

การเกิดต้นจากแคลลัสและเซลล์ไฝผนังของฝ้าย (Gossypium spp.)



นางสาว สมพร ประเสริฐสงสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-629-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019159
117158656

PLANT REGENERATION FROM CALLUS AND PROTOPLAST OF COTTON
(Gossypium spp.)



Miss Somporn Prasertsongskun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University

1992

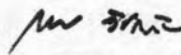
ISBN 974-581-629-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเกิดต้นจากแคลลัสและเซลล์ไร้ผนังของฝ้าย
(Gossypium spp.)


โดย นางสาว สมพร ประเสริฐสูงสกุล
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สันต์ พณิชยกุล

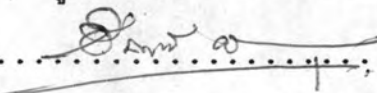


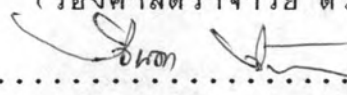
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

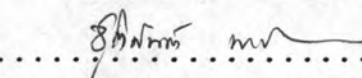

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชรากิจ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันต์ พณิชยกุล)


..... กรรมการ
(ดร. จินดา จันทรอ่อน)


..... กรรมการ
(คุณ ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา)

สมพร ประเสริฐส่งสกุล : การเกิดต้นจากแคลลัสและเซลล์ไร้ผนังของฝ้าย (Gossypium spp.) (PLANT REGENERATION FROM CALLUS AND PROTOPLAST OF COTTON (Gossypium spp.) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร.สัมพันธ์ พณิชยกุล. 166 หน้า.

ISBN 974-581-629-9

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงและส่วนไฮโปคอติลของฝ้าย 2 สปีชีส์ คือ Gossypium hirsutum พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย (G. arboreum) บนอาหารสูตร MS ผสมวิตามินสูตร B5 ซึ่งเสริม NAA และ 2,4-D, kinetin และ zeatin พบว่า สัตว์ส่วนของสารควบคุมการเจริญที่ เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุดและลักษณะของเซลล์แคลลัสที่มีการเกาะแน่น มีสีเขียว ในฝ้ายทั้ง 2 สปีชีส์ที่ใช้ศึกษา เมื่อใช้ NAA 2 มก./ล., kinetin 1 มก./ล. และ NAA 4 มก./ล., kinetin 1 มก./ล. เป็นสัดส่วน ที่เหมาะต่อการเกิดแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอติล ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง สูตรดัดแปลง MS ที่ไม่มี NH_4NO_3 แต่เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่า เสริมด้วย kinetin 0.5 มก./ล. และ กลูตามีน 15 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้

ในการแยกเซลล์ไร้ผนัง พบว่า สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง, แคลลัสและเซลล์- แขนงลอย ซึ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ไร้ผนังจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง คือ ใช้ cellulase R10 0.5% และ macerozyme R10 0.5% สำหรับเนื้อเยื่อแคลลัสและเซลล์แขนงลอยจำเป็นต้องใช้ cellulase R10 2% และ macerozyme R10 0.6%

หลังจากการแยกและทำให้เซลล์ไร้ผนังบริสุทธิ์ โดยการกรองและปั่นแยกนำเซลล์ไร้ผนังที่ เตรียมได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS 1/2 สูตร ซึ่งประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญ NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล., kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ล. ซึ่งเติมน้ำ- มะพร้าว 10% ปรากฏว่า เซลล์ไร้ผนังจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วน สามารถสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นได้ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เฉพาะเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากเนื้อเยื่อแคลลัสเท่านั้น ที่มีการ แบ่งเซลล์หลังจากการเลี้ยงในอาหาร 2 วัน โดยที่ฝ้าย G. arboreum มีอัตราการแบ่งเซลล์ (12.6%) สูงกว่าฝ้าย G. hirsutum (3.0%).



ภาควิชา.....
สาขาวิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา..... 2534.....

ลายมือชื่อนิติ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C226120 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : REGENERATION/PROTOPLAST/COTTON

SOMPORN PRASERTSONGSKUN : PLANT REGENERATION FROM CALLUS AND PROTO-
PLAST OF COTTON (Gossypium spp.) THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA
PANICHAJAKUL, Ph.D. 166 pp. ISBN 974-581-629-9

Procedures for product somatic embryos in cell cultures were described for two species of cotton (Gossypium spp.). The suitable conditions for callus induction and initiation of cell suspension cultures from cotyledon and hypocotyl were defined on MS medium contained B5 vitamins supplemented with NAA and 2,4-D, kinetin and zeatin. The highest percent callusing and green compact cell mass callus were obtained, when these tissues (G. hirsutum cv. Si Samrong 2 and G. arboreum cv. Noi) were grown on the different combinations of NAA and kinetin (2 mg/l NAA, 1 mg/l kinetin and 4 mg/l NAA, 1 mg/l kinetin for cotyledon and hypocotyl, respectively). Replacing of NH_4NO_3 by 2 folds of KNO_3 with 0.5 mg/l kinetin and 15 mM glutamine caused root formation from calli.

Protoplasts were isolated from cotyledon, callus and cell suspension cultures of these two species of cotton. The enzyme solution for protoplasts production from cotyledon contained 0.5% cellulase R10, 0.5% macerozyme R10. Slight difference in enzyme concentration (2% cellulase R10, 0.6% macerozyme R10) were indicated for optimum production of protoplasts from callus and cell suspension cultures of these cotton species.

The purified protoplasts (floating three times on 21% sucrose) were cultured in the 1/2 MS liquid medium supplemented with 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.2 mg/l kinetin and 0.2 mg/l zeatin. Addition of coconut water 10% was found essential for cell wall regeneration in 24 hours. Protoplasts isolated from callus began cell division after 2 days in culture medium. Division efficiency for G. arboreum was higher (12.6%) in comparison to G. hirsutum (3.0%).



ภาควิชา.....
สาขาวิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา..... 2534.....

ลายมือชื่อนิติ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาพร้อม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลือเป็น
อย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สัมภ์ พณิชยกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้
ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการวิจัย ผู้เขียนขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส
ดร.จินดา จันทรอ่อน และคุณชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการ
สอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ดร. สมาน แก้วบุญเรือง และสมาชิกในหน่วยงาน
ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่พร้อมทั้งให้คำแนะนำ
เทคนิคต่างๆ ในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัญยารัตน์ ไชยสุด ที่ให้
คำปรึกษาในเรื่องของการย้อมโครโมโซม

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีวเคมี และอาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ได้ให้ความกรุณาและ
คำชี้แนะต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการศึกษา

ขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือวิเคราะห์ตัวอย่าง เจ้าหน้าที่ภาควิชา
ชีวเคมี นิธิตปริญญาทเทคโนโลยีชีวภาพและชีวเคมี สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ

ท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบคุณโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ที่ให้ทุนอุดหนุน
การศึกษาตลอดจนทุนของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติอุดหนุนการวิจัย
และทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์



	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ผ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ฅ
คำย่อ	ณ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 วิธีการทดลอง	20
2.1 วัสดุอุปกรณ์ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	20
2.1.1 ครุภัณฑ์	20
2.1.2 ตัวอย่างเมล็ดพืชที่ใช้ในการทดลอง.....	21
2.1.3 สารเคมี	21
2.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	23
2.3 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	24
2.4 การเพาะปลูกต้นฝ้าย	24
2.4.1 การเพาะเลี้ยงต้นฝ้ายเพื่อการขยายพันธุ์	24
2.4.2 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฝ้ายปลอดเชื้อ	24
2.5 อาหารแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัส	25
2.6 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7	การเตรียมสารละลายเอนไซม์สำหรับแยกเซลล์ไฝผนัง	25
2.8	การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไฝผนัง	26
2.9	การเตรียมเนื้อเยื่อพีชสำหรับเพาะเลี้ยง	26
2.10	วิธีการชักนำให้เกิดแคลลัส	26
2.11	วิธีการจำแนกชนิดของแคลลัส	27
2.12	การเพาะเลี้ยงเซลล์ฝ้ายในอาหารเหลว	27
2.13	การติดตามการเจริญของแคลลัส	28
2.13.1	การติดตามการเจริญของแคลลัสในอาหารแข็ง	28
2.13.2	การติดตามการเจริญของเซลล์แขวนลอย ในอาหารเหลว	28
2.14	การชักนำให้เกิดต้น	29
2.14.1	การชักนำให้เกิดต้นผ่านทางออร์แกโนเจเนซิส	29
2.14.2	การชักนำให้เกิดต้นผ่านทางเอมบริโอเจเนซิส	29
2.15	ระยะการแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซม ในเซลล์รากฝ้าย .	30
2.16	การเตรียมเนื้อเยื่อฝ้ายที่จะนำมาใช้ในการแยกเซลล์ไฝผนัง .	31
2.17	การแยกเซลล์ไฝผนัง	31
2.17.1	การแยกเซลล์ไฝผนังจากส่วนใบเลี้ยงของต้นฝ้าย .	31
2.17.2	การทำให้เซลล์ไฝผนังบริสุทธิ์	32
2.17.3	การแยกเซลล์ไฝผนังจากส่วนแคลลัสและเซลล์ แขวนลอย	32
2.18	การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฝผนัง	33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.19	การตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังและการย้อมเซลล์เพื่อศึกษา ความมีชีวิต	34
2.19.1	การนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ .	34
2.19.2	การย้อมเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิต	34
2.19.3	การตรวจนับเซลล์ไร้ผนังที่สามารถสังเคราะห์แสง.	35
2.20	การวัดขนาดเซลล์ไร้ผนัง	35
2.21	การย้อมเซลล์ไร้ผนังเพื่อศึกษาการสร้างผนังเซลล์	35
2.22	ลักษณะทางอิเล็กทรอนิกส์โคปีของฝ้ายไร้ผนัง	36
3	ผลการทดลอง	38
3.1	การปลูกฝ้ายเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์	38
3.1.1	การปลูกฝ้ายเพื่อขยายพันธุ์	38
3.1.2	การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฝ้ายปลอดเชื้อ	41
3.2	สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส	41
3.2.1	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุม การเจริญเติบโต	41
3.2.1.1	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการ ชักนำให้เกิดแคลลัส	43
3.2.1.2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อ ลักษณะภายนอกของแคลลัส	48
3.2.2	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ..	54
3.3	ผลการจำแนกชนิดแคลลัส	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 รูปแบบและลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส	63
3.4.1 การเจริญในอาหารแข็ง	63
3.4.2 การเจริญในอาหารเหลว	63
3.5 การชักนำให้เกิดต้น	67
3.6 การแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซมภายในเซลล์รากฝ้าย ..	74
3.7 การแยกเซลล์ไร้ผนัง	74
3.7.1 สภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์ไร้ผนังจากใบเลี้ยง	74
3.7.1.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อย	
ผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง :...	74
3.7.1.2 ผลของความเป็นกรด - ด่าง (pH) ต่อ	
การเกิดเซลล์ไร้ผนัง	78
3.7.1.3 ผลของช่วงเวลาในการเกิดปฏิกริยาของ	
เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์	78
3.7.1.4 ผลของความเข้มข้นของสารปรับแรงดัน	
ออสโมซิสต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง	82
3.7.1.5 ผลกระทบของอุณหภูมิและแสงต่อ	
การเกิดเซลล์ไร้ผนัง	82
3.7.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและลักษณะบางประการของ	
เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยงของฝ้าย	
พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	82
3.7.3 การศึกษาลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนของ	
ใบเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์	85

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7.3.1	จากไตกล้างจุลทรรศน์สามัญ	85
3.7.3.2	จากไตกล้างจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ . . .	85
3.7.3.3	จากไตกล้างจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด	89
3.7.4	สภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์ไร้ผนังจากแคลลัส.	89
3.7.4.1	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อย ผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง	89
3.7.4.2	ผลของช่วงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของ เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์	91
3.7.4.3	ผลของชนิดแคลลัสที่ชั่งนำมาจากส่วนของพืช ต่างกันต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง	91
3.7.4.4	ผลของอายุแคลลัสต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง.	94
3.7.5	การเปรียบเทียบคุณสมบัติและลักษณะบางประการของ เซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากแคลลัสในพันธุ์ฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	94
3.7.6	การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้ จากส่วนของแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์	98
3.7.7	สภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์ไร้ผนังจาก เซลล์แขวนลอย	98
3.7.7.1	ผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนัง	98

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7.7.2	ผลของสารอินทรีย์บางชนิดต่อการเกิดเซลล์ ไฝผนังของเซลล์แขวนลอยฝ้าย	102
3.7.7.3	ผลของอายุของเซลล์แขวนลอยต่อประสิทธิภาพ การเกิดเซลล์ไฝผนัง	102
3.7.8	การเปรียบเทียบคุณสมบัติและลักษณะบางประการของเซลล์ ไฝผนังที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยในพันธุ์ฝ้าย ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	105
3.7.9	การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ไฝผนังที่แยกจาก เซลล์แขวนลอยด้วยกล้องจุลทรรศน์	105
3.8	การวัดขนาดของเซลล์ไฝผนัง	109
3.9	การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฝผนัง	109
3.9.1	ผลของสารอาหารต่อการเจริญของเซลล์ไฝผนัง	109
3.9.2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าว ต่อการเจริญของเซลล์ไฝผนัง	113
3.9.3	ผลของความหนาแน่นของเซลล์ไฝผนังต่อการเจริญของ เซลล์ไฝผนัง	117
4	วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	121
	สรุปผลการวิจัย	141
	เอกสารอ้างอิง	145
ภาคผนวกที่		
1	รูปแสดงลักษณะการเกิดกิ่งของฝ้าย (<i>Gossypium</i> spp.)	158
2	รูปแสดงลักษณะเมล็ดพันธุ์ฝ้ายที่ใช้ในการทดลอง	159

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 องค์ประกอบของธาตุอาหารในสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.	160
4 องค์ประกอบของสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง	161
5 การเตรียมสีย้อมโครโมโซม	162
6 การตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์	164
7 การเตรียมน้ำยาสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ..	165
ประวัติผู้เขียน	166

สารบัญตาราง



ตารางที่

หน้า

1	แสดงรายชื่อผ้ายชนิดต่างๆ ตลอดจนจำนวนโครโมโซม แห่งกำเนิดและการใช้ประโยชน์	5
2	พืชสำคัญทางเศรษฐกิจที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	10
3	ลักษณะของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	39
4	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในระดับต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2	44
5	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในระดับต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอติลของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2	46
6	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในระดับต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงของพันธุ์ฝ้ายน้อย..	49
7	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในระดับต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอติลของพันธุ์ฝ้ายน้อย.	51
8	ผลการเกิดรากจากแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยที่ชักนำมาจากส่วนใบเลี้ยง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่สภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง อายุ 3 สัปดาห์	68
9	ผลการเกิดรากจากแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยที่ชักนำมาจากส่วนไฮโปคอติล เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่สภาวะมาตรฐานของการเลี้ยง อายุ 3 สัปดาห์	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
10 ผลของอุณหภูมิและแสงต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังส่วนใบเลี้ยงของฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	84
11 ความหนาแน่น เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และความสามารถในการ สังเคราะห์แสงของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	86
12 ความหนาแน่น เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และความสามารถในการ สังเคราะห์แสงของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนแคลลัสในฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	97
13 ความหนาแน่น เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และความสามารถในการ สังเคราะห์แสงของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยใน ฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	106
14 ผลของการเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยวิตามิน ตามสูตรของ UM ที่มี NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล., kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ล. ต่อการสร้างผนังเซลล์ และการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนังในฝ้าย ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	114
15 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโต ของเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายในอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. ในที่มืด นาน 2 วัน	115
16 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนแคลลัสต่อความ มีชีวิตและการแบ่งเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังสูตรมาตรฐาน ของการทดลอง	118

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	40
2	42
3	45
4	47
5	50
6	52
7	55

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
8	
ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอติลในฝ้าย	
พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม	
สูตร B5 ที่มี NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. ที่สภาวะ	
มาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์ 55	
9	
ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย	
พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม	
สูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล. และ kinetin 0.1 มก./ล.	
ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์ 56	
10	
ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอติลในฝ้าย	
พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม	
สูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล. และ kinetin 0.1 มก./ล.	
ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์ 56	
11	
ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย	
พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม	
สูตร B5 ที่มี NAA 2 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล.	
ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์ 57	
12	
ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอติลในฝ้าย	
พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม	
สูตร B5 ที่มี NAA 4 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล.	
ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์ 57	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
13 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงในฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม สูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์	58
14 ลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอติลในฝ้าย พันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตาม สูตร B5 ที่มี 2,4-D 0.1 มก./ล. และ zeatin 0.5 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์	58
15 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้าย เพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครส 3% เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน อายุ 4 สัปดาห์	59
16 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอติลของฝ้าย เพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี NAA 4 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครส 3% เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน อายุ 4 สัปดาห์ ...	60
17 ชนิดของแคลลัสและลักษณะเซลล์ที่ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามัญ	62
18 ลักษณะการเจริญของแคลลัสในพันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2	64
19 ลักษณะการเจริญของแคลลัสในฝ้ายน้อย	65
20 ลักษณะการเจริญของเซลล์แขวนลอยในพันธุ์ฝ้ายศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย.	66

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
21 ลักษณะการเกิดรากของแคลลัสในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี kinetin 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน อายุ 3 สัปดาห์	70
22 ลักษณะการเกิดรากของแคลลัสในฝ้ายน้อย เพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ที่มี kinetin 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน อายุ 3 สัปดาห์	71
23 ลักษณะการเกิดรากของฝ้ายจากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอติลถ่ายจาก กลองสเตอริโอ	72
24 แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์รากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2	75
25 แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์รากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ของฝ้ายน้อย	76
26 แสดงจำนวนโครโมโซมของเซลล์รากฝ้ายที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง แคลลัสในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	77
27 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยง ของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	79
28 ผลของความเป็นกรด-ต่าง (pH) ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วน ใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	80
29 ผลของช่วงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ต่อการเกิดเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	81

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
30 ผลของความเข้มข้นของสารปรับแรงดันออสโมซิส ต่อการเกิด เซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย...	83
31 รูปร่างลักษณะและความสามารถในการสังเคราะห์แสงของเซลล์ ไร้ผนังที่แยกจากส่วนใบเลี้ยง	87
32 รูปร่างลักษณะและความมีชีวิตของเซลล์ไร้ผนังที่แยกจากส่วนใบเลี้ยง...	88
33 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง ลักษณะรูปทรงและพื้นผิวของเซลล์	90
34 ผลของเอนไซม์ cellulase ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากส่วน แคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	92
35 ผลของเอนไซม์ macerozyme ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังจากส่วน แคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	92
36 ผลของช่วงระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังของแคลลัสของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย.	93
37 เปรียบเทียบผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมได้จากแคลลัสของฝ้ายที่ชักนำ มาจากส่วนใบเลี้ยง และไฮโปคอติลในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย.	95
38 ผลของอายุแคลลัสฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย ต่อผลผลิตของ เซลล์ไร้ผนัง	96
39 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสในพันธุ์ศรีสำโรง 2	99
40 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสในพันธุ์ฝ้ายน้อย	100
41 ผลของช่วงเวลาของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการ เกิดเซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย.	101

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
42 ผลของสารอินทรีย์ที่เติมลงไปในการละลายเอนไซม์ต่อผลผลิตของ เซลล์ไร้ผนังจากเซลล์แขวนลอยของฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย.	103
43 ผลของอายุเซลล์แขวนลอยต่อผลผลิตของเซลล์ไร้ผนังของฝ้ายพันธุ์ ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย	104
44 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนัง จากส่วนเซลล์แขวนลอยในฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2.	107
45 ลักษณะของเซลล์ไร้ผนัง จากส่วนเซลล์แขวนลอยในฝ้ายน้อย	108
46 ขนาดของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้จากส่วนใบเลี้ยง แคลลัส และ เซลล์แขวนลอยจากการวัดขนาดด้วยไมโครมิเตอร์	110
47 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังในอาหารเหลว 1/2 MS เสริมด้วยวิตามิน ตามสูตรของ UM ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ในที่มืด	111
48 ลักษณะการเหี่ยวและแตกของเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสของฝ้าย ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ UM ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ในที่มืด	112
49 ลักษณะการเรืองแสงของเซลล์ไร้ผนังเมื่อมีการสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้น โดยย้อมด้วยคอลโคฟลูออไรท์ และการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไร้ผนัง เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2 MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร UM ที่มี NAA 1 มก./ล., 2,4-D 0.5 มก./ล., kinetin และ zeatin อย่างละ 0.2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการเพาะเลี้ยง อายุ 2 วัน	116
50 ลักษณะการเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ เทียบกับเซลล์ไร้ผนังในอาหารแข็งสูตร มาตรฐานของการทดลอง	120

คำย่อ

มก./ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร
ซล.	=	เซนติเมตร
มม. ³	=	ตารางมิลลิเมตร
°ซ.	=	องศาเซลเซียส
MS	=	Murashige and Skoog
B5	=	Gamborg
UM	=	Uchimiya and Murashige
NAA	=	1-naphthalene acetic acid
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
IAA	=	indole acetic acid
IBA	=	indole butyric acid
MCPA	=	2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid