ Grun และ Chun (1978) พบว่าการใช้ cellulase แยกโปรโตพลาสต์ของ Solanum sp.ได้มากกว่าการใช้ cellulase ร่วมกับ macerozyme และในปี ค.ศ. 1980 Muhbach รายงานว่า driselase เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศ การใช้เอนไซม์จึงต้องทดลองเลือกชนิดที่ไม่เป็นผลเสียต่อโปรโตพลาสต์ ทั้งในด้านปริมาณและการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้

ในเซลล์พืชผนังเซลล์นับเป็นโครงสร้างที่สำคัญ สารประกอบในผนังเซลล์มี cellulose hemicellulose และน้ำเป็นส่วนใหญ่ (Selby,1973) นอกจากนี้ยังมีสารพวก pectin lignin ซึ่งมีคุณสมบัติค่อนข้างแข็งช่วยให้ความแข็งแรงแก่เซลล์ ผนังเซลล์เป็นตัวรับแรงดันจากสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้และทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ให้เกิดขึ้นพอเหมาะสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องใช้สารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสร่วมกับสารละลายของเอนไซม์เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตก ขณะเดียวกันก็ช่วยในการหดตัว (plasmolyse) ของเซลล์ทำให้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ได้ดีขึ้น สารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสอาจเป็นสารประกอบ ionic หรือ non-ionic ก็ได้ สารประกอบที่นิยมใช้กันมากคือ mannitol sorbitol กลูโคส หรือ ซูโครส ซึ่งเป็นสารประกอบ non-ionic การเลือกใช้สารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่เหมาะสมทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากและมีอัตราการอยู่รอดสูง (Chung,1987) การทดลองนี้เมื่อใช้กลูโคส 9.01% ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ได้ผลดีใน การรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสของยาสูบมาแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์ ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้

ทั้ง 6 พันธุ์แตกปกติแล้วสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสจะถูกดูดซึมและคงอยู่ในโปรโตพลาสต์ได้ (Ruesink,1973 และ Robinson and Loveys,1986) แต่โมเลกุลของกลูโคสและ sorbitol นั้น โปรโตพลาสต์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึมได้ คุณสมบัติในการเป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสจึงลดลง เนื่องจากการควบคุมระดับของของกลูโคส และ sorbitol ให้คงที่ทำได้ยาก การทดลองนี้จึงเปลี่ยนมาใช้ mannitol เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส พบว่าสามารถรักษาดุลยภาพของโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้สกุล Dendrobium และ Acriopsis indica ได้ดีที่สุด เมื่อความเข้มข้นของ mannitol เป็น 9.7% และรักษาดุลยภาพของโปรโตพลาสต์ Spathoglotis hybrid ได้ดีที่สุดเมื่อความเข้มข้นของ mannitol เป็น 9.8% การใช้ mannitol ในการรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสได้ผลดีเพียงใด ย่อมขึ้นกับระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ด้วย นั่นคือเมื่อใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ในระดับที่แยกโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุดร่วมกับสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่เหมาะสม ทำให้ปริมาณและการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สูงที่สุด เห็นได้ว่าการเลือกสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่เหมาะสม ต้องพิจารณาถึงลักษณะทางสรีรวิทยาและองค์ประกอบในเซลล์ของพืชทดลองอีกด้วย การทดลองที่ใช้สาร non-ionic เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส เมื่อใส่เกลือบางอย่างลงในสารละลายเอนไซม์ก็ช่วยในการรักษาดุลยภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้อัตราการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ดีขึ้น (Kao และคณะ,1973, Bhojwani และ Razdan,1983) และ Ruesink (1973) พบว่าการมี divalent cations ทำให้ยับยั้งการสร้าง ribonuclease(RNase) ซึ่งเอนไซม์นี้มีผลทำให้โปรโตพลาสต์แตก การทดลองนี้ใช้ $CaCl_2.2H_2O$ เพื่อช่วยรักษาเสถียรภาพของโปรโตพลาสต์

ระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์ สารละลายเอนไซม์จะถูกนำไปบ่มเพื่อให้เอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ออกไปได้ดี ระยะเวลาในการบ่ม แสง และอุณหภูมิ มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด พืชทดลองที่มีผนังเซลล์ค่อนข้างหนาย่อมใช้เวลาในการบ่มมาก สำหรับ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid แยกโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุดเมื่อบ่มไว้ 8 ชั่วโมงที่ 30-32 °C แต่ที่อุณหภูมิ 24-27 °C ต้องใช้เวลาในการบ่มนานขึ้นเป็น 12-16 ชั่วโมง ซึ่ง Bhojwani and Razdan,1983 พบว่า cellulase และ macerozyme ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 °C ปี ค.ศ. 1985 Handley และคณะ พบว่าการใช้เวลาในการบ่มตลอดคืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) ทำให้ได้โปรโตพลาสต์มากกว่าการบ่มเพียง 2.5

ชั่วโมงถึง 2-3 เท่า อย่างไรก็ตามการใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน สิ่งเจือปนในเอนไซม์อาจเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ได้ สารละลายเอนไซม์ที่บ่มไว้ตามเวลาที่กำหนดแล้ว ต้องนำมากรองเอาเศษของเซลล์และสิ่งสกปรกต่างๆออกไปโดยใช้ผ้ากรอง ในการแยกโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid เศษของเซลล์เกิดขึ้นไม่มากนัก ขนาดของโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยประมาณ 15-45 ไมครอน การใช้ผ้ากรองขนาด 40 ไมครอนจึงได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด และหลังจากกรองโปรโตพลาสต์แล้วก็จะนำโปรโตพลาสต์ไปล้างเอาเอนไซม์และสิ่งสกปรกที่อาจมีอยู่ออกอีกครั้งหนึ่ง โดยเติมสารละลายสำหรับล้างแล้วนำไป centrifuge การ centrifuge ต้องใช้แรงเหวี่ยงให้พอเหมาะกับโปรโตพลาสต์ของพืช เพราะหากแรงเหวี่ยงมากเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตกได้ง่าย สำหรับโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid พบว่าแรงเหวี่ยงในการ centrifuge ที่เหมาะสมคือ 159-182 g

หลังจากแยกโปรโตพลาสต์และล้างเอาเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ออกไปแล้ว โปรโตพลาสต์เริ่มมีการเจริญอย่างรวดเร็ว เกิดการไหลเวียนของไซโตพลาสซึม อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น มีการสังเคราะห์ RNA, โปรตีน, polysaccharides และมีการเพิ่มขึ้นขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กอลจิบอดี้ ไมโตคอนเดรีย พลาสติด ไรโบโซม และเอนโดพลาสมิกเรคติคิวลัม กิจกรรมของโปรโตพลาสต์เหล่านี้จะเกิดขึ้นได้ ถ้าโปรโตพลาสต์ได้รับสารอาหารตลอดจนปัจจัยในการเจริญอย่างเหมาะสม (Vasil, 1976 และ Fowke and Gamborg,1980) สิ่งแรกที่แสดงถึงการเจริญของโปรโตพลาสต์ คือการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และองค์ประกอบภายในเซลล์ส่วนใหญ่โดยเฉพาะคลอโรพลาสต์จะมารวมกลุ่มอยู่รอบๆนิวเคลียส (Vasil,1976) การทดลองนี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ในสารอาหารเพื่อให้มีการเจริญต่อไปโดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวบนแผ่นสไลด์แบบ microchamber technique และเลี้ยงในสภาพหยดขนาดเล็กแบบ microdrop technique ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่ออาหารที่ใช้เลี้ยง $1.0x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร ซึ่งคาดว่าเป็นระดับความหนาแน่นที่เหมาะกับการเจริญ เมื่อความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เหมาะสม จะมีการสังเคราะห์สารบางอย่างที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวได้ (ประสาทพร สมิตะมาน,2528) การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในสภาพหยดขนาดเล็กทำให้โปรโตพลาสต์มีการแลกเปลี่ยนก๊าซอย่างเพียงพอการปรับความสมดุลย์ของออสโมซิส หรือ การเติมอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็ทำได้สะดวก อย่างไรก็ตามการ

เลี้ยงในสภาพหยดขนาดเล็กนี้ โปรโตพลาสต์จะรวมกลุ่มกันอยู่กลางหยดของอาหารเลี้ยง ถ้ามีโปรโตพลาสต์ใดปล่อยของเสียหรือสารพิษออกมา ทำให้โปรโตพลาสต์อื่นได้รับอันตรายไปด้วย (Evans and Bravo,1983)

ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น จากการศึกษาของ Nishimura และ Akazawa (1975) (อ้างถึงใน Vasil, 1976) พบว่าพฤติกรรมการทำงานของโปรโตพลาสต์คล้ายคลึงกับภายในเซลล์ปกติ จึงกล่าวอย่างกว้างๆได้ว่าสารอาหารที่จำเป็นสำหรับโปรโตพลาสต์และเซลล์ไม่ต่างกันมากนัก อาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์พืช สูตรอาหารที่นิยมนำมาดัดแปลงเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ สูตร B_5 (Gamborg และคณะ, 1968) (ภาคผนวก ค) และสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) การทดลองนี้นอกจากใช้สูตร B_5 แล้ว ยังนำสูตรตาม Schenk & Hildebrandt (1972) และสูตรตาม ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ซึ่งใช้ได้ผลดีในการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มาดัดแปลงเพื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วย สิ่งสำคัญในการทดลองแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ ต้องทำการทดลองด้วยความละเอียดรอบคอบทุกขั้นตอน เพราะการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆทั้งภายใน และจากสภาพแวดล้อมมีผลกระทบต่อความอยู่รอดของโปรโตพลาสต์อย่างต่อเนื่อง ปัญหาที่สำคัญในช่วงแรกของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ การรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสให้ได้ตลอดระยะเวลาที่โปรโตพลาสต์กำลังมีการเจริญ จนกระทั่งมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้สมบูรณ์ ขณะเดียวกันก็กระตุ้นโปรโตพลาสต์ให้แบ่งเซลล์ได้มากที่สุด

การทดลองนี้เมื่อใช้อาหารสูตร B_5 ถึง B_5-3 ซึ่งใช้กลูโคสและซูโครสเป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส โดยสูตร B_5 ใช้ความเข้มข้นกลูโคสเป็น 7.2% (72,100 มิลลิกรัม/ลิตร) และซูโครส 0.025% (250 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบ ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้แตก สูตร B_5-1 จึงเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 7.7% (76,854 มิลลิกรัม/ลิตร) และซูโครสเป็น 0.027% (267 มิลลิกรัม/ลิตร) ความเข้มข้นรวมสูงกว่าสูตร B_5 ประมาณ 6.9 % (การแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ใช้ความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส ในสารละลายเอนไซม์สูงกว่ายาสูบประมาณ 6.6%) พบว่าโปรโตพลาสต์บางส่วนสามารถอยู่รอดได้ แต่ระยะเวลาในการอยู่รอดค่อนข้างสั้นเพียง 3-5 วัน สำหรับโปรโตพลาสต์ของ Acriop-

sis indica และ 2 วัน สำหรับโปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดสร้างผนังเซลล์แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ ในสูตร B_5-2 จึงเพิ่มสารควบคุมการเจริญ 2,4-D เป็น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้ NAA มิลลิกรัม/ลิตรร่วมกับน้ำมะพร้าว 5% พบว่าโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ 2 ชนิดมีการแบ่งตัวของไซโตพลาสซึมแต่การไม่มีการแบ่งนิวเคลียส ทั้งที่ในพืชส่วนใหญ่การใช้สารควบคุมการเจริญ NAA และ 2,4-D ทำให้โปรโตพลาสต์มีการเจริญและแบ่งเซลล์ได้ดี เช่น Burger และ Hackett (1982) พบว่า NAA และ kinetin ช่วยเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ปี ค.ศ. 1982 Takeuchi และ Komamine รายงานว่า BAP และ 2,4-D มีความจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของ Catharanthus roseus (syn. Vinca rosea) และ Szabados และ Gaggero (1985) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Beta vulgaris โดยใช้ NAA, 2,4-D และ zeatin ทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ ดังนั้นสิ่งหนึ่งที่อาจเป็นสาเหตุของการเจริญอย่างผิดปกตินี้ก็คือ การเปลี่ยนสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสจาก mannitol ในช่วงการแยกและล้างโปรโตพลาสต์มาเป็นกลูโคส และซูโครส ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่สามารถปรับสภาวะการทำงานตามการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วได้ ในสูตร B_5-3 จึงเปลี่ยนสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสเป็น mannitol 2.7% (27,330 มิลลิกรัม/ลิตร) ร่วมกับกลูโคส 3.6% (36,000 มิลลิกรัม/ลิตร) และซูโครส 0.015% (150 มิลลิกรัม/ลิตร) และ ribose 0.013% (125 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ผลการทดลองไม่ดีขึ้นอย่างที่คาดไว้ ในการทดลองต่อมาจึงเปลี่ยนสูตรอาหารมาใช้สูตรของ Schenk & Hildebrant (1972) ซึ่งใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไปและใช้ได้ผลดีในการเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างสูตร B_5 และ SH คือ สูตร SH ลด $CaCl_2.2H_2O$ ลงประมาณ 1/4 และใช้ $NH_4.H_2PO_4$ แทน $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaH_2PO_4.7H_2O$ และสารควบคุมการเจริญใช้ 2,4-D, pCPA และ kinetin ขณะเดียวกันก็เพิ่มสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสลงในสูตร SH เพื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ โดยใช้ mannitol และ ribose เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส พบว่าโปรโตพลาสต์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ Kao และคณะ (1973) พบว่าเมื่อปริมาณ $CaCl_2$ ในอาหารสูงทำให้การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของ Vicia hajastana และ Bromus inermis ดีขึ้น และ Jia และคณะ พบว่าความเข้มข้นของ $CaCl_2$ 850.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะในการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ของ Pisum sativum (อ้างถึงใน กิตติ โพธิปัทมะ,2528) แต่ Bush และคณะ (1986) รายงานว่า $CaCl_2$ ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ Hordeum vulgare

ถ้าไม่ใช้ร่วมกับกรดจิบเบอเรลลิค ในสูตร SH-1 และ SH-2 เพิ่ม $CaCl_2$ เป็น 800 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ทำให้อาหารตกตะกอน เพราะปริมาณ Ca สูงทำปฏิกริยากับ PO_4 ซึ่งมีปริมาณสูงเช่นกัน ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็น $Ca_3(PO_4)_2$ สูตร SH-3 จึงลด $NH_4.H_2PO_4$ ลง 1/4 เพื่อไม่ให้อาหารตกตะกอนและลดความเป็นพิษของแอมโมเนียมด้วย ซึ่ง Kao และคณะ (1973) รายงานว่า NH_4NO_3 มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Vicia hajastana และ Bromus inermis และ Okamura และคณะ (1984) พบว่าในสูตรอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Artemisia vulgaris ที่ไม่มีแอมโมเนียม โปรโตพลาสต์แบ่งตัวได้ดีที่สุด ในสูตร SH-3 ยังพบการแบ่งเฉพาะไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ Acriopsis indica และการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ Spathoglotis hybrid สันนิษฐานว่าการเจริญและแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อาจดีขึ้น หากลดความเข้มข้นของธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากลงครึ่งหนึ่ง และใช้สารควบคุมการเจริญเป็น NAA และน้ำมะพร้าว ตามสูตรเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ซึ่งดัดแปลงจากสูตร Schenk & Hildebrandt (1972) ตามวิธีการของถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ซึ่งใช้เลี้ยงแคลลัสกล้วยไม้ได้ผลดี ในสูตร SH-4 ถึง SH-12 จึงลดความเข้มข้นของธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากลงครึ่งหนึ่ง ยกเว้นการใช้ $CaCl_2.2H_2O$ และ $NH_4.H_2PO_4$ ยังใช้ปริมาณเท่าเดิม แต่การลด $NH_4.H_2PO_4$ ในสูตร SH-3 ถึง SH-12 นี้อาจเป็นผลเสีย โดย Resnick,1970 (อ้างถึงใน Kao และคณะ,1973) คาดว่าการใช้ mannitol ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการดูดซึมฟอสเฟตได้ ในสูตร SH-4 ยังคงพบการแบ่งไซโตพลาสซึม และอัตราการอยู่รอดของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ยังน้อยประมาณ 5% ในสูตร SH-5 จึงเปลี่ยนความเข้มข้นของ mannitol เป็น 8% (80,000 มิลลิกรัม/ลิตร) ribose 0.013% (125 มิลลิกรัม/ลิตร) และน้ำมะพร้าวขึ้นเป็น 10% ซึ่ง Maeda และคณะ (1983) รายงานว่าการเกิดกลุ่มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Lithospermum erythrorhizon เพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารเลี้ยง 20% จากสูตร SH-5 นี้ พบว่าอัตราการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มขึ้นประมาณ 10% แต่ยังคงพบการแบ่งไซโตพลาสซึมและแตกหน่อ เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ mannitol เป็น 8.1% (81,000 มิลลิกรัม/ลิตร) พบว่าอัตราการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เพิ่มขึ้นเป็น 15% แต่ยังแบ่งไซโตพลาสซึม ในสูตร SH-7 ทดลองเปลี่ยนสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสมาใช้กลูโคสและซูโครส และลดความเข้มข้นของ mannitol ลง เพื่อให้โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ได้รับกลูโคสและซูโครสเข้าไปในขบวนการเมตาโบลิซึม นอกจากนี้ยังเพิ่ม 2,4-D

ลงไป 0.1% เพื่อให้มีการแบ่งเซลล์อย่างสมบูรณ์กลับพบว่าโปรโตพลาสต์แตกทั้งหมด คาดว่าความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสยังไม่เหมาะสม ในสูตร SH-8 เปลี่ยนกลับมาใช้ mannitol เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสตามเดิมแต่เพิ่มความเข้มข้นของ mannitol เป็น 8.2% (82,000 มิลลิกรัม/ลิตร) ก็พบว่าอัตราการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ยังคงประมาณ 15% ในสูตร SH-9 จึงเพิ่มความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสเป็น 8.3% (83,000 มิลลิกรัม/ลิตร) พบว่าอัตราการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มเป็น 20-30% และโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica เริ่มมีการแบ่งเซลล์ ส่วนโปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid แตกหน่อ ในสูตร SH-10, SH-11 และ SH-12 จึงใช้ความเข้มข้นของ mannitol เป็น 8.3% (83,000 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ในสูตร SH-10 ใช้สารควบคุมการเจริญเพียงอย่างเดียวคือ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร โปรโตพลาสต์บางส่วนเริ่มแบ่งเซลล์ อัตราการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์เป็น 20% ในสูตร SH-11 ให้สารอินทรีย์และวิตามินตาม B_5 (1985) ซึ่งไม่ใส่น้ำมะพร้าว และใช้สารควบคุมการเจริญเป็น NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร, 2,4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และเพิ่มกลูโคส 0.015 มิลลิกรัม/ลิตร พบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Acriopsis indica แต่การแบ่งเซลล์พบน้อยมากประมาณ 1% อัตราการอยู่รอด 30% สูตร SH-12 จึงเปลี่ยนสารอินทรีย์และวิตามินมาใช้น้ำมะพร้าว 10% องค์ประกอบอื่นเหมือน SH-11 พบว่าโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid แบ่งเซลล์อย่างสมบูรณ์แต่ยังคงพบการแบ่งเซลล์เพียงประมาณ 1% เท่านั้น อัตราการอยู่รอด 30%

ในการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ 2 พันธุ์โดยใช้สูตรอาหาร 17 สูตร (ตกตะกอน 2 สูตร) มีการเจริญของโปรโตพลาสต์โดยสรุป คือ

1. การสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแต่การสร้างผนังเซลล์ใหม่นี้ไม่ทราบว่าเป็นผนังเซลล์ที่สมบูรณ์หรือไม่ จากการย้อมสี Calcofluor White ก็ไม่สามารถบ่งชี้ได้ชัดเจนว่า การมี cellulose จะเป็นผนังเซลล์ที่สมบูรณ์

2. โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตได้ถึง 3-4 วัน มีการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างในลักษณะของการแตกหน่อและแบ่งไซโตพลาสซึม โดยไม่มีการแบ่งนิวเคลียส การเจริญในข้อ 1 และ ข้อ 2 น่าจะมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด นั่นคือการแตกหน่อออกไป น่าจะเกิดขึ้นกับผนังเซลล์ใหม่บริเวณที่ไม่แข็งแรงพอที่จะรับแรงดันจากสารละลายภายในโปรโตพลาสต์ได้ Hanke และ Northcote (1974) (อ้าง

ถึงใน Fowke and Gamborg, 1980) กล่าวว่าการแตกหน่อมักเกิดขึ้นในบริเวณของผนังเซลล์ที่มี microfibril อยู่น้อย ทำให้การสะสมของสารพวก polysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์น้อยลงไปด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ และ โครงสร้างของ microfibril ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ก็ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ เช่น TEM หรือ SEM ที่อาจทำให้การตีความหมายของผลการทดลองเบี่ยงเบนไปได้ (Fowke และ Gamborg,1980)

3. โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตได้ถึง 5-28 วัน มีการเจริญใน 2 ลักษณะ คือ ส่วนน้อยของโปรโตพลาสต์ประมาณ 1% มีการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 เซลล์ แล้วไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้อีกต่อไป โปรโตพลาสต์อีกส่วนหนึ่งมีการเจริญโดยการแบ่งของไซโตพลาสซึมอย่างต่อเนื่อง ได้เป็นกลุ่มของเซลล์ที่ส่วนใหญ่ไม่มีนิวเคลียส 7-8 เซลล์แล้วก็หยุดการเจริญ ลักษณะการเจริญเช่นนี้คล้ายคลึงกับที่เกิดขึ้นในยาสูบ (Nagata และ Takebe,1970), ถั่ว (Bogers,1973) และแครอท (Reinert และ Hellmann,1973) ถ้าหากสมมุติฐานตามข้อ 2 เป็นจริง การที่โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ ที่แข็งแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ การสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการเจริญจึงไม่เพียงพอไปด้วย ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ต่ำ

ลักษณะการเจริญของโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ที่เกิดขึ้นทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพของการแบ่งเซลล์นี้ กล่าวได้ว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหารทั้ง 15 สูตรนี้ไม่สามารถชี้ชัดเจนว่าปัจจัยใดเป็นสาเหตุที่ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ต่ำมาก แต่การใช้สูตรดัดแปลงตาม SH-11 และ SH-12 น่าจะมีแนวโน้มทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ เมื่อกลับไปพิจารณาถึงขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการแยกแล้วเห็นว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้มีมาก ลักษณะของโปรโตพลาสต์เป็นรูปทรงกลม ความเข้มข้นของไซโตพลาสซึมมีมาก แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะแบ่งเซลล์ได้ต่อไป ดังนั้นสาเหตุที่ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ต่ำมากต้องเกิดขึ้นในช่วงการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ตลอดจนปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความอยู่รอด ซึ่งก็จำเป็นต้องมีการศึกษาทดลองในรายละเอียดต่อไป

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. การใช้ mannitol ในการแยกโปรโตพลาสต์ แม้จะใช้ได้ผลดีในการควบคุมความสมดุลย์ของออสโมซิส แต่ mannitol เป็นน้ำตาลที่โปรโตพลาสต์

ไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึมได้ และอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อการปรับกิจกรรมการใช้พลังงานในขั้นตอนการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งตัวได้น้อย ดังนั้นทั้งขั้นตอนการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ควรใช้สารรักษาความสมดุลย์ที่โปรโตพลาสต์ไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม เช่น mannitol ร่วมกับสารที่โปรโตพลาสต์สามารถนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม เช่น กลูโคส ซูโครส

2. ในการทดลองนี้ การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใช้เวลาประมาณ 15 ชั่วโมง โดยในสารละลายเอนไซม์และสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ไม่มีอาหารผสมอยู่ อาจทำให้โปรโตพลาสต์ได้รับอาหารไม่เพียงพอ เป็นผลทำให้การแบ่งเซลล์ผิดปกติ จึงควรผสมอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในขั้นตอนการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วย

3. เปลี่ยนไปใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบอื่น เช่น

3.1 การเลี้ยงในอาหารที่มีเซลล์พี่เลี้ยงช่วย (nurse cell or feeder layer technique) โดยเลี้ยงเซลล์ที่เจริญดี เช่น ยาสูบ มะเขือเทศ ใน suspension culture เพื่อใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยง วางกระดาษกรองบนเซลล์พี่เลี้ยงจากนั้นหยดโปรโตพลาสต์ลงไปบนกระดาษกรอง คาดว่าเซลล์พี่เลี้ยงอาจปล่อยสารบางอย่างออกมาที่มีผลต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ (มนทกานติ วัชราภัย, 2530)

3.2 การเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งโดยใช้ agarose เป็นสารทำให้อาหารแข็งตัว ซึ่งพบว่าเป็นวิธีการเลี้ยงที่ช่วยให้โปรโตพลาสต์ของพืชหลายชนิดแบ่งตัวได้ดี เช่น เมื่อใช้ agarose ทำให้โปรโตพลาสต์ของ Medicago sativa มีการแบ่งเซลล์เพิ่มมากกว่าเลี้ยงในอาหารเหลว (Holbrook et al., 1985) และทำให้โปรโตพลาสต์ของ Daucus carota, Nicotina tabacum, N. plumbaginifolia แบ่งเซลล์เพิ่มมากกว่าการเลี้ยงในสารที่ทำให้อาหารแข็งตัวแบบอื่น (Lorz และคณะ, 1983)