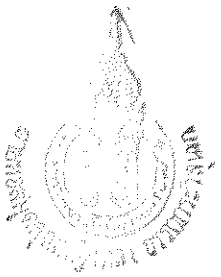
การชักนำแคลลัส การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบพืชในสกุล *Garcinia* บางชนิด

Callus Induction, Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts of Some Species in *Garcinia*



ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

Laddawan Moosikapala

วิทยานิพนธ์นี้ QK725 ล63 2544 ฉ.2
Bib Key 212908
20 ส.ค. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การชักนำแคลลัส การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบพืชในสกุล *Garcinia* บางชนิด
ผู้เขียน	นางสาวลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

สำเนาถูกต้อง บัณฑิตวิทยาลัย มอ.
วันที่ 29 ส.ค. 2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การชักนำแคลลัส การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบพืชในสกุล *Garcinia* บางชนิด
ผู้เขียน	นางสาวลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

เพาะเลี้ยงใบอ่อนนอกหลอดทดลองของ มังคุด มะพูด มะดัน และชะมวง และอับละอองเกสรมะดันบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) หรือ WPM (woody plant medium) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ในที่มีแสงหรือที่มืด เป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ เพื่อชักนำ friable callus พบว่าใบอ่อนมะพูดสร้างแคลลัสได้สูงสุด 20 % ในที่มีแสง บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 1.0 มก./ล. และ BA (benzlyadenine) เข้มข้น 0.5 มก./ล. แคลลัสเกิดบริเวณเส้นกลางใบและบริเวณรอยตัดบางส่วน ส่วนมะดันสร้างแคลลัสได้สูงสุด 28.57 % ในอาหารสูตร WPM เติม TU (thiourea) เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. แคลลัสเกิดตรงปลายรอยตัดบริเวณเส้นกลางใบด้านโคน (proximal) ในขณะที่อับละอองเกสรให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 20 % ในที่มืด บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 หรือ 3 มก./ล. ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. เกิดบริเวณรอยตัดที่ฐานของอับละอองเกสร สำหรับใบอ่อนชะมวงสร้างแคลลัสได้สูงสุด 100 % ในที่มืดบนอาหารสูตร MS เติม NAA (1-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. บริเวณรอบรอยตัดและแคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ ในกรณีมังคุดนั้นพบว่า 2,4-D เข้มข้น 1.0 มก./ล. ให้น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุด 420 มิลลิกรัม ขนาดเพิ่มขึ้นสูงสุด 6.7 มม^2 และอัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 68.06 % เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัส (สูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ TDZ (thidiazuron) เข้มข้น 0.5 มก./ล.) เพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ให้แคลลัสที่มีลักษณะเป็นโนดูลสูงสุด 22.22 % และจำนวนโนดูลเฉลี่ย 1.42 ต่อแคลลัส และอาหารสูตรดังกล่าวให้อัตราการเพิ่มปริมาณ 12 เท่า ในขณะที่อาหารสูตรเดิมให้อัตราการเพิ่มปริมาณ 5 เท่า

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขก พะวา และมังคุดอายุต่าง ๆ ด้วยสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็วรอบ 40-50 รอบต่อนาทีในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปรับความหนาแน่นและเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า 12 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลวใบส้มแขกที่อินคิวเบทด้วยสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 % และ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.25x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.19 % ส่วนใบพะวาอายุ 8 สัปดาห์ และใบมังคุดอายุ 12 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.1x10^6$ และ $2.7 x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 84.71 และ 68.12 % ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 % ร่วมกับ marcerozyme R-10 เข้มข้น 1 % และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 มก./ล. ใบมังคุดที่เก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาแยกให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงถึง $1x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.35 % โปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกอายุ 4 สัปดาห์ ที่ฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 % dicamba เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ BA เข้มข้น 1 มก./ล. ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรส่งเสริมการสร้างโคโลนีขนาดเล็กได้หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ การฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์พะวาในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 % 2, 4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 5.56 % ส่วนโปรโตพลาสต์มังคุดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบการแบ่งเซลล์ 3.41 % การเติมสารแอนติออกซิแด้นในรูป PVP หรือผงถ่าน ในอาหารเหลวที่เติมโปรโตพลาสต์หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่าน เข้มข้น 0.1 % หลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์มีพัฒนาการดีที่สุด (พบเซลล์เริ่มคอด) อย่างไรก็ตามยังไม่พบการแบ่งเซลล์ ส่วนการเติม PVP ในอาหารเหลวโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตกและไม่พบการแบ่งเซลล์

Thesis Title	Callus Induction, Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts of Some Species in *Garcinia*
Author	Miss. Laddawan Moosikapala
Major Program	Plant Science
Academic Year	2001

Abstract

For induction of friable callus, young leaves from *ex vitro* of mangosteen, maphut, madun and chamuang and anther of madun were cultured on basal MS (Murashige and Skoog) or WPM (woody plant medium) supplemented with various kinds and concentrations of plant growth regulators. The cultures were kept in the dark for 4-8 weeks. The results revealed that young leaves of maphut provided callus formation at 20 % in MS with 1 mg/l 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) and 0.5 mg/l BA (benzlyadenine) under light condition. The callus arose from cut surface and along midrib. In the case of madun leaves, WPM contained 0.5 mg/l TU (thiourea) and 1 mg/l 2,4-D provided percentage of callus formation at 28.57 %. The callus came out from cut surface at midrib whereas anthers provided the best result in callus induction percentage at 20 % in the dark on MS with 1 or 3 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA. The origin of callus was from the basal part of anther. For chamuang leaves, MS containing 0.1 mg/l NAA (1-naphthaleneacetic acid) and 0.5 mg/l BA in the dark provided the greatest percentage of callus formation at 100 %. The callus arose from wounds at cut surface and the callus could be proliferated. In the case of mangosteen, MS medium contained 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA gave the highest increase in fresh weight of callus (420 mg.), size (6.7 mm^2) and average proliferation rate of callus (68.06 %). When the callus was subcultured onto meristematic nodular callus induction medium (MS plus 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ (thidiazuron)) and maintained in the light for 8 weeks the highest percentage of nodular callus at 22.22 % and the number of nodule at 1.42 per callus

were obtained. In this medium average proliferation rate of callus was 12 folds, whereas only 5 folds was obtained in 2,4-D and BA containing medium.

Isolation of protoplasts at different ages of vitro-grown leaves of somkhag, phawa and mangosteen was carried out using various kinds and concentrations of enzymes. A leaf-enzyme mixture was incubated in a solution of enzymes on a gyratory shaker at 40-50 rpm under darkness for 12 hours. Protoplast densities were adjusted and cultured in MS medium supplemented with different kinds and concentrations of growth regulators. The results showed that 12 weeks after culture, somkhag leaves incubated in 2 % cellulase Onozuka R-10 and 1 % macerozyme R-10 gave released protoplasts at $1.25x10^7$/g.fr.wt., and viability of protoplasts was the highest (91.19%). In the case of phawa and mangosteen, leaves at 8 and 12 weeks of culture incubated in 2 % cellulase Onozuka R-10, 1 % macerozyme R-10 and 0.1 % pectolyase Y-23 gave released protoplasts at $1.1x10^6$ and $2.7x10^5$/g.fr.wt., respectively. Viability of protoplasts of the two species was 84.71 and 68.12 %, respectively. Mangosteen leaves which were pretreated in the dark for 24 hours before being subjected to protoplast isolation gave the greatest released protoplasts at $1x10^6$/g.fr.wt. and viability of the protoplasts was also high (91.35 %). Protoplasts isolated from somkhag leaves after 4 weeks of culture in MS with 0.2 % Phytagel, 0.5 mg/l dicamba and 1 mg/l BA at density of $1.5x10^5$/ml underwent microcolony formation after 3 weeks of culture. In the case of phawa, embedding of the protoplasts in MS with 0.2 % Phytagel, 0.5 mg/l 2, 4-D and 1 mg/l BA at density of $1x10^5$/ml gave the best result in division of protoplasts at 5.56 %. However, mangosteen protoplasts at density of $5x10^5$/ml could be promoted cell division (3.14 %) in a thin layer of liquid MS with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ. Addition of liquid medium with the same components supplemented with 0.1 % activated chacoal to the culture protoplasts of somkhag at 3 weeks enhanced development of the protoplasts. However, PVP did not improve division of the protoplasts.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำสั่งสอนทั้งในด้านการเรียน การวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษา และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี และรองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ และคณาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอน และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ทุกคนที่ให้การช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณลอย-ยินดี มูสิกะปาละ คุณพ่อ-คุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างสูงที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ขอบคุณ คุณประโลม มูสิกะปาละ พี่ชาย และคุณจุรีพร มูสิกะปาละ น้องสาว ที่เป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอบขอบ คุณชวนพิศ นิยะกิจ คุณบรรจง เยาวพันธุ์กุล เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	11
2. วิธีการวิจัย	12
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	12
วิธีการศึกษา	14
3. ผล	22
4. วิจารณ์	57
5. สรุป	68
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	78
ประวัติผู้เขียน	80

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตสำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะดัน มะพูด และชะมวง	14
2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของใบมะดันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 26 วัน	23
3. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของใบชะมวงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	25
4. ผลของสภาพการเลี้ยงต่อการสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนใบชะมวงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	27
5. การสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะดัน ชะมวง และมะพูดในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม	30
6. ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ต่อการสร้างแคลลัสของใบอ่อนและอับละอองเกสรมะดันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	31
7. ผลของความเข้มข้น 2,4-D ต่อน้ำหนักสด ขนาด และจำนวนที่เพิ่มปริมาณได้ของ friable callus มังคุดหลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์	32
8. ผลของความเข้มข้น 2,4-D ต่อการเพิ่มปริมาณของ friable callus มังคุดหลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	33
9. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสจาก friable callus ของมังคุด และอัตราการเพิ่มปริมาณของ friable callus	35
10. ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์ หลังเติมอาหารเหลว	37
11. ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบพะวา และมังคุดอายุ 7 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว	38
12. ผลของอายุใบหลังเติมอาหารเหลวต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก พะวา และมังคุด	39
13. ผลของการเตรียมใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ของใบอ่อนมังคุด	40

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14. ผลของตำแหน่งใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก	41
15. ผลของตำแหน่งใบต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์	42
16. ผลของอายุใบและความหนาแน่นต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก	42
17. ผลของความหนาแน่นต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์มังคุดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์	45
18. ผลของ 2,4-D และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อพัฒนาการของพลาสต์ส้มแขกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์	47
19. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์	49
20. ผลของระยะเวลาในการเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยง 1 และ 2 สัปดาห์	51
21. ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์	53
22. ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์	54
23. ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	55
24. ผลของการเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่าน และ PVP ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (เติมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์)	56

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยงใบมะดันเป็นเวลา 26 วัน	24
2. ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยงใบชะมวงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x18)	26
3. ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบชะมวงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (x9.6)	28
4. ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบชะมวงและดูแลในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 6 เดือน (x14.4)	28
5. ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยงใบมะพูด บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (x12)	29
6. ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) ที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมะดัน ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x18)	31
7. ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	33
8. ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	34
9. ลักษณะโนดูลของแคลลัส (ศรชี้) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	35

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10. compact callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง friable callus บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายเลี้ยงทุก 8 สัปดาห์ จำนวน 10 ครั้ง (x10.8)	36
11. โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมังคุดที่ตัดใบไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมงก่อนนำมาแยกด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์	40
12. การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกอายุ 4 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลวและเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x300)	43
13. ลักษณะสีน้ำตาลในโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 4 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลวและเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (x400)	44
14. การแบ่งเซลล์ (ศรชี้) ของโปรโตพลาสต์มังคุดที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (x600)	46
15. การเหี่ยวของโปรโตพลาสต์มังคุดที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (x300)	46
16. พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (x100)	48

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17. การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (x400)	50
18. การแบ่งเซลล์ (3 เซลล์) ของโปรโตพลาสต์ส้มแขกที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (x400)	55

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2i-P	=	isopentenyl adenine
BA	=	6-benzyladenine
BAP	=	6-benzylaminopurine
CH	=	casein hydrolysate
CPPU	=	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenyl urea forchlorfenuron
DKW	=	Driver and Kuniyuki (medium)
FDA	=	Fluorescein diacetate
HCA	=	hydroxy citric acid
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
MES	=	[(2N-morpholino) ethanesulfonic acid]
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
MT	=	Murashige and Tucker (medium)
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
TDZ	=	thidiazuron
TU	=	thiourea
WPM	=	woody plant medium

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

พืชในสกุล *Garcinia* จัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) ชนิดอื่นที่นิยมปลูกเพื่อรับประทานผล เช่น ส้มแขก (*G. atroviridis* Griff.) มะพูด (*G. dulcis* Kurz.) และมะดัน (*G. schomburgkiana* Pierre.) และที่ปลูกเป็นไม้ประดับ เช่น พะวา (*G. speciosa* Wall.) และชะมวง (*G. cowa* Roxb.) (สุรินทร์, 2543) มังคุดเป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออกและได้ชื่อว่าเป็นราชินีแห่งผลไม้ เนื่องจากมีรสหวานชวนรับประทาน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนแถบตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันมากในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และพม่า (Othman and Tindall, 1995) แหล่งปลูกมังคุดที่สำคัญของประเทศไทยอยู่ทางภาคใต้และภาคตะวันออก ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของภาคตะวันออกและภาคใต้เป็น 1,243 และ 981 กิโลกรัมต่อไร่ตามลำดับ ผลผลิตมังคุดนอกจากจะส่งขายภายในประเทศแล้วยังส่งออกไปยังต่างประเทศ ตลาดต่างประเทศที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น ไต้หวัน ฮ่องกง สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และอื่น ๆ คิดเป็นมูลค่าถึง 75.8 ล้านบาทในปี 2536 (กรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตร, 2540) ปัจจุบันประเทศไทยไม่สามารถผลิตมังคุดในปริมาณที่ต้องการได้อย่างสม่ำเสมอเนื่องจากเกษตรกรขาดความรู้ความเข้าใจในการจัดการปัจจัยการผลิตต่าง ๆ ก่อให้เกิดปัญหาการผลิตไม่สม่ำเสมอทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ปัญหาด้านปริมาณที่พบคือให้ผลผลิตมากปีเว้นปี และปัญหาด้านคุณภาพผลผลิตที่พบคือผลมีขนาดเล็กและมีตำหนิจากการเข้าทำลายของโรคและแมลง ยางตกภายในผล และเนื้อแก้ว มังคุดเป็นพืชที่ไม่ทนแล้งเมื่อเจอสภาพที่แปรปรวน เช่น สภาพแล้งเนื่องจากฝนทิ้งช่วงทำให้ดอกและผลอ่อนร่วง ผลผลิตต่ำหรือให้ผลเว้นปี (มงคล และคณะ, 2533) สำหรับส้มแขกปลูกกันมากในภาคใต้ของประเทศไทย เช่น ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ผลของส้มแขกทั้งสดและแห้งนำมาประกอบอาหารได้ และผลมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ hydroxy citric acid (HCA) มีการนำมาผลิตเป็นสารลดน้ำหนักได้ (Te-chato, 1997) โดยทั่วไปพะวาทนแล้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือส้มแขก การต่อกิ่งระหว่างพืชในสกุลนี้กับมังคุดเพื่อให้ต้นมังคุดทนแล้งมีข้อจำกัดเนื่องจากการเข้ากันไม่ได้หรือเข้ากันได้น้อย การย้ายลักษณะดังกล่าวสู่มังคุดโดยการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างชนิดของพืชในสกุลนี้มีความเป็นไปได้ ปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการชักนำแคลลัสและพืชต้นใหม่ของพืชสกุลนี้ โดยการเพาะเลี้ยงใบของต้นกล้า

ในหลอดทดลองในมังคุด (Goh *et al.*, 1988, 1994; Te-chato *et al.*, 1995a, b and c; Te-chato and Lim, 1999, 2000) การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากข้อและลำต้น และปลายยอด (Goh *et al.*, 1988; ธิดารัตน์, 2533) การเพาะเลี้ยงใบ ปลายยอด และข้อของส้มแขก (ราตรี และ สมปอง, 2539) การเพาะเลี้ยงเมล็ดและใบของมังคุด พะวา และส้มแขก (สมปอง, 2540) ส่วนพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีความสำคัญในสกุลนี้ ได้แก่ มะพูด มะดัน และชะมวง ยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก่อน จากรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้างต้นส่งผลให้การชักนำพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของส้มแขก มังคุด หรือโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างชนิดมีความเป็นไปได้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ผ่านการย่อยเอาผนังเซล์ออกโดยวิธีกลหรือการใช้เอนไซม์และสามารถแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช ชิ้นส่วนที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ ใบและเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง อย่างไรก็ตามพืชในสกุลนี้ยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการชักนำเซลซัสเพนชัน การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ชิ้นส่วนใบเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ มีรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบอ่อนส้มแขกจากหลอดทดลองและพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็กได้ (Te-chato, 1997) และรายงานการชักนำการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสีแดงของมังคุด (Te-chato, 1998) นอกจากนี้มีรายงานความสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในพืชยืนต้นหรือไม้ผลอื่น ๆ เช่น *Actinidia eriantha* Benth. (Zhang *et al.*, 1998) แอปเปิ้ล (Perales and Schieder, 1993) แก้ว (*Murraya paniculata*) (Jumin and Nito, 1995) ในพืชบางชนิดการแยกโปรโตพลาสต์จากใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด เช่น ท้อ (*Prunus persica*) ($1x10^6$-$1x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด(Mills and Hammerschlag,1994) องุ่น (*Vitis vinifera)* จากยอดที่ปลอดไวรัสในหลอดทดลอง ($2.5x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด(Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990) กุหลาบ (*Rosa hybrida* L.) พันธุ์ Abraham Darby และพันธุ์ Marie Pavie ($1.55x10^6$ และ $1.87x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ) (Marchant *et al.*, 1997) โปรโตพลาสต์ยังเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การสร้างลูกผสมที่ไม่มีเมล็ดในส้ม (Grosser *et al.*, 1992) การต้านทานโรคในส้มพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอ จำนวน 8 สายพันธุ์ (Louzada *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำโปรโตพลาสต์มาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลนี้ การศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อชักนำการสร้างแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ในส้มแขกหรือพะวามีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ของมังคุดซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้และประเทศ โดยเฉพาะโปรโตพลาสต์ของส้มแขกมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์ค่อนข้างสูง (Te-chato, 1997) การใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ของพืชสองหรือสามชนิดนี้อาจมีการส่งเสริมกันทำให้

พัฒนาเป็นแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ หรือได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการได้ นอกจากนี้อาจใช้โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือในการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญ เช่น ยีนทนแล้ง ทนเค็ม ต้านทานโรคและแมลงสู่มังคุดได้

ในรายงานฉบับนี้กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงใบอ่อนนอกหลอดทดลองของพืชในสกุล *Garcinia* บางชนิด ได้แก่ มังคุด มะพูด มะดัน และชะมวง โดยศึกษาสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในอันที่จะชักนำและเพิ่มปริมาณ friable callus เพื่อใช้ในการชักนำเซลล์ซัสเพนชัน ซึ่งอาจเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการขยายพันธุ์ หรือปรับปรุงพันธุ์พืชในสกุลนี้ต่อไป และรายงานการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของมังคุด พะวา และส้มแขก โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ อายุใบ ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ และศึกษาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเลี้ยง สูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์มังคุด พะวา และส้มแขก นอกจากนี้ยังศึกษาปัจจัยบางประการที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก ได้แก่ การเติมอาหารเหลวที่มี PVP (polyvinylpyrrolidone) และผงถ่าน (activated chacoal) เพื่อลดการเกิดสีน้ำตาลของโปรโตพลาสต์ส้มแขก และโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาการในขั้นต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. การชักนำแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในไม้ผลไม้ยืนต้น

Hammatt and Grant (1998) เปรียบเทียบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดรวมของแบล็คเซอร์รีและเซอร์รี่พันธุ์พื้นเมือง โดยการเพาะเลี้ยงใบที่ม้วนจากยอดอายุ 14 วันจากการเพาะเลี้ยงปลายยอด ในอาหารสูตร WPM (woody plant medium; McCown and Lloyd, 1981) หรืออาหารดัดแปลงสูตร DKW (Driver and Kuniyuki medium; Driver and Kuniyuki, 1984) เติม NAA (1-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA (6-benzyladenine) หรือ TDZ (thidiazuron) เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ พบว่า อาหารสูตร WPM ส่งเสริมการสร้างยอดสูงกว่าสูตร DKW และการเติม TDZ ส่งเสริมการสร้างยอดสูงกว่า BA Te-chato และคณะ (1995a) รายงานว่า โดยทั่วใบมังคุดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM หรือ MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอด 2-5 ยอด การเติม TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งเสริมการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแทนการพัฒนายอด ความเข้มข้นของ BA และ TDZ ที่เหมาะสม คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน Huetteman and Preece (1993) รายงานว่า TDZ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ (น้อยกว่า 1 ไมโครโมลาร์) ช่วยส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงไม้ยืนต้นที่มีผลในการเพาะเลี้ยงไม่มีความแน่นอนหลายชนิดได้สำเร็จมากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้ TDZ ความเข้มข้นสูงยับยั้งการยืดยาวของยอด จำเป็นต้องย้ายยอดไปยังอาหารที่มีความเข้มข้นของ TDZ ต่ำ ๆ และหรือร่วมกับไซโตไคนินชนิดอื่น เช่น N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenyl urea forchlorfenuron (CPPU) Normah (1992) รายงานการชักนำยอดรวมจากเมล็ดมังคุด โดยตัดเมล็ดเป็น 3 ส่วน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ และ BAP (6-benzylaminopurine) พบว่า ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 4.9 ยอดต่อแคลลัส และจำนวนยอดสูงสุด 8-12 ยอด Te-chato และคณะ (1995a) รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของมังคุดที่แตกต่างกันว่าให้ผลการชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและจำนวนต้นอ่อนแตกต่างกัน ใบอ่อนสีแดงให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนของต้นอ่อน (embryoids) สูง ส่วนใบสีเขียวนั้นแม้ว่าให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงแต่จำนวนต้นอ่อนน้อย ส่วนก้านใบและเมล็ดให้แคลลัสได้เช่นเดียวกันแต่น้อยกว่าใบมาก นอกจากนี้ยังรายงานว่าขนาดของชิ้นส่วนพืชมีผลต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส กล่าวคือ ชิ้นส่วนใบที่มีขนาดเล็ก (5-15 มิลลิเมตร) ให้ผลการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงกว่าใบขนาดใหญ่ (15-40 มิลลิเมตร) บนอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน การเพิ่มจำนวนแคลลัสโดยเพาะเลี้ยง

บนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติม BA และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน พบว่า แคลลัสตายมากขึ้น เนื่องจาก NAA ส่งเสริมให้สร้างสารประกอบฟีนอล Michael และคณะ (1996) รายงานการชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงใบจากในและนอกหลอดทดลองของอเมริกันเครนเบอร์รี (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) พันธุ์ Franklin และ Bergman บนอาหารสูตรดัดแปลงของ Anderson (Anderson, 1975) เติม TDZ อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในที่มีแสงหรือที่มืด พบว่า การเพาะเลี้ยงใบในที่มีแสงพบการสร้างยอดสูงกว่าการเลี้ยงในที่มืดทั้งสองพันธุ์ การเติม TDZ เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างเดียวสามารถชักนำยอดเฉลี่ยสูงสุด 18.9 ยอดต่อใบ การเติม NAA ร่วมกับ TDZ พบว่า ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นส่วนใบทั้งสองพันธุ์สามารถสร้างยอดได้ ส่วนใบนอกหลอดทดลองให้แคลลัสในปริมาณจำกัดและตายในที่สุด การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ไม่มีการยืดยาวของยอดทำนองเดียวกัน ในบลูเบอร์รีการยืดยาวของยอดถูกยับยั้งโดยอาหารเติม 2i-P (isopentenyl adenine) ความเข้มข้นสูง ๆ

2. การแยกโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ หมายถึง เซลล์พืชที่ปราศจากผนังเซลล์ เซลล์พืชทุกชนิดนอกจากมีเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังประกอบด้วยผนังเซลล์ โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยแต่ละเซลล์เชื่อมติดกันด้วยมิดเดิลลาเมลลา ซึ่งประกอบด้วย สารพวกเพคติน ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องมีเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือกลุ่ม pectinase ใช้สำหรับย่อยมิดเดิลลาเมลลา กลุ่ม cellulase และ hemicellulase ใช้สำหรับย่อยผนังเซลล์ (ประศาสตร์, 2538) วิธีการแยกโปรโตพลาสต์แบบดั้งเดิมที่ทำกันก่อนหน้านี้ คือ วิธีกล วิธีนี้ใช้มีดที่มีความคมเฉือนใบให้มีขนาดเล็กมาก (หั่นฝอย) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูงทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ได้ แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากขั้นตอนยุ่งยากและได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย ความมีชีวิตต่ำ และมีเศษเซลล์จำนวนมากยากต่อการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา ดังนั้นวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่ทำได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และนิยมกันแพร่หลาย คือการใช้เอนไซม์ วิธีนี้ค้นพบโดย Cocking (1960) อ้างโดย สมปอง (2536) การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์อาจแยกเป็นสองขั้นตอน หรือใช้ขั้นตอนเดียวโดยผสมเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน เอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระ คือ macerozyme เมื่อแต่ละเซลล์หลุดออกมาเป็นอิสระแล้ว เอนไซม์ชนิดที่สองจะทำการย่อยผนังเซลล์ เอนไซม์พวกนี้ คือ cellulase องค์ประกอบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสมช่วยให้ได้

โปรโตพลาสต์เป็นจำนวนมาก (สมปอง, 2536) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายปัจจัยดังนี้คือ

2.1 แหล่งของโปรโตพลาสต์และการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการแยกโปรโตพลาสต์

แหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์โดยทั่วไปมาจากสองแหล่ง คือ พืชที่ปลูกนอกหลอดทดลองและพืชที่อยู่ในหลอดทดลอง โดยปกติแล้วโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อที่มีอายุมากหรือมีการเจริญเติบโตในขั้นที่สอง (secondary growth) มักให้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย เนื่องจากเซลล์มีผนังหนามีสารพวกลิกนิน ซูเบอร์ลิน และคิวติน ซึ่งยากแก่การย่อยด้วยเอนไซม์ และเซลล์ส่วนใหญ่จะไม่มีชีวิตแล้ว หรือหากมีก็ไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไป (ประศาสตร์, 2538) แหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นิยมนำมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ ใบและเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากให้จำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง Te-chato (1997) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนส้มแขกจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่มีข้ออยู่ด้วยในหลอดทดลอง โดยทำการอินคิวเบทใบในเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสงต่ำนาน 4 ชั่วโมง พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 2.6×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด การเติมเอนไซม์ pectolyase Y-23 ไม่ส่งเสริมการแยกโปรโตพลาสต์ Te-chato (1998) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสีแดงของมังคุด พบว่า เอนไซม์ cellulase Onozuka RS เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการอินคิวเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสงต่ำนาน 6 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 5×10^4 ต่อกรัมน้ำหนักสด Perales และ Schieder (1993) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนแอปเปิ้ลในหลอดทดลอง โดยทำการอินคิวเบทใบร่วมกับเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ hemicellulase เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ driselase เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ PVP-10 (polyvinylpyrrolidone 10000) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ MES [(2N-morpholino) ethanesulfonic acid] เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ $CaCl_2.2H_2O$ เข้มข้น 0.63 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 30 รอบต่อนาที ในที่มืดนาน 17 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 6×10^6–1.6×10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด ในแอปเปิ้ลทั้ง 7 สายพันธุ์ Marchant และคณะ (1997) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบในหลอดทดลองของกุหลาบ *Rosa hybrida* L. พันธุ์ Abraham Darby โดยแช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่มีแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ (CPW 13 M) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาแช่ในเอนไซม์ hemicellulase เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ macerozyme เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ cellulase RS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ PVP-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุหลาบพันธุ์ Marie Pavie ใช้เอนไซม์ hemicellulase และ macerozyme ความเข้มข้นเดียวกันแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase RS และ pectolyase Y-23 เป็น 0.7 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า กุหลาบพันธุ์ Abraham Darby ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.55x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และพันธุ์ Marie Pavie ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.87x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด Mills และ Hammerschlag (1994) ศึกษาขนาดใบที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบท้อ (*Prunus persica*) พบว่า ใบขนาดเล็ก (ยาว 4-10 มิลลิเมตร) ที่อินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงกว่าใบขนาดกลาง-ใหญ่ (13-30 มิลลิเมตร) ทำนองเดียวกัน Zhang และคณะ (1998) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อน (ใบที่แตกใหม่) ในหลอดทดลองของ *Actinidia eriantha* Benth. โดยตัดใบให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร และอินคิวเบทร่วมกับเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ macerozyme R-10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 10^6-10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 92-97 เปอร์เซ็นต์ Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) แยกโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น (*Vitis vinifera*) จากยอดที่ปลอดไวรัสในหลอดทดลอง พบว่า ใบที่มีขนาดความกว้าง 0.7 เซนติเมตร น้ำหนัก 50-100 มิลลิกรัม เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเอนไซม์ macerozyme R-10 เข้มข้น 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำการอินคิวเบทใบร่วมกับเอนไซม์ในที่มืดหรือที่มีแสง นาน 18 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $25x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และโปรโตพลาสต์มีขนาด 12-44 ไมโครเมตร Ding และคณะ (1995) เปรียบเทียบแหล่งของชิ้นส่วนที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์แอปเปิ้ลพันธุ์ที่ใช้เป็นกิ่งพันธุ์ดีสายพันธุ์ยุโรป 2 สายพันธุ์ (Starkrimson และ Rainier) และสายพันธุ์จีน 2 สายพันธุ์ (Qiujin และ Liaofu) โดยใช้เซลล์ซัสเพนชัน, ใบเลี้ยงอายุ 3-8 วันจากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง, ใบในหลอดทดลอง และใบจากต้นอายุ 14 ปี นอกหลอดทดลอง อินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์ pectinase เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ dextran sulfate (potassium salt) เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2.2H_2O$ เข้มข้น 0.01 โมลาร์ KH_2PO_4 เข้มข้น 0.65 โมลาร์ pH 5.8 นาน 6 ชั่วโมง พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด ทั้ง 4 สายพันธุ์ ส่วนใบในหลอดทดลองเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ที่ไม่เหมาะสม Saito และ Suzuki (1999) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์ที่แยก

จากเซลล์ซัสเพนชันซึ่งชักนำจากแคลลัสของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของแอปเปิ้ลพันธุ์ฟูจิ โดยอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase RS เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ pH 5.7 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ว่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด

2.2 ความดันออสโมติค

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ เซลล์ต้องสัมผัสกับอาหารโดยตรงทำให้เซลล์แตกง่าย ดังนั้นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต้องใช้อาหารที่มีออสโมติคัมที่เหมาะสม (ความดันออสโมติคระหว่างภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ต้องสมดุลกัน) หากความดันออสโมติคภายนอกสูงเกินไปทำให้เซลล์ลดการนำเข้าของกรดอะมิโน และลดการสร้างผนังเซลล์ กระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตของเซลล์เสียหายได้ สุดท้ายโปรโตพลาสต์เหี่ยวเสียรูปร่าง ส่วนความดันออสโมติคภายนอกเซลล์ที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตก (Evans and Bravo, 1983) สารเคมีที่ใช้ในการปรับความดันออสโมติค เรียก สารออสโมติคัม ได้แก่ น้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล ซอร์บิทอล และน้ำตาลที่ไม่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ ได้แก่ กลูโคส และซูโครส โดยการใช้ร่วมกันหรืออย่างใดอย่างหนึ่งเพียงลำพัง อย่างไรก็ตามสารละลายออสโมติคัมที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ แมนนิทอล ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 0.23-0.9 โมลาร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความดันออสโมติคของใบขณะแยก (Kao and Michayluk, 1974)

2.3 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ ขึ้นอยู่กับแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์และวิธีการเตรียมชิ้นส่วนพืชดังกล่าว โดยทั่วไป cellulase ร่วมกับ pectolyase หรือ macerozyme ก็เพียงพอต่อการแยกโปรโตพลาสต์จำนวนมาก (Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis, 1990; Mills and Hammerschlag, 1994; Ding *et al.*, 1995; Te-chato, 1997) ในพืชที่แยกยากเนื่องจากมีโครงสร้างของสารที่เชื่อมเซลล์ซับซ้อนจำเป็นต้องใช้ pectolyase Y-23 ร่วมด้วย พืชพวกนี้ คือ มังคุด (Te-chato, 1998) การไม่เติม pectolyase Y-23 ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ สำหรับพืชในเมืองหนาวใช้ pectolyase Y-23 ความเข้มข้นต่ำกว่าพืชเมืองร้อน (Marchant *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Saito and Suzuki, 1999)

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากที่กล่าวแล้วข้างต้นว่าโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ ดังนั้นการเลี้ยงในอาหารจึงต้องเติมสารออสโมติคัมลงไปด้วยเพื่อปรับสมดุลของออสโมติคัมภายในและภายนอกเซลล์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ และมีการแบ่งเซลล์หรือพัฒนาการของโปรโตพลาสต์เป็นพืชต้นใหม่ได้ สำหรับระยะเวลาและความสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ และมีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์มี 3 วิธี ใหญ่ ๆ คือ เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ (thin layer) เลี้ยงแบบหยดแขวน (hanging drop) และ ฝังเลี้ยง (embedding) Te-chato (1997) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด สามารถพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็กหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน Te-chato (1998) รายงานการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมังคุดในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ สูตร MS เติม น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่าส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด Zhang และคณะ (1998) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของ *Actinidia eriantha* ในอาหารเหลวสูตร MS (ไม่เติม NH_4NO_3) เติม 2,4-D เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับกลูโคส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ CH (casein hydrolysate) เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.6 ทำการเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์ (plating efficiency) 19.4 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาเป็นแคลลัสโดยไม่ต้องเติมอาหารใหม่หลังจากเลี้ยงนาน 3 เดือน เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม zeatin เข้มข้น 2.28 ไมโครโมลาร์ และ IAA (indole-3-acetic acid) เข้มข้น 0.57 ไมโครโมลาร์ ชักนำการเกิดต้นใหม่ และชักนำรากโดยจุ่มแช่ยอดใน IBA (indole-3-butyric acid) เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต Perales และ Schieder (1993) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบแอปเปิ้ล 7 พันธุ์ พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในโซเดียมอัลจีเนตในอาหารสูตร MS หรือ MI (Li and Kohlenbach, 1982) เติม BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ NAA เข้มข้น 2.6 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์

การชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสในอาหารเติม BA ร่วมกับ NAA ให้ผลต่ำ (3 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อเติม BA ร่วมกับ TDZ สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ 7 และ 56 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ Florina และ Gala F1 ตามลำดับ Jumin และ Nito (1995) รายงานการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และชักนำการออกดอกในหลอดทดลองจากโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของต้นแก้ว (*Murraya paniculata*) โดยเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3-5x10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker, 1969) เติมซูโครส เข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร gibberellin A_{4+7} และ malt extract เข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร พัฒนาการของแคลลัสเป็นพืชต้นใหม่เกิดโดยกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีสบนอาหารสูตร MT เติมแลคโตส 50 กรัมต่อลิตร ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และสามารถชักนำการออกดอกหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MT ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง เติมซูโครส 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน Ding และคณะ (1995) เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันของแอปเปิ้ล 4 สายพันธุ์ ในอาหารสูตรต่าง ๆ คือ MS, K8P (Kao, 1977) หรือ D2 (Li *et al.*, 1981) พบว่า อาหารสูตร K8P ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด และพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดเล็กหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30-35 วัน และแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สำเร็จ นอกจากนี้ พบว่า การเติม TDZ ในอาหารเลี้ยงส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ การใช้ TDZ ความเข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน BA ส่งเสริมการสร้างตายอด Saito and Suzuki (1999) รายงานในทำนองเดียวกันในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันที่ชักนำจากแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของแอปเปิ้ลพันธุ์ฟูจิ ในขณะที่ Jullien และคณะ (1998) รายงานการชักนำพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของสะระแหน่ 3 พันธุ์ ในอาหารเหลวหรือแข็งสูตร B5 (Gamborg *et al.*, 1968) ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 B5) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เติม 2,4-D เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงกว่าอาหารแข็งและอาหารเหลวเติม 2,4-D ความเข้มข้นสูงกว่านี้ แต่อาหารแข็งเหมาะสมในการแบ่งเซลล์ในระยะต่อมาจนพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดเล็ก แคลลัสพัฒนาเป็นยอดเมื่อใช้ออกซินความเข้มข้นต่ำ (NAAเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์) และใช้ไซโตไคนินความเข้มข้นสูง การเติม TDZ เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ เพิ่มการสร้างตายอดจากแคลลัสของสะระแหน่พันธุ์ Mitcham Digne 38 และ Todd' s และมีอัตราการสร้างตายอดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการชักนำ friable callus จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของมังคุด มะพูด มะดัน และชะมวง
2. เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ อายุ ตำแหน่งใบ และการเตรียมใบที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด
3. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ในการศึกษาการชักนำแคลลัส ใช้ใบอ่อนมะพูด มะดัน และชะมวง จากนอกหลอดทดลอง ขนาดความยาวใบเฉลี่ย 3-3.5 เซนติเมตร กว้าง 0.8-1.0 เซนติเมตร (ใบมะดันและชะมวง) และขนาดความยาวใบเฉลี่ย 14 เซนติเมตร กว้าง 4.5 เซนติเมตร (ใบมะพูด) นำมาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำสบู่ 2 ครั้ง แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอร์ไรท์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-5 ครั้ง ตัดส่วนของใบให้คงเหลือแผ่นใบและเส้นกลางใบขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงให้ด้านหลังใบสัมผัสอาหารสูตร MS และ WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส คัดเลือกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการย้ายเลี้ยงแคลลัสครั้งต่อไป และนำแคลลัสมาเป็นวัสดุพืชในการทดลองสภาพการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของแคลลัสต่อไป

สำหรับศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ ใช้ใบส้มแขกจากยอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงลำต้นบนอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร TU (thiourea) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน แล้วตัดใบมาแยกโปรโตพลาสต์

ส่วนใบอ่อนมังคุด และใบพะวา ได้จากกลุ่มยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต

BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา1, 2 และ 3 เดือน แล้วตัดใบมาแยกโปรโตพลาสต์

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้เตรียมธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของอาหารสูตร WPM, MS และ K8P (รายละเอียดของสูตรอาหารแสดงในตารางภาคผนวก)
- น้ำตาลซูโครส, วุ้น Phytagel และ PVP
- สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, BA, 2,4-D, TU, TDZ และ dicamba
- เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ คือ cellulase Onozuka R-10, macerozyme R-10 และ pectolyase Y-23
- แมนนิทอล
- สารเคมีบัฟเฟอร์ MES
- สารเคมีตรวจสอบความมีชีวิต คือ FDA (Fluorescein diacetate)
- เอทธานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- คลอร็อกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25 เปอร์เซ็นต์)

2. อุปกรณ์การทดลอง

- เครื่องแก้วประกอบด้วย ฟลาสก์, ปิเปต, กระบอกตวง, volumetric flask, บีกเกอร์, จานเพาะเลี้ยงแก้วและพลาสติก
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ปากคีบ, ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด, กระดาษทิชชู และพาราฟิล์ม
- อุปกรณ์ในการแยกโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย กรรไกรพร้อมใบมีดโกน, ผ้ากรองมิราคลอทขนาด 77 ไมโครเมตร, พาสเจอร์ปิเปต, ลูกยางสำหรับดูด, หลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 20 มิลลิลิตร และกระจกสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ, ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ, ตู้ย้ายเลี้ยง, ตู้เย็นอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องวัด pH, เครื่องเขย่าแบบไปมา, กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด และฟลูออเรสเซนส์

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาการชักนำ friable callus ในใบอ่อนมะพูด มะดัน และชะมวง

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงใบอ่อนมะพูด มะดัน และชะมวง ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว โดยตัดใบด้านริมใบทิ้งคงเหลือเส้นกลางใบและแผ่นใบขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงให้ด้านหลังใบสัมผัสอาหาร สูตร MS และ WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตสำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะดัน มะพูด และชะมวง

สูตรอาหาร	NAA	BA	TDZ	2,4-D	TU
	(มก./ล.)				
MS					
	0.1	0.5	-	-	-
	0.1	-	0.5	-	-
	-	0.5	0.5	-	-
	-	0.5	-	1.0	-
	-	-	0.5	1.0	-
WPM					
	0.1	0.5	-	-	-
	0.1	-	-	-	0.5
	-	0.1	-	-	0.1
	-	0.5	-	1.0	-
	-	-	-	1.0	0.5

- ไม่เติม

แต่ละชนิดและความเข้มข้นของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงจำนวน 20 ชิ้น (หลอด) ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,400-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนการสร้างแคลลัส ลักษณะ และสีของแคลลัส และบริเวณที่สร้างแคลลัส

2. การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและใบอ่อนมะดัน

ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวใบอ่อนมะดันโดยใช้แอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดบริเวณริมใบออกให้เหลือเส้นกลางใบและแผ่นใบขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงให้ด้านหลังใบสัมผัสอาหาร สำหรับอับละอองเกสรนั้นฟอกฆ่าเชื้อโดยนำดอกตูมของมะดันมาจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์แล้วลนไฟ จำนวน 2-3 ครั้ง แล้วตัดแยกกลีบดอกออก ตัดส่วนของอับละอองเกสรเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนการสร้างแคลลัส ลักษณะ และสีของแคลลัส และบริเวณที่สร้างแคลลัส

3. การศึกษาความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ต่อการพัฒนาของ friable callus มังคุด

ในการศึกษานี้ใช้ friable callus ที่ดูแลรักษาในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเริ่มแรก (สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 5.7 เติมผงวุ้น Phytagel เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์) มาตัดแยกให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จำนวน 12 ชิ้น ชั่งน้ำหนักเริ่มแรกและย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 และ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x90 มิลลิเมตร จำนวน 12 ชิ้น ในแต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ (แต่ละจานเพาะเลี้ยงคิดเป็น 1 ซ้ำ) เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัส ขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และจำนวนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้ เปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นของ 2,4-D โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD)

4. การศึกษาความสามารถในการชักนำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสจาก friable callus มังคุด

ในการศึกษานี้ใช้ friable callus ที่ดูแลรักษาในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเริ่มแรก (สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 5.7 เติมผงวุ้น Phytagel เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์) มาตัดแยกให้มีขนาดประมาณ 0.5-1x0.5-1 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x90 มิลลิเมตร จำนวน 12 ชิ้น เพาะเลี้ยงจำนวน 3 ซ้ำ (แต่ละจานเพาะเลี้ยงคิดเป็น 1 ซ้ำ) เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนการสร้างปมในแคลลัส

5. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

5.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และหรือเอนไซม์ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว ส่วนพะวา และมังคุดใช้ใบอายุ 7 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว แยกด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1, และ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับมังคุดใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka RS เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) อินคิวเบทใบพืชทั้งสามชนิดในสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 40 (สำหรับใบส้มแขกและพะวา) และ 50 รอบต่อนาที (สำหรับมังคุด) ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จึงนำโปรโตพลาสต์มากรองด้วยผ้ากรองมิราครอทฆ่าเชื้อ ขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ผ่านไปยังหลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์ และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง (สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เติมธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS

ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเป่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วลอยบนสารละลายซูโครส เข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์ โดยปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากตอนกลางระหว่างแมนนิทอลและซูโครส แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2-3 ครั้ง ตรวจสอบจำนวน โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์บนสไลด์นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลาย FDA เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ในพืชแต่ละชนิด

5.2 การศึกษาผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขก และใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบพะวา และมังคุด ที่ดูแลในอาหารสองชั้นเป็นเวลาต่างๆ คือ 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ หลังจากอินคิวเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 40 (สำหรับใบส้มแขก และพะวา) และ 50 รอบต่อนาที (สำหรับมังคุด) ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส นำไปแยกโปรโตพลาสต์เช่นเดียวกับวิธีการในการศึกษาที่ 5.1 นับจำนวน และตรวจสอบความมีชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่ละอายุใบของพืชแต่ละชนิด

5.3 การศึกษาผลของการเตรียมใบมังคุดที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษาเตรียมใบมังคุดที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ 2 วิธี คือ ตัดใบแล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตัดใบแล้วแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 (CPW 13 M) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกับใบสดที่ไม่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการใด ๆ อินคิวเบทใบที่เตรียมทั้ง 2 วิธีในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธี

ที่กล่าวมาแล้วในการศึกษาที่ 5.1 บันทึกจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเตรียม

5.4 การศึกษาผลของตำแหน่งใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

ในการศึกษานี้แยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกจากยอดที่เลี้ยงในอาหารสองชั้นอายุ 4.5 เดือน หลังจากเติมอาหารเหลว โดยใช้ใบคู่ที่ 1, 2 และ 3 นับจากยอดลงมา ตัดใบอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในการศึกษาที่ 5.1 ปรับความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ บันทึกจำนวน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละตำแหน่งใบ

5.5 การศึกษาผลของอายุใบและความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกอายุ 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว แล้วเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอายุดังกล่าวยกเว้นโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 16 สัปดาห์ ไม่เลี้ยงเนื่องจากจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำ ปรับความหนาแน่นในการเลี้ยงเป็น 3 ระดับ คือ $0.5x10^5$, $1x10^5$ และ $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ลดความเข้มข้นของออสโมติคัมทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ ในทุกความหนาแน่นที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ความเข้มข้นแมนนิทอลในสัปดาห์ที่สองเป็น 0.5 โมลาร์) ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม เพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส บันทึกการสร้างผนังเซลล์ เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละอายุและความหนาแน่นที่เลี้ยง

5.6 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์พะวา และมังคุด

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์พะวาด้วยความหนาแน่นเป็น 3 ระดับ คือ $0.5x10^5$, $1x10^5$ และ $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ส่วนโปรโตพลาสต์มังคุดเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^4$, $1x10^5$, $1.5x10^5$, $2.5x10^5$, $5x10^5$, และ $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม เพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส บันทึกการสร้างผนังเซลล์ เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นที่เลี้ยงของพืชแต่ละชนิดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 หรือ 2 สัปดาห์

5.7 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมังคุด พะวา และส้มแขก ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์มังคุดในอาหารเหลว สูตรดังกล่าวปริมาตร 3 มิลลิลิตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่วนโปรโตพลาสต์ส้มแขกและพะวาฝังเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าว เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ และ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์มังคุด และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ dicamba เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ส้มแขก บันทึกเปอร์เซ็นต์

Central Library
Prince of Songkla University

การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เลี้ยงของพืชแต่ละชนิด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 หรือ 2 สัปดาห์

5.8 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 หรือ 3 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และผงถ่าน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

5.9 การศึกษาความเข้มข้นของ PVP ในอาหารเหลวต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงใน อาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และ PVP เข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 มิลลิลิตร บันทึกพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังจากเติมเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

5.10 การศึกษาผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ K8P เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทั้งหมดเติมสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสูตรควบคุม คือ สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อของโปรโตพลาสต์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

5.11 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$, $3x10^5$, $5x10^5$ และ $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

บทที่ 3

ผล

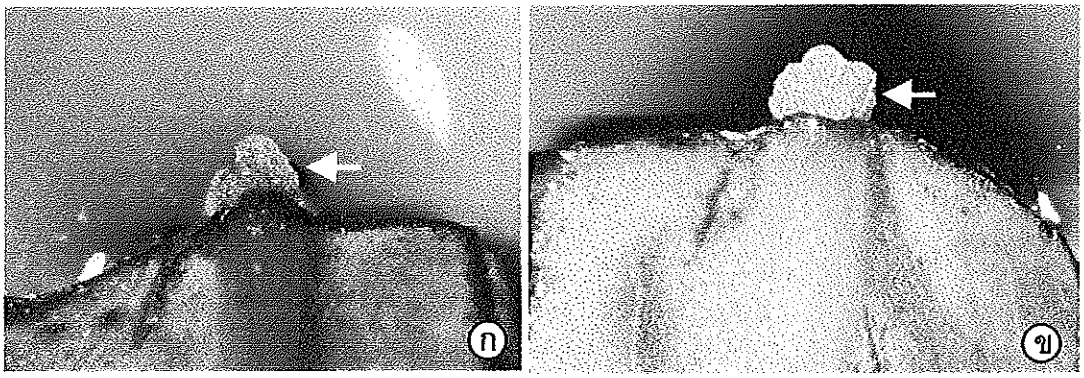
1. การชักนำ friable callus จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะพูด มะดัน และชะมวง

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ มะพูด มะดัน และชะมวง บนอาหารสูตร MS และ WPM เติมสารควบคุมชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 26 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงใบมะดันบนอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TU มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 28.57 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองลักษณะเป็น friable callus เกิดตรงปลายรอยตัดบริเวณเส้นกลางใบด้านโคน (proximal) (ภาพที่ 1 ก) อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลสูง 85.71 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 6.67 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 73.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองลักษณะเป็น compact callus เกิดตรงรอยตัดบริเวณเส้นกลางใบด้านโคน และมีขนาดใกล้เคียงกับสูตรข้างต้น (WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TU มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1 ข) อย่างไรก็ตามหลังจากตัดแยกแคลลัสออกจากชิ้นส่วนใบและเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของใบมะดันหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 26 วัน

สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)					ชิ้นส่วนสีน้ำตาล-ตาย	การสร้างแคลลัส
NAA	BA	TDZ	2,4-D	TU	(%)	(%)
		MS				
0.1	0.5	-	-	-	95.00	5.00
0.1	-	0.5	-	-	100.00	0
-	0.5	0.5	-	-	89.47	0
-	0.5	-	1.0	-	55.56	0
-	-	0.5	1.0	-	100.00	0
		WPM				
0.1	0.5	-	-	-	0	0
0.1	-	-	-	0.5	0	0
-	0.1	-	-	0.1	100.00	0
-	0.5	-	1.0	-	73.33	6.67
-	-	-	1.0	0.5	85.71	28.57

- ไม่เติม



ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยงใบมะดันเป็นเวลา 26 วัน

(ก) บนอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร TU 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (friable callus) (x8)

(ข) บนอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (compact callus) (x9.6)

ส่วนการเพาะเลี้ยงใบชะมวง พบว่า อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 35 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนสีน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ลักษณะแคลลัสที่สร้างเป็นขุย ๆ สีขาว ตรงปลายรอยตัดบริเวณเส้นกลางใบด้าน โคน (proximal) หรือด้านปลาย (distal) ส่วนบริเวณรอบรอยตัดของชิ้นส่วนทั้งหมดเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสของใบชะมวง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)					ชิ้นส่วนสีน้ำตาล-ตาย	การสร้างแคลลัส
NAA	BA	TDZ	2,4-D	TU	(%)	(%)
		MS				
0.1	0.5	-	-	-	0	15.00
0.1	-	0.5	-	-	10	35.00
-	0.5	0.5	-	-	5	0.00
-	0.5	-	1.0	-	15	6.25
-	-	0.5	1.0	-	30	0.00
		WPM				
0.1	0.5	-	-	-	10	33.33
0.1	-	-	-	0.5	5	0.00
-	0.1	-	-	0.1	15	0.00
-	0.5	-	1.0	-	10	11.76
-	-	-	1.0	0.5	65	14.29

- ไม่เติม

ภาพที่ 2 ลักษณะแคลลัส (ศรชี้)จากการเพาะเลี้ยงใบชะมวงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x18)

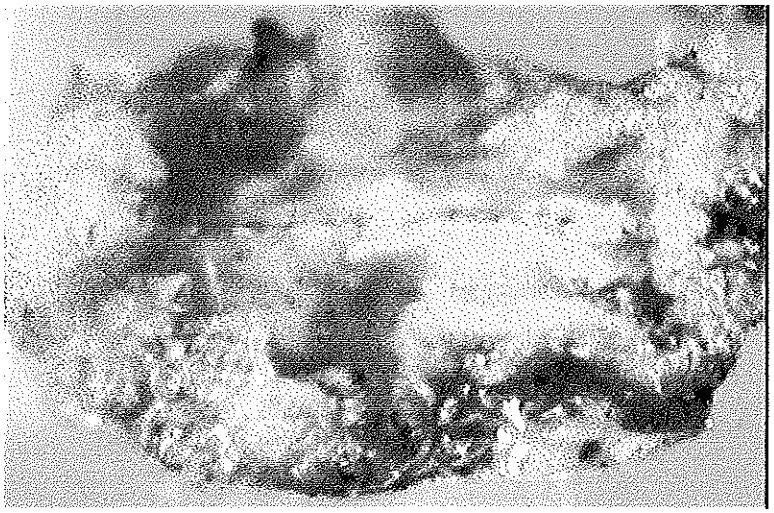
หลังจากทำการย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตรเดิม เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงและในที่มืดเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างและเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) มีการสร้างแคลลัสสีเหลือง บริเวณรอบรอยตัด (ภาพที่ 3) ส่วนสูตรอื่น ๆ เกิดแคลลัสสีเหลือง-น้ำตาล บริเวณรอยตัดเช่นกัน ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์แคลลัสจากใบชะมวงต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของสภาพการเลี้ยงต่อการสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนใบชะมวงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)					จำนวนชิ้นส่วนที่เลี้ยง		จำนวนที่สร้างแคลลัส		การสร้างแคลลัส (%)	
NAA	BA	TDZ	2,4-D	TU	มืด	มีแสง	มืด	มีแสง	มืด	มีแสง
		MS								
0.1	0.5	-	-	-	3	6	3	4	100.00	66.67
0.1	-	0.5	-	-	5	6	3	3	60.00	50.00
-	0.5	0.5	-	-	5	10	2	0	40.00	0.00
-	0.5	-	1.0	-	1	3	0	0	0.00	0.00
-	-	0.5	1.0	-	4	3	0	0	0.00	0.00
		WPM								
0.1	0.5	-	-	-	4	6	1	1	25.00	16.67
0.1	-	-	-	0.5	5	8	0	0	12.50	0.00
-	0.1	-	-	0.1	8	9	1	0	0.00	0.00
-	0.5	-	1.0	-	2	4	0	0	0.00	0.00
-	-	0.5	1.0	-	6	7	0	0	0.00	0.00

- ไม่เติม

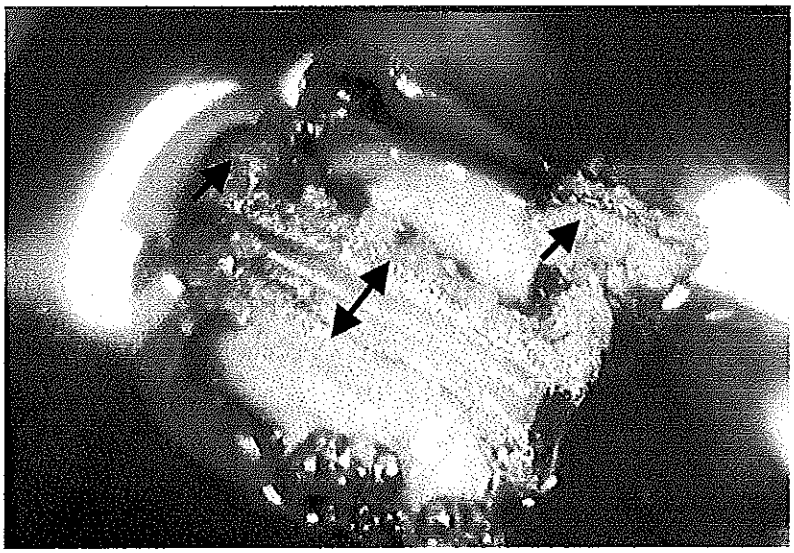
เมื่อทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพาะเลี้ยงในที่มืด โดยทำการย้ายเลี้ยงทุก 8 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า แคลลัสจากใบชะมวงมีสีเหลืองครีม-น้ำตาล และมีลักษณะร่วน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบชะมวงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (x9.6)

ภาพที่ 4 ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบชะมวงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 6 เดือน (x14.4)

ส่วนในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะพูด พบว่า อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ และให้ชิ้นส่วนสีน้ำตาล 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่พบการสร้างแคลลัส หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์จำนวน 2 ครั้ง) แคลลัสที่สร้างมีสีเหลือง-น้ำตาล ลักษณะเป็น friable callus มีกำเนิดตรงบริเวณเส้นกลางใบ และบริเวณรอยตัดบางส่วน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) จากการเพาะเลี้ยงใบมะพูดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (x12)

จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะดัน ชะมวง และมะพูด ในอาหารสูตร MS หรือ WPM เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ สรุปได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมะดัน ชะมวง และมะพูดในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม

พืช	สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	การสร้างแคลลัส (%)	ลักษณะ สี บริเวณที่สร้างแคลลัส	การเพิ่มปริมาณแคลลัส
มะดัน	WPM (1) 2,4-D + (0.5) TU	28.57	F เหลือง ปลายรอยตัดบริเวณเส้นกลางใบด้านโคนใบ	ไม่ได้
ชะมวง	MS (0.1) NAA + (0.5) BA	100.00	F เหลือง บริเวณรอบรอยตัด	ได้
มะพูด	MS (1) 2,4-D + (0.5) BA	20.00	F เหลือง-น้ำตาล บริเวณเส้นกลางใบ และรอยตัดบางส่วน	ไม่ได้

F = friable callus

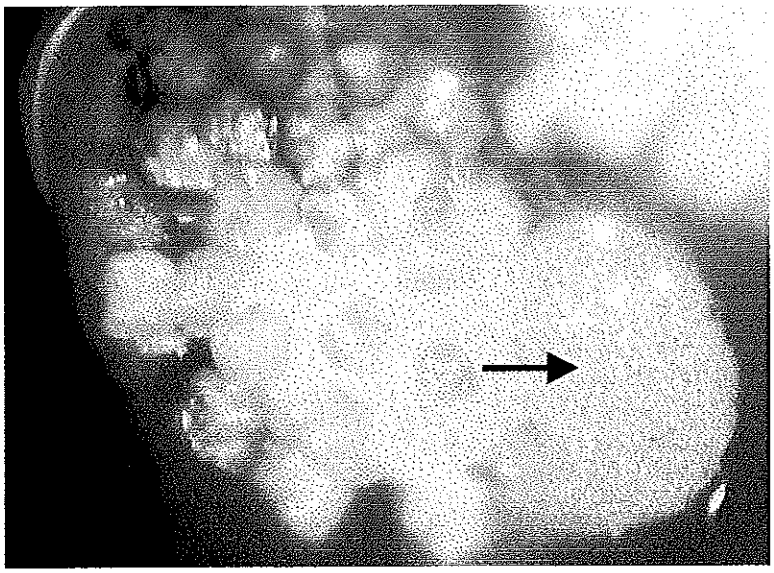
2. การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและใบอ่อนมะดัน

หลังจากเพาะเลี้ยงใบ และอับละอองเกสรมะดัน บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมะดันบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด เท่ากันคือ 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะ friable callus เกิดบริเวณรอยตัดที่ฐานของอับละอองเกสร (ภาพที่ 6) ส่วนชิ้นส่วนใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามหลังจากย้ายเลี้ยงโดยไม่ตัดแยกแคลลัสออกจากชิ้นส่วนเดิมในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย

ตารางที่ 6 ผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ต่อการสร้างแคลลัสของใบอ่อนและอับละอองเกสรมะดัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		จำนวนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง		การสร้างแคลลัส (%)	
2,4-D	BA	ใบ	อับละอองเกสร	ใบ	อับละอองเกสร
0.5	0.1	14	11	0	0
1.0	0.1	14	5	0	20
2.0	0.1	14	-	0	-
3.0	0.1	14	15	0	20
4.0	0.1	14	2	0	0

- เกิดการปนเปื้อน



ภาพที่ 6 ลักษณะแคลลัส (ศรชี้) ที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมะดัน ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x18)

3. การศึกษาความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ต่อการพัฒนาของ friable callus มังคุด

จากการเพาะเลี้ยง friable callus บนอาหารสูตร MS เติมเติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด 420 มิลลิกรัม ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด 6.7 มิลลิเมตร และจำนวนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้สูงสุด 68.06 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7, ภาพที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้น 2,4-D ต่อน้ำหนักสด ขนาด และจำนวนที่เพิ่มปริมาณได้ของ friable callus มังคุดหลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	น้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย (มก.)	ขนาดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย (มม.^{2})	จำนวนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้ (%)
1	420 a	6.7	68.06 a
2.5	400 a	1.8	65.28 ab
5	180 b	1.5	56.96 ab
10	70 c	-	37.50 abc
20	40 c	-	33.33 bc
50	-10 c	-	19.45 c
F-test	**	ns	*
C.V. (%)	32.77	86.14	36.25

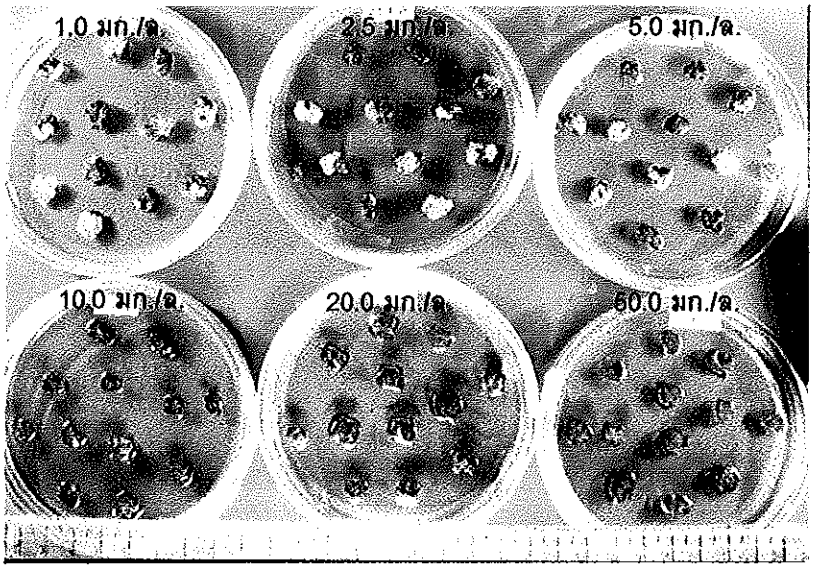
- ขนาดไม่เปลี่ยนแปลง

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P=0.01)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

อักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย DMRT

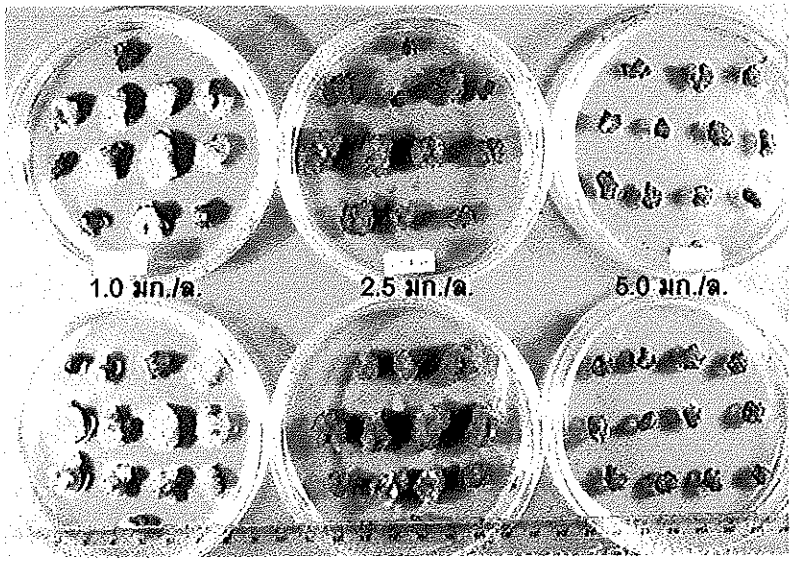


ภาพที่ 7 ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เนื่องจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้นสูง (10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลและตาย จึงทำการย้ายเลี้ยงเฉพาะแคลลัสในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 1.0, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้สูงสุด 72.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วน 2,4-D ความเข้มข้นสูงกว่านี้มีผลทำให้แคลลัสส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย (ตารางที่ 8, ภาพที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้น 2,4-D ต่อการเพิ่มปริมาณของ friable callus มังคุดหลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้ (%)
1.0	72.22
2.5	36.11
5.0	19.44



ภาพที่ 8 ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

4. การศึกษาความสามารถในการชักนำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสจาก friable callus มังคุด

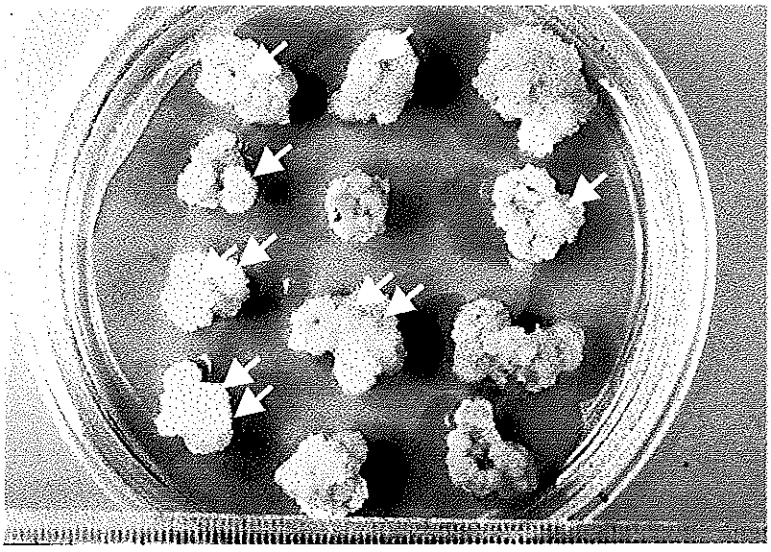
หลังจากเพาะเลี้ยง friable callus มังคุดบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีการสร้างโนดูลเฉลี่ย 22.22 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเฉลี่ย 1.42 โนดูลต่อแคลลัส (ตารางที่ 9, ภาพที่ 9) ส่วนแคลลัสที่ไม่มีการสร้างโนดูลยังคงลักษณะร่วนเปราะมีสีเหลืองครีมถึงน้ำตาล เมื่อทำการตัดแบ่งย้ายเลี้ยงสามารถเพิ่มจำนวนได้ 12 เท่า ในเวลา 8 สัปดาห์ ดังนั้นหากมีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1 ปี สามารถเพิ่มปริมาณได้ 2,985,984 แคลลัสหรือ 2,985,984x1.42 โนดูล อย่างไรก็ตามเมื่อตัดแบ่งแคลลัสที่สร้างโนดูลและย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมต่อไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการเพาะเลี้ยง friable callus ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณได้ 5 เท่าในแต่ละแคลลัส ดังนั้นหากมีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1 ปี

สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตรดังกล่าวได้ 15,625 แคลลัส และจากการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 10 ครั้ง พบว่า แคลลัสไม่มีการสร้างโนดูล แต่สามารถพัฒนาเป็น compact callus มีสีเหลือง-เขียว 17.99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10, ภาพที่ 10) และยังคงเป็น friable callus 60.40 เปอร์เซ็นต์ และให้แคลลัสสีน้ำตาล 21.30 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสจาก friable callus ของมังคุด และอัตราการเพิ่มปริมาณของแคลลัส

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)			การสร้างโนดูลา แคลลัส (%)	การสร้าง compact callus	อัตราการเพิ่มปริมาณของ friable callus
BA	TDZ	24-D			
0.5	0.5	-	22.22 (1.42)*	0.00	12 เท่า
0.5	-	1.0-	0.00	17.99	5 เท่า

* จำนวนโนดูลเฉลี่ยต่อแคลลัส



ภาพที่ 9 ลักษณะโนดูลของแคลลัส (ศรชี้) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ภาพที่ 10 compact callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง friable callus บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายเลี้ยงทุก 8 สัปดาห์ จำนวน 10 ครั้ง (x10.8)

5. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

5.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว โดยใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 ร่วมกับ macerozyme R-10 ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.46×10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 62.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วน เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกัน คือ 1.25×10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 91.19 เปอร์เซ็นต์ การใช้เอนไซม์ pectolyase Y-23 แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนน้อยมาก (ตารางที่ 9) ดังนั้นในการทดลองแยกโปรโตพลาสต์ส้มแขกในครั้งต่อไปจึงเลือกใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme

R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรโตพลาสต์พะวา และมังคุด ที่แยกด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 หรือ cellulase Onozuka RS และ pectolyase Y-23 ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบพะวาสูงสุด $4.9x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และให้จำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมังคุดสูงสุด $5.6x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 65.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์ หลังเติมอาหารเหลว

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)			จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)	ความมีชีวิต (%)
CR-10	MR-10	PY-23		
2	1	0	125	91.19
3	1	0	138	57.75
4	1	0	146	62.13
2	1	0.1	0.1	-
3	1	0.1	0.25	-
4	1	0.1	0.45	-

CR-10 = cellulase Onozuka R-10

MR-10 = macerozyme R-10

PY-23 = pectolyase Y23

- = ไม่ตรวจสอบ เพราะจำนวนโปรโตพลาสต์น้อย

ตารางที่ 11 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบพะวาและมังคุดอายุ 7 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)				จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)		ความมีชีวิต (%)
CRS	CR-10	MR-10	PY-23	พะวา	มังคุด	มังคุด
4	-	2	1	-	0.6	44.00
-	1	1	0.1	0*	0.5	73.17
-	2	1	0.1	4.9	5.6	65.63
-	2	1	0.5	0*	แตก, ไม่แยก	0.00
-	2	1	1	0*	แตก, ไม่แยก	0.00

CR-10 = cellulase Onozuka R- 10

CRS = cellulase Onozuka RS

MR-10 = macerozyme R-10

PY-23 = pectolyase Y23

- = ไม่เติม, ไม่ได้ศึกษา

* จำนวนน้อยมาก

5.2 การศึกษาผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก พะวา และมังคุด อายุหลังการเติมอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และหรือ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 40 (สำหรับส้มแขกและพะวา) หรือ 50 รอบต่อนาที (สำหรับมังคุด) ในที่มืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ และความมีชีวิตสูงสุด คือ $1.25x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 91.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใบที่มีอายุมากหรือน้อยกว่านี้ให้จำนวนและความมีชีวิตลดลง ส่วนใบพะวาอายุ 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ และความมีชีวิตสูงสุด คือ $1.1x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 84.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบมังคุดอายุ 12 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $2.7x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 68.12 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามมังคุดอายุใบ 8 สัปดาห์

ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกัน คือ $1.9x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 77.63 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลของอายุใบหลังเติมอาหารเหลวต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ใบส้มแขก พะวา และมังคุด

อายุใบหลังเติมอาหารเหลว (สัปดาห์)	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)			ความมีชีวิต (%)		
	ส้มแขก	พะวา	มังคุด	ส้มแขก	พะวา	มังคุด
4	23.1	1.4	0.3	76.72	79.69	72.97
8	77.0	11.0	1.9	78.11	84.71	77.63
12	125.0	9.4	2.7	91.19	50.00	68.12
16	1.2	-	-	50.83	-	-

- ไม่ได้ศึกษา

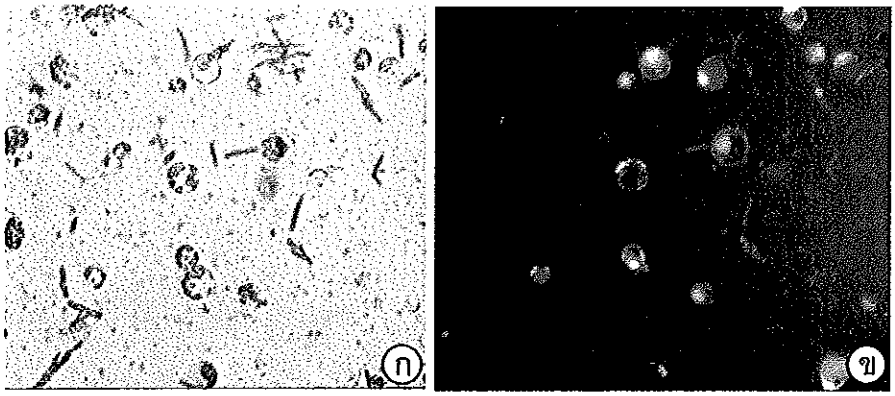
5.3 การศึกษาผลของการเตรียมใบมังคุดที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดจากกลุ่มยอดที่เลี้ยงบนอาหารสองชั้นอายุ 10 สัปดาห์หลังจากเติมอาหารเหลว โดยใช้ใบที่ตัดไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือตัดใบแล้วแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกับใบสด โดยอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า การตัดใบแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.35 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13, ภาพที่ 11)

ตารางที่ 13 การเตรียมใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ของใบอ่อนมังคุด

การเตรียมใบ	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)	ความมีชีวิต (%)
ใบสด	10	80.49
ตัดใบในที่มืด 24 ชม.	100	91.35
ตัดใบแช่ในแมนนิทอล 24 ชม.	น้อยมาก ไม่แยก	-

- ไม่ได้ตรวจสอบ เพราะจำนวนโปรโตพลาสต์น้อย



ภาพที่ 11 โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมังคุดที่ตัดใบไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมงก่อนนำมาแยกด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

(ก) ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยการย้อมสี FDA (x300)

(ข) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเรืองแสงสีเขียวเมื่อย้อมด้วย FDA (x300)

5.4 การศึกษาตำแหน่งใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกจากยอดที่เลี้ยงในอาหารสองชั้นอายุ 4.5 เดือน หลังจากเติมอาหารเหลว โดยใช้ใบคู่ที่ 1, 2 และ 3 นับจากยอด ตัดใบอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ใบคู่ที่ 1 ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 8.07×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 81.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ผลของตำแหน่งใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

ตำแหน่งใบ	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($\times 10^6$)	ความมีชีวิต (%)
ใบคู่ที่ 1	8.07	81.22
ใบคู่ที่ 2	5.61	77.51
ใบคู่ที่ 3	1.93	68.96

เมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบตำแหน่งต่าง ๆ แบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบการแบ่งเซลล์ในแต่ละอายุใบ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบคู่ที่ 1 ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด 4.37 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อต่ำ 1.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลของตำแหน่งใบต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

ตำแหน่งใบ	การแบ่งเซลล์ (%)		การแตกหน่อ (%)	
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์
ใบคู่ที่ 1	5.61	4.37	0	1.49
ใบคู่ที่ 2	0	0	0	0
ใบคู่ที่ 3	4.69	2.04	2.04	3.17

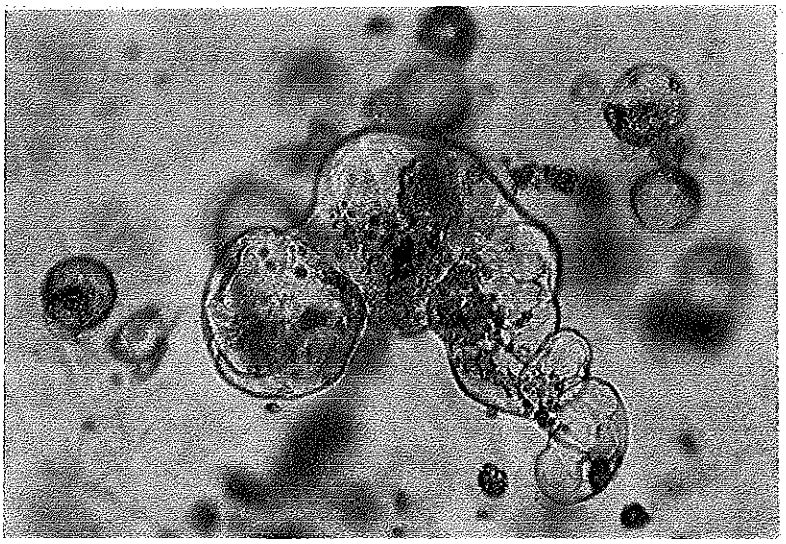
5.5 การศึกษาอายุใบและความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก อายุ 4, 8 และ 12 สัปดาห์ หลังจากเติมอาหารเหลวและเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel 0.2 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ และลดความเข้มข้นของออสโมติคัมทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ ในทุกความหนาแน่นที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบอายุ 12 สัปดาห์ เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $0.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มีการแบ่งเซลล์ที่ปกติสูงสุด 14.51 เปอร์เซ็นต์ การแตกหน่อ 6.76 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงด้วยความหนาแน่นมากกว่านี้การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 16)

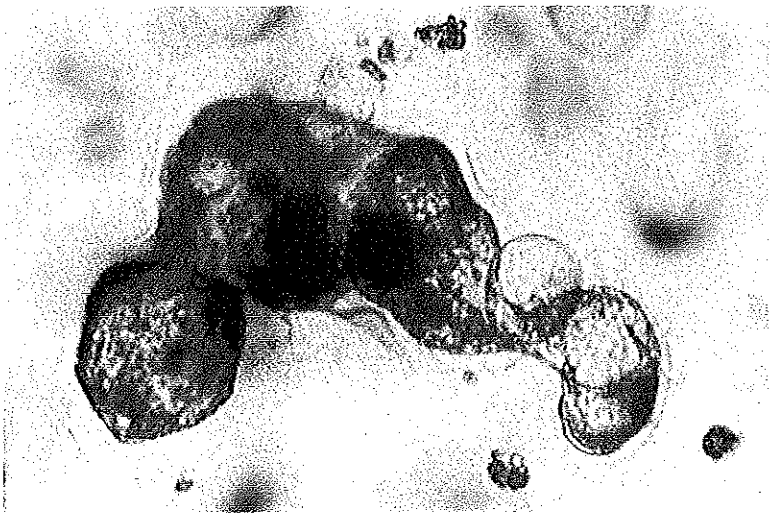
ตารางที่ 16 ผลของอายุใบและความหนาแน่นต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)	อายุใบ (สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว)					
	4		8		12	
	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ
$0.5x10^5$	2.78 ±3.56	6.67 ±9.43	11.72 ±4.53	5.89 ±0.46	14.51 ±1.49	6.76 ±0.59
$1x10^5$	4.14 ±3.18	8.71 ±8.23	10.23 ±5.45	2.67 ±0.25	12.76 ±0.96	11.41 ±1.54
$1.5x10^5$	5.83 ±2.93	3.93 ±3.26	8.66 ±4.45	1.22 ±0.86	9.47 ±0.13	12.34 ±4.56

อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพาสต์จากใบอายุ 4 สัปดาห์ และเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวน 3 เซลล์ที่ยังคงแบ่งเซลล์ครั้งที่สอง และสามารถแบ่งเซลล์ได้สูงสุดประมาณ 8 เซลล์ (ภาพที่ 12) ส่วนโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 12 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $0.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเพียง 1 เซลล์ ที่มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่สองและไม่พบการแบ่งเซลล์ต่อไป (ไม่แสดงข้อมูล) แต่เมื่อลดความเข้มข้นของแมนนิทอล และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ทั้งหมดมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 13) สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป จึงเลือกโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 4 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว และเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 12 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกที่มีอายุ 4 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว และเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x300)



ภาพที่ 13 ลักษณะสีน้ำตาลในโปรโตพลาสต์จากใบที่มีอายุ 4 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว และเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ (x400)

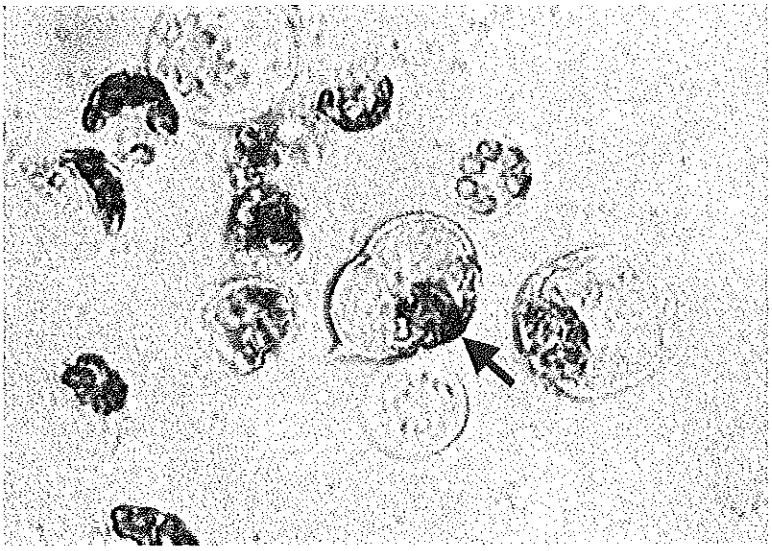
5.6 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์พะวา และมังคุด

จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์พะวาและมังคุดด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ พบว่า โปรโตพลาสต์ของพะวาที่เลี้ยงแบบฝังเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เริ่มรีเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรก 5.56 เปอร์เซ็นต์ แต่โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลานานกว่านี้ พบว่า โปรโตพลาสต์แตกเพิ่มขึ้น ส่วนที่เหลือไม่มีการพัฒนาใด ๆ และตายหมดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนโปรโตพลาสต์มังคุดที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 7.69 เปอร์เซ็นต์ แต่การแบ่งเซลล์ที่ไม่สมมาตร (แตกหน่อ) สูง 4.67 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม

การเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกใกล้เคียงกัน คือ 3.41 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17, ภาพที่ 14) และมีการแตกหน่อต่ำ 2.57 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เหี่ยว เมื่อลดความเข้มข้นของออสโมติคัม เป็น 0.6 โมลาร์ พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เหี่ยวและไม่มีการพัฒนาใด ๆ และตายในที่สุด (ภาพที่ 15)

ตารางที่ 17 ผลของความหนาแน่นต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์มังคุดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
$5x10^4$	4.05	3.43
$1x10^5$	6.55	4.76
$1.5x10^5$	7.69	4.67
$2.5x10^5$	5.72	4.45
$5x10^5$	3.41	2.57
$1x10^6$	2.45	0.00



ภาพที่ 14 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์มังคุด (ศรชี้) ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (600)

ภาพที่ 15 การเหี่ยวของโปรโตพลาสต์มังคุดที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (x300)

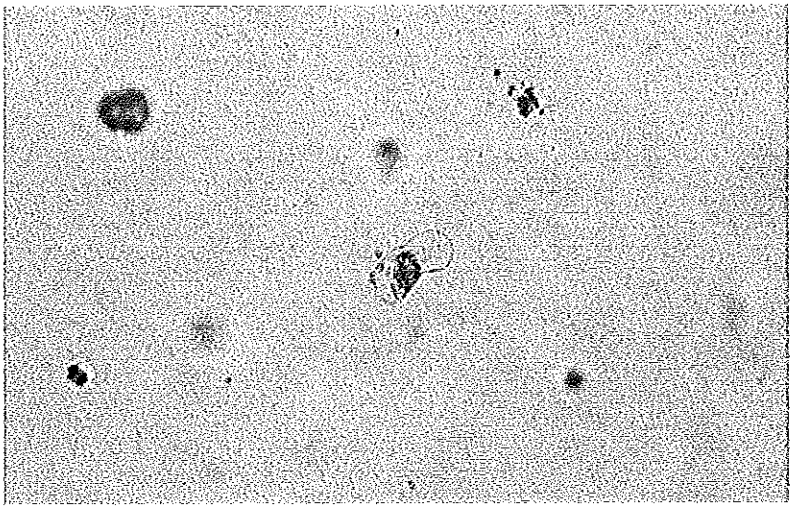
5.7 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด

จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า 2,4-D เข้มข้น เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด 2.5 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ส่วนการเติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้พัฒนาการต่ำสุด และมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อสูงสุด (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ผลของ 2,4-D และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อพัฒนาการของพลาสต์ส้มแขกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		พัฒนาการของโปรโตพลาสต์	
2,4-D	BA	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
0.5	1	2.5	0
1.0	1	2.1	1.6
1.5	1	1.8	2.1
2.0	1	2.3	2.0

อย่างไรก็ตามการแบ่งเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะยาว (ไม่สามารถ) (ภาพที่ 16) และหลังจากเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่า โปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนาต่อไป และมีสีน้ำตาล ตายในที่สุด สำหรับสารควบคุมชนิดอื่น ๆ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด คือแบ่งเซลล์ได้สูงสุด 10 เซลล์ คิดเป็น 2.44 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 19, ภาพที่ 17) อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จึงเติมอาหารเหลวที่มีผงถ่านความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับลดออสโมติคัมของแมนนิทอลลงสัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ สังเกตผลเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนหนึ่งเปลี่ยนเป็นสีเขียวแต่เมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่า ไม่มีการพัฒนาใด ๆ

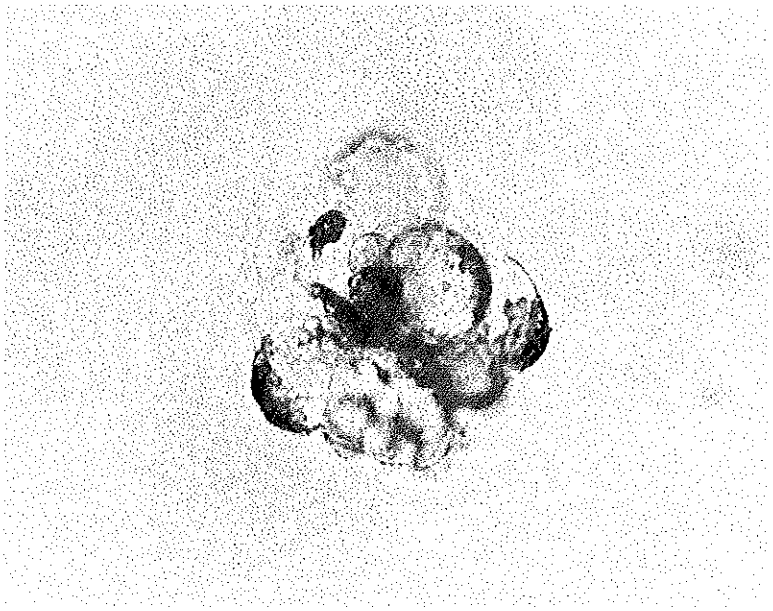


ภาพที่ 16 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (x100)

ตารางที่ 19 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)			การแบ่งเซลล์ (%)					การแตกหน่อ (%)
dicamba	BA	NAA	2 เซลล์	3 เซลล์	4 เซลล์	8 เซลล์	10 เซลล์	
0.5	1.0	0	9.50	-	2.74	3.13	2.44	2.86
0.5	2.0	0	8.80	-	5.05	2.22	-	1.82
0.5	3.0	0	10.38	-	2.29	1.52	-	6.25
1.0	1.0	0	7.14	-	4.54	-	-	4.08
1.0	2.0	0	5.85	2.70	2.59	-	-	4.68
1.0	3.0	0	7.11	-	3.47	-	-	0
0	1.0	0.5	7.25	-	4.55	-	-	0
0	2.0	0.5	5.8	-	2.78	-	-	0
0	3.0	0.5	8.69	-	3.77	-	-	6.48
0	1.0	1.0	11.02	-	3.28	-	-	0
0	2.0	1.0	9.3	-	0	-	-	6.67
0	3.0	1.0	8.82	-	2.83	-	-	3.13

- ไม่ปรากฏการแบ่งเซลล์



ภาพที่ 17 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (x400)

ส่วนโปรโตพลาสต์พะวาเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงต่อไปไม่พบการแบ่งเซลล์ แต่โปรโตพลาสต์แตกและตายหมดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เช่นเดียวกันโปรโตพลาสต์มังคุดที่เลี้ยงในอาหารเหลวด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่า 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้น พบว่า โปรโตพลาสต์แตกและตายหมดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนการเพาะเลี้ยงในสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรก 6.93 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่ NAA ร่วมกับ BA ทุกความเข้มข้น โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยง

ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว เมื่อลดความเข้มข้นของออสโมติคัมเป็น 0.6 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ไม่มีพัฒนาการใด ๆ และตายในที่สุด

5.8 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

หลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกแบบฝังเลี้ยง ในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 หรือ 3 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้างต้นและเติมผงถ่าน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์มีพัฒนาการดีที่สุด (พบเซลล์เริ่มคอด) อย่างไรก็ตามยังไม่พบการแบ่งเซลล์ (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ผลของระยะเวลาในการเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็น 1 และ 2 สัปดาห์

ระยะเวลาที่เติม (สัปดาห์)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์	
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์
1	ส่วนใหญ่แตก, ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ	ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ
2	ส่วนใหญ่แตก, ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ	ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ
3	ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ขึ้น, ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ	บางเซลล์เริ่มคอด แต่ยังไม่พบการแบ่งเซลล์

5.9 การศึกษาความเข้มข้นของ PVP ในอาหารเหลวต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

หลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกแบบฝังเลี้ยงใน อาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้างต้นและเติม PVP เข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สัปดาห์ละ 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังจากเติมเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่า PVP เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตพลาสต์แตกน้อยที่สุด แต่เมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่าไม่มีพัฒนาการใด ๆ การเติม PVP ในอาหารเหลวไม่ส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก

5.10 การศึกษาผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

หลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ K8P เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสูตรควบคุม (สูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร K8P เติม IAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งอาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อของโปรโตพลาสต์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ส่วนอาหารสูตร K8P พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และพบจำนวนเพียง 1 เซลล์ที่แบ่งเซลล์ คิดเป็น 2.56 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร K8P เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ สูตรควบคุม (สูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 2.26 เปอร์เซ็นต์ และการแตกหน่อ 0.15 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 6.25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร K8P โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก และตาย แม้ว่าจะพบการแบ่งเซลล์ 3 เซลล์ในอาหารเติม NAA ความเข้มข้นต่ำ (1 หรือ 2

มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การแตกหน่อสูง และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA และ IAA ไม่ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขก คือ โปรโตพลาสต์แตกตายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 21) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกต่อไปจึงใช้สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 21 ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				พัฒนาการของโปรโตพลาสต์			
NAA	BA	dicamba	IAA	การแบ่งเซลล์ (%)		การแตกหน่อ (%)	
				1 สัปดาห์	3 สัปดาห์	1 สัปดาห์	3 สัปดาห์
		MS					
1	1	-	-	1.01	0.91	0.41	0.94
2	1	-	-	2.30	1.60 (0.27)*	2.30	4.17
3	1	-	-	1.53	1.20	0.27	0.50
4	1	-	-	0.19	1.52	0.95	0.00
-	1	0.5	-	2.26	6.25	0.15	0.00
2	0.1	-	2	0.00	0.00	0.00	0.00
		K8P					
1	1	-	-	0.41	0.23 (0.08)*	0.74	0.23
2	1	-	-	0.74	0.71 (0.14)*	1.19	0.76
3	1	-	-	2.56	ส่วนใหญ่แตก	0.00	0.00
4	1	-	-	0.00	ส่วนใหญ่แตก	4.86	0.00
-	1	0.5	-	-	-	-	-
2	0.1	-	2	-	-	-	-

* แบ่ง 3 เซลล์ (จำนวน 1 เซลล์)

- ไม่เติม ไม่ได้ศึกษา

5.11 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขก

หลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $3x10^5$, $5x10^5$ และ $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับผลการทดลองจากการศึกษาที่ 5.10 (เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด 3.13 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 22) อย่างไรก็ตามพบว่าโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เหี่ยวหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในขณะที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบจำนวน 1 เซลล์ที่แบ่ง 3 เซลล์ คิดเป็น 0.14 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 23, ภาพที่ 18) หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวสูตรเดียวกันและเติมผงถ่านเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือ PVP เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมกับลดออสโมติคัมลงสัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ พบว่า การเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านในโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $3x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์ยังคงมีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวและมีการแบ่งเซลล์ 0.84 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อต่ำสุด 0.28 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะพบการแบ่งเซลล์ 3 เซลล์ในความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และ ความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แต่โปรโตพลาสต์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 22 ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์			
	1 สัปดาห์		2 สัปดาห์	
	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
$1.5x10^5$	2.26	0.15	3.13	0.00
$3x10^5$	0.86	0.23	1.24	0.07
$5x10^5$	1.34	0.30	1.80	0.95
$1x10^6$	2.03	0.73	1.25	0.39

ตารางที่ 23 ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
$1.5x10^5$	6.25	0.00
$3x10^5$	0.68	0.09
$5x10^5$	0.73 (0.14)*	0.94
$1x10^6$	0.88	1.36

* แบ่ง 3 เซลล์ จำนวน 1 เซลล์

ภาพที่ 18 การแบ่งเซลล์ (3 เซลล์) ของโปรโตพลาสต์ส้มแขกที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (x400)

ตารางที่ 24 ผลของการเติมอาหารที่เติมผงถ่าน และ PVP ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (เติมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์)

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์			
	เติม PVP 100 มก./ล.		เติมผงถ่าน 0.1 %	
	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)	การแบ่งเซลล์ (%)	การแตกหน่อ (%)
$1.5x10^5$	ส่วนใหญ่เหี่ยว-ตาย		ส่วนใหญ่เหี่ยว-ตาย	
$3x10^5$	1.60	0.71	0.84	0.28
$5x10^5$	1.15 (0.14)*	0.43	0.76 (0.19)*	0.76
$1x10^6$	1.75 (0.13)*	0.27	1.56	1.56

* แบ่ง 3 เซลล์ จำนวน 1 เซลล์

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การชักนำ friable callus และเมอริสเต็มมาติคโนดูลาร์แคลลัส

รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงหรือการชักนำแคลลัส และพืชต้นใหม่ของพืชในสกุล *Garcinia* มีเฉพาะในมังคุด ในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมาเป็นการชักนำพืชต้นใหม่โดยตรงจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ คือ เมล็ด (Goh *et al.*, 1988; Te-chato and Aengyong, 1988) ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าในหลอดทดลอง (Goh *et al.*, 1988; Te-chato *et al.*, 1992b) และใบนอกหลอดทดลอง (Goh *et al.*, 1990, 1994) ต้นที่ชักนำได้จากกระบวนการดังกล่าวมีจำนวนน้อย ในขณะที่การชักนำพืชต้นใหม่ผ่านเมอริสเต็มมาติคโนดูลาร์แคลลัสสามารถทวีจำนวนต้นให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น (Te-chato and Lim, 1999) เมอริสเต็มมาติคโนดูลาร์แคลลัสที่ชักนำได้ข้างต้นมีลักษณะเป็น compact callus ไม่สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชันเพื่อการปรับปรุงพันธุ์เซลล์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพได้และจนถึงปัจจุบันคงมีเพียงรายงานการชักนำ friable callus ในพืชสกุลนี้บางชนิดโดย สมปอง และชวนพิศ (2543) ในรายงานดังกล่าวเป็นการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดใน อาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ให้แคลลัสที่มีลักษณะเป็น friable callus แต่อาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวไม่เหมาะต่อการดูแลรักษา และการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยเฉพาะอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้นสูง (2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมการเกิดสารประกอบฟีนอลทำให้ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด ในขณะที่การใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสที่มีลักษณะ compact และสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสและดูแลรักษาแคลลัสได้ดีที่สุด แคลลัสดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารชักนำยอด และส่งเสริมการยืดยาวของยอด เช่นเดียวกับรายงานการเพาะเลี้ยงในใบอ่อนสีแดงในหลอดทดลอง (Te-chato *et al.*, 1995a, b, c; Te-chato and Lim, 1999, 2000) นอกจากนี้ สมปอง (2540) รายงานว่าสามารถชักนำ friable callus จากการเพาะเลี้ยงใบในหลอดทดลองของส้มแขก ในอาหารสูตร MS เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ได้ อย่างไรก็ตาม แคลลัสดังกล่าวเพิ่มจำนวนได้ช้า และมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่อจำนวนครั้งการย้ายเลี้ยงนานขึ้น และไม่สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชัน และพืชต้นใหม่ได้ จากการศึกษานี้พบว่า การเพาะเลี้ยงใบมะดัน มะพูด และชะมวง ซึ่งเป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนให้ผลใกล้เคียงกันที่เป็นเช่นนี้เพราะพืชในสกุลนี้มีการสร้างสารประกอบพวกยางจำนวนมากและจากทุกส่วน

สารที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงถูกปลดปล่อยลงอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างหรือเพิ่มปริมาณแคลลัส ดังรายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดโดยสมปอง และชวนพิศ (2543) แม้ว่าจะมีการดัดแปลงการเลี้ยงในที่มืดเพื่อลดการสร้างสารพวกนี้ก็ตาม ในการศึกษานี้เมื่อทำการเปรียบเทียบสภาพการเลี้ยงใบอ่อนมะดัน พบว่า ทั้งการเลี้ยงในที่มีแสงและที่มืดให้การชักนำแคลลัสเหมือนกันและไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงใบชะมวงในที่มืดเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการย้ายเลี้ยงในอาหารและสภาพการเลี้ยงเดียวกัน พบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาได้ อย่างไรก็ตามมีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ ส่วนใบมะพูด พบว่า การเพาะเลี้ยงในที่มืดหรือที่มีแสง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสไม่ต่างกันและส่วนใหญ่ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย Michael และคณะ (1996) รายงานว่า ไม่สามารถชักนำแคลลัสหรือพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบนอกหลอดทดลองของเครนเบอร์รีและบลูเบอร์รีได้สำเร็จ แต่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงใบในหลอดทดลองและพบว่า การเพาะเลี้ยงใบอเมริกันเครนเบอร์รีพันธุ์ Frankin และ Bergman ในที่มีแสง พบการสร้างยอดสูงกว่าการเลี้ยงในสภาพมืด Te-chato และคณะ (1995b) ประสบความสำเร็จในการเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อลดการสร้างสารดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุด พบว่า TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ช่วยลดการสร้างและส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ ในการศึกษาเกี่ยวกับพืชในสกุล *Garcinia* ได้พยายามใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด พบว่า มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด คือ การเติม 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ TU ส่งเสริมการสร้างแคลลัสจากใบอ่อนมะดัน และมะพูด (แต่ตอบสนองสูตรอาหารต่างกัน) ในขณะที่การเติม NAA ร่วมกับ BA ส่งเสริมการสร้างแคลลัสของใบชะมวง ส่วนการเติม TDZ ไม่ส่งเสริมการสร้างแคลลัสของพืชทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ Michael และคณะ (1996) รายงานว่าเพาะเลี้ยงใบอเมริกันเครนเบอร์รีในอาหารสูตรดัดแปลง ของ Anderson เติม TDZ ความเข้มข้นสูง (10 ไมโครโมลาร์) ส่งเสริมการสร้างยอดสูงสุด 18.9 ยอดต่อใบ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่ายับยั้งการยืดยาวของยอด และการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2i-P ส่งเสริมการสร้างยอดของบลูเบอร์รี แต่ความเข้มข้นสูง ๆ ยับยั้งการยืดยาวของยอด Faure และคณะ (1998) รายงานการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบในหลอดทดลองของspearmint และ peppermint ว่าเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม แมนนิทอล เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และเติมออกซินชนิด IBA ความเข้มข้นต่ำ ๆ (1-2 ไมโครโมลาร์) ในที่มืด ส่งเสริมการสร้างแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในที่มีแสงบนอาหารเติม TDZ ส่งเสริมการสร้างตายอดและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ดีที่สุด

จากที่กล่าวแล้วข้างต้นว่าพืชในสกุล *Garcinia* นั้นมังคุดเป็นพืชที่มีความสำคัญและทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายล้านบาทแต่มีข้อจำกัดบางประการในการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน จึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย อย่างไรก็ตาม จากรายงานส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันเพื่อเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ไม่มีเลย แม้ว่าจะชักนำแคลลัสได้แต่มีลักษณะเป็น compact ในการศึกษานี้จึงได้ชักนำ friable callus จากใบอ่อน ซึ่งพบว่า 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเพิ่มปริมาณ และดูแลรักษา friable callus ดีที่สุด เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้น (2.5-50 มิลลกรัมต่อลิตร) พบว่า แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ สมปอง และชวนพิศ (2543) ในการศึกษานี้เมื่อดูแลรักษาแคลลัสในอาหารสูตรดังกล่าวโดยย้ายเลี้ยงทุก 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ 5 เท่าในแต่ละแคลลัส ดังนั้นหากมีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1 ปี สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ในอาหารสูตรดังกล่าวได้ 15,625 แคลลัส หรือ 15,625x1.42 โนดูล เมื่อย้ายแคลลัสจากสูตรนี้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาร์แคลลัส MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามรายงานของ Te-chato และคณะ (1995b) ในที่มีแสงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบแคลลัสที่มีลักษณะเป็นปม (โนดูล) ส่วนแคลลัสที่ไม่สร้างปมยังคงลักษณะร่วนเปราะ และมีสีเหลืองครีมถึงน้ำตาล เมื่อทำการตัดแบ่งย้ายเลี้ยงสามารถเพิ่มจำนวนได้ 12 เท่า ในเวลา 8 สัปดาห์ ดังนั้นหากมีการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1 ปี สามารถเพิ่มปริมาณได้ 2,985,984 แคลลัสหรือ 2,985,984x1.42 โนดูล อย่างไรก็ตามเมื่อทำการย้ายเลี้ยงแคลลัสที่สร้างโนดูล โดยตัดแบ่งให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร แคลลัสส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตาย ทั้งนี้อาจเนื่องขนาดที่ตัดแบ่งมีขนาดเล็กเกินไป หรือเกิดบาดแผลจากการตัดแบ่ง ทำให้มีการสร้างสารประกอบฟีนอลส่งผลให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แคลลัสที่ดูแลโดยทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร ชักนำและดูแลแคลลัส (MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทุก 8 สัปดาห์ จำนวน 10 ครั้ง พบว่า แคลลัสเป็น friable callus 60.40 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสเปลี่ยนเป็น compact callus มีสีเหลืองถึงเขียว 17.99 เปอร์เซ็นต์ และให้แคลลัสสีน้ำตาล 21.30 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงข้อมูล) ขณะนี้กำลังชักนำเซลล์ซัสเพนชันอยู่ คาดว่าในอนาคตสามารถใช้ทั้งแคลลัสที่มีลักษณะ friable และเซลล์ซัสเพนชันเป็นเครื่องมือในการ

ปรับปรุงพันธุ์เซลล์ แล้วชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ตามขั้นตอนที่ได้พัฒนาแล้ว (Te-chato and Lim, 2000)

2. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

2.1 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของส้มแขก มังคุด และพะวา Te-chato (1998) รายงานว่าการแยกโปรโตพลาสต์ใบอ่อนสีแดงของมังคุดในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka RS เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ marcerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $5x10^4$ ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโตพลาสต์สูงกว่า ($5.6x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด) และให้จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบพะวาสูงสุด $4.9x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด มีรายงานการแยกโปรโตพลาสต์ใบอ่อนส้มแขกในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $2.6x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด (Te-chato, 1997) สำหรับการศึกษานี้การใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.5x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 62.13 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกันคือ $1.3x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูงสุด 91.19 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเติมเอนไซม์ pectolyase Y-23 ไม่ส่งเสริมการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก สอดคล้องกับการรายงานของ Te-chato (1997) จากความแตกต่างของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ของพืชทั้งสามชนิดนี้ Te-chato (1998) รายงานว่าเกิดจากความแตกต่างของโครงสร้างใบ คือ ใบมังคุดค่อนข้างเหนียวและมีองค์ประกอบของยางมากทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้ยาก นอกจากนี้ Zhang และคณะ (1998) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนในหลอดทดลอง (ใบที่แตกใหม่ ๆ) ของ *Actinidia eriantha* Benth. ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ marcerozyme R-10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $0.7\text{-}1.8x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด สำหรับไม้เนื้อแข็งชนิดอื่น เช่น *Lycium barbarum* L. Ratushnyak และคณะ (1989) รายงานว่า แยกโปรโตพลาสต์จากใบ

ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ driselase เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส เข้มข้น 0.5 โมลาร์ $CaCl_2$ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อินคิวเบทในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ สูงสุด 10^5 - 10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด นอกจากนี้ในพืชบางชนิดมีการเติมสารแอนติออกซิแด้นท์บางชนิดลงในสารละลายเอนไซม์ เช่น PVP เพื่อลดการสร้างสารประกอบฟีนอลซึ่งมีผลทำให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์ได้รับความเสียหายในระหว่างขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ส่งเสริมการแยกโปรโตพลาสต์ ในพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ (Marchant *et al.*, 1997) แอปเปิ้ล (Perales and Schieder, 1993)

2.2 การเตรียมชิ้นส่วนและอายุชิ้นส่วนพืช

เอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ หลายประการ เช่น การเตรียมใบก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ในการศึกษานี้พบว่าการตัดใบมังคุดไว้ในที่มืดก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 91.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือการแยกจากใบสดในหลอดทดลอง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 80.49 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการตัดใบแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่มีแมนนิทอลเป็นองค์ประกอบ 0.7 โมลาร์ ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดได้เลย ในขณะที่ Marchant และคณะ (1997) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบในหลอดทดลองของกุหลาบ (*Rosa hybrida* L.) พันธุ์ Abraham Darby และพันธุ์ Marie Pavie โดยแช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่มีแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ (CPW 13 M) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาแช่ในเอนไซม์ที่เหมาะสม พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.55x10^6$ และ $1.87x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสดในพันธุ์ Abraham Darby และพันธุ์ Marie Pavie ตามลำดับ สูงกว่าการแยกโดยใช้ใบสดที่ไม่มีการแช่ใบในสารละลายดังกล่าว Webb และคณะ (1994) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนที่ไม่แผ่เต็มที่ของ *Lactuca perennis* โดยนำใบแช่ในสารละลาย CPW13M เพื่อให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซีส เวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วอินคิวเบทด้วยสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมก็สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงกว่าและให้ความมีชีวิตสูงกว่าด้วย โดยทั่วไปแล้วการเก็บใบในที่มืด หรือพลาสโมไลซีสในสารละลาย CPW ในที่มืดเป็นการลดการสังเคราะห์แสงทำให้การสร้างสารสังเคราะห์พวกน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสไปสะสมที่ผนังเซลล์ลดลง ทำให้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น จำนวนโปรโตพลาสต์มีมากด้วย อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ให้ผลดีในกรณีที่ตัดใบเก็บในที่มืด ส่วนการพลาสโมไลซีสให้ผลต่ำทั้งนี้เพราะมังคุด และพืชสกุลนี้มียาง เมื่อจุ่มแช่ ยางออกมาในสารละลาย CPW มากอาจก่อให้เกิดความเครียด อาจส่งผลให้มีการ

สร้างสารมาสะสมที่ผนังเซลล์ จึงทำให้ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เลย ในขณะที่การเก็บใบในที่มืดธรรมดานั้นยางส่วนผนังเซลล์ที่ไหลออกมาสูญหายออกไปจากใบเมื่อนำมาหั่นฝอยและจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์แล้วไม่มีปริมาณน้ำยางผสมในเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์จึงสูง ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้สูงกว่าการแยกจากใบสดมาก ดังนั้นในพืชที่มีการสร้างยางมากหากต้องการแยกโปรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนมากจำเป็นต้องตัดใบเก็บไว้ในที่มืดก่อนนำมาแช่ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้อายุของชิ้นส่วนที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยงด้วย สมปอง (2530) รายงานว่าอายุของใบมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป Marchant และคณะ (1997) รายงานว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนกุหลาบให้จำนวนและความมีชีวิตสูงกว่าใบที่แผ่เต็มที่ Perles และ Schieder (1993) รายงานว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนแอปเปิ้ลหรือใบที่อยู่ในที่มีความเข้มแสงต่ำ (dim light condition) ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงกว่าที่แยกจากใบแผ่เต็มที่และใบจากยอดที่ดูแลภายใต้การให้แสงปกติ เนื่องจากแสงกระตุ้นให้มีการสร้างสารลิกนิน และสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์อื่น ๆ ทำให้ เอนไซม์ย่อยใบได้ยาก ในการศึกษานี้พบว่าแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์หลังจากเติมอาหารเหลว ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.25x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.19 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกันใบมังคุดอายุ 12 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $2.7x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 68.12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ใบอายุ 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกันคือ $1.9x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุด 77.63 เปอร์เซ็นต์ และแยกโปรโตพลาสต์จากใบพะวาอายุ 8 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 84.71 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใบที่มีอายุน้อยหรือมากกว่านี้ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลงทั้งนี้อาจเนื่องจาก ใบที่อายุน้อยเนื้อเยื่อของใบจะนุ่มเนื่องจากยังไม่มีการสะสมสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์มากนักทำให้รอยตัดไม่เรียบ นอกจากนี้องค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีในเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์พวก protease หรือ nuclease ซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ด้วย ทำให้ใบได้รับความเสียหายมากขึ้น ในขณะที่ใบอายุมากมีการสะสมสารประกอบพวก ลิกนิน ซูเบอร์ลิน และคิวติน ที่ผนังเซลล์ซึ่งยากแก่การย่อยด้วยเอนไซม์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมนี้ Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนมีความสามารถในการเจริญเติบโตและพัฒนาการดีกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบแก่หรือใบจากนอกหลอดทดลอง ในการศึกษานี้พบว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มแขกอายุ 4 สัปดาห์หลังเติม

อาหารเหลว ให้พัฒนาการสูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอายุมากกว่านี้ สอดคล้องกับการศึกษาตำแหน่งใบ คือ แยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกจากใบคู่ที่ 1 นับจากยอด ให้จำนวนความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์สูงกว่าใบในตำแหน่งที่ 2 และ 3

2.3 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

Kao และ Michayluk (1975) รายงานว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์มีการแพร่สารเมตาบอไลต์ที่สร้างลงในอาหารเลี้ยงและสารเหล่านี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน Hidano และ Nuzeki (1988) รายงานว่าความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลอยู่ระหว่าง $1x10^5$-$1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร การเพาะเลี้ยงที่หนาแน่นมากเกินไปทำให้โปรโตพลาสต์แก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน ในทางตรงข้ามหากน้อยเกินไปโปรโตพลาสต์ก็ไม่สามารถเจริญได้ สำหรับการศึกษานี้พบว่า เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว ด้วยความหนาแน่น $0.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 14.51 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สอดคล้องกับการรายงานของ Te-chato (1997) ซึ่งรายงานว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงใน Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความหนาแน่นดังกล่าวช่วยส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตพลาสต์เป็นโคโลนีขนาดเล็กหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบอายุ 4 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว และเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ครั้งแรกต่ำกว่า (7.25 เปอร์เซ็นต์) แต่มีจำนวน 3 เซลล์ที่ยังมีการแบ่งเซลล์ต่อไปและให้กลุ่มโคโลนีขนาดเล็ก 7-8 เซลล์ (ไม่แสดงข้อมูล) แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปพร้อมกับการลดออสโมติคัมทุกสัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์เป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด เมื่อความหนาแน่นในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ($3x10^5$-$1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) พบว่า โปรโตพลาสต์ส้มแขกที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด 3.13 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เริ่มเหี่ยวหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในขณะที่ เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบจำนวน 1 เซลล์ที่แบ่ง 3 เซลล์ คิดเป็น 0.14 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและโปรโตพลาสต์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ทั้งนี้อาจเกิดจากความหนาแน่นมากเกินไปซึ่งแต่ละเซลล์มีการปล่อยสารเมตาโบไลต์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์และอาหารไม่เพียงพอต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ในขณะที่โปรโตพลาสต์พะวา

ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 5.56 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงต่อไปไม่พบพัฒนาการใด ๆ โปรโตพลาสต์แตก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ซึ่งอาจเนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม ส่วนโปรโตพลาสต์มังคุดความหนาแน่นในการเลี้ยง $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 7.69 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อสูง 4.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การแบ่งเซลล์ใกล้เคียงกัน 3.41 เปอร์เซ็นต์ และมีการแตกหน่อต่ำ 2.57 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว จนถึงปัจจุบันโปรโตพลาสต์ของส้มแขกสามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาให้กลุ่มโคโลนีขนาดเล็ก Zhang และคณะ (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของ *Actinidia eriantha* ในอาหารเหลวว่าให้ประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์สูงสุด 19.4 เปอร์เซ็นต์ หลังการเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ และสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยไม่เติมอาหารใหม่ ในขณะที่ Dhir และคณะ (1991) ทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบเลี้ยงถั่วเหลืองใน agarose bead ด้วยความหนาแน่น $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สามารถพัฒนาเป็นโคโลนีได้ และชักนำพืชต้นใหม่ได้สำเร็จ จากความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากพืชต่างชนิดกันหรือแหล่งของโปรโตพลาสต์ต่างกันส่งผลให้มีการตอบสนองต่ออาหารหรือการเพาะเลี้ยงต่างกัน

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ซึ่งโดยทั่วไปอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไปแต่ต้องเติมออสโมติคัมเพื่อควบคุมความดันออสโมติคจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ แม้พืชในสกุลเดียวกันก็ยังมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไป จากการศึกษานี้พบว่า โปรโตพลาสต์จากพืชชนิดต่าง ๆ ในสกุลนี้ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน Te-chato (1998) รายงานว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งส่งเสริมการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วยังส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของมังคุดอีกด้วย จากการศึกษานี้พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 3.41 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่ NAA ร่วมกับ BA ไม่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในโปรโตพลาสต์ของมังคุด Peraise และ Scheder (1993)

รายงานว่า การเติม TDZ ร่วมกับ NAA ส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบแอปเปิ้ลสูงกว่า การใช้ BA ร่วมกับ NAA นอกจากนี้ Te-chato (1997) รายงานว่าการเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของใบส้มแขกสูงสุด 34.5 เปอร์เซ็นต์ หลังการเลี้ยงนาน 7 วัน Jullien และคณะ (1998) รายงานว่าการเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (1 ไมโครโมลาร์) ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเป็นแคลลัสของโปรโตพลาสต์สะระแหน่ ส่วนการเติม TDZ ส่งเสริมการสร้างตายอดหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ สำหรับการศึกษานี้พบว่า การเติมออกซินในรูป 2,4-D ร่วมกับ BA ไม่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พะวา และมังคุด คือ โปรโตพลาสต์ส้มแขกส่วนใหญ่มีการแบ่งเซลล์ในลักษณะยาว (ไม่สมมาตร) ในขณะที่โปรโตพลาสต์พะวาและมังคุดแตกเสียหาย ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด สามารถพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็ก (10 เซลล์) หลังจากเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ โดยไม่ต้องลดออสโมติคัม อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่า โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลใน 4 สัปดาห์ การที่โปรโตพลาสต์หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง การแก้ปัญหาดังกล่าวได้หลายวิธี เช่น การไม่เติมแอมโมเนียมอิออนในอาหารเพาะเลี้ยง (Eriksson, 1985 อ้างโดย Kunitake *et al.*, 1995) การเติมอาหารใหม่ (Doughty and Power, 1988 อ้างโดย Kunitake *et al.*, 1995; Ratushnyak *et al.*, 1989; Dhir *et al.*, 1991; Jullien *et al.*, 1998) การเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์ให้สูงขึ้น (Nizeki *et al.*, 1983 อ้างโดย Kunitake *et al.*, 1995; Kouider *et al.*, 1984; Doughty and Power, 1988) นอกจากนี้การเติมสารแอนติออกซิแด้นท์บางชนิด เช่น ผงถ่าน หรือ PVP ส่งเสริมการดูดยึดสารประกอบฟีนอล ปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จะดีขึ้น สารดังกล่าวอาจเติมในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่ง Kunitake และคณะ (1995) รายงานความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ lisianthus (*Eustoma grandiflorum)* โดยเติมผงถ่าน (charcoal block) ในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง พบว่า มีผลยับยั้งการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของโปรโตพลาสต์และสามารถสร้างโคโลนีได้สูงสุด 700 โคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยง การเติม charcoal block ภายหลังการเพาะเลี้ยง 14 วันให้จำนวนลดลง อย่างไรก็ตามการเติมในปริมาณมากเกินไปทำให้ไปดูดซับสารประกอบที่สำคัญในอาหาร เช่น NAA หรือ BA จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยน

เป็นสีน้ำตาลจึงทดลองเติมอาหารเหลวที่มีผงถ่าน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับลดออสโมติคัม ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ โดยเริ่มจากแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ จนถึง 0.5 โมลาร์ แต่ละครั้งที่เติมปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบว่า โปรโตพลาสต์บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเขียวแต่เมื่อเลี้ยงต่อไปไม่มีการพัฒนาใด ๆ ดังนั้นจึงทำการศึกษาระยะเวลาในการเติมผงถ่านหลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกเป็นเวลา 1, 2 หรือ 3 สัปดาห์ พบว่า การเติมอาหารหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก และตายภายใน 2-3 สัปดาห์ แสดงว่าการเติมในช่วงแรกไม่เหมาะสม ส่วนการเติมอาหารหลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์มีขนาดใหญ่ขึ้น บางเซลล์เริ่มคอดแต่ไม่พบการแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปโปรโตพลาสต์แตกตาย ทำนองเดียวกับการใช้ PVP ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10, 50, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมลงในอาหารหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ส่งผลให้โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก และไม่มีการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ หลังจากเติมอาหารเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ (แต่ความเข้มข้น PVP เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตพลาสต์แตกน้อยที่สุด) อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปไม่มีพัฒนาการใด ๆ ดังนั้นการเติม PVP ในอาหารเหลวไม่ส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก หากมีการศึกษาการเติม PVP ต่อไปควรเลือกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยทั่วไปองค์ประกอบในอาหารแต่ละสูตรค่อนข้างใกล้เคียงกันอาจจะมีการดัดแปลงเพื่อความเหมาะสมในพืชบางชนิด Perales และ Schieder (1993) เปรียบเทียบสูตรอาหาร MS หรือ MI ต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบแอปเปิ้ล 7 สายพันธุ์ พบว่า อาหารทั้งสองชนิดให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างกันในแอปเปิ้ลทั้ง 7 สายพันธุ์ Jullien และคณะ (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของสะระแหน่ (*Mentha* x *piperita*) จำนวน 3 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร B5 ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบของไนโตรเจน และฟอสฟอรัสลงครึ่งหนึ่ง (1/2 B5) พบว่าส่งเสริมการแบ่งเซลล์และสามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้สำเร็จ Marchant และคณะ (1997) รายงานว่า เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกุหลาบในอาหารสูตร K8P เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุดสามารถพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดใหญ่ นอกจากนี้การใช้อาหารสูตรดังกล่าวประสบความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Dhir *et al.*, 1991) แอปเปิ้ล (Ding *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามในการศึกษาสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก พบว่า อาหารสูตร MS ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์เร็วกว่าอาหารสูตร K8P (ประมาณ 3 วัน) โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรควบคุมสูตร MS เติม dicamba

เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 6.25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร K8P โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก และตาย แม้ว่าจะพบการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 2 ในอาหารสูตร K8P เติม NAA ความเข้มข้นต่ำ (1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ให้เปอร์เซ็นต์การแตกหน่อสูง ทั้งนี้เนื่องจากอาหารสูตร K8P มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์หรือองค์ประกอบของสารบางชนิดในปริมาณสูงซึ่งอาจจะส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์แอปเปิ้ลหรือถั่วเหลืองแต่ไม่เหมาะสมต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก นอกจากนี้ยัง พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA และ IAA ไม่ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขก ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มแขกต่อไปจึงใช้สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุป

การชักนำ friable callus และโนดูลาร์แคลลัส

1. การเพาะเลี้ยงใบมะดันในที่มีแสง บนอาหารสูตร WPM เติม TU เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 28.57 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองครีม ลักษณะร่วน บริเวณเส้นกลางใบตรงรอยตัด อย่างไรก็ตามไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมะดันบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 1 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด เท่ากันคือ 20 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะ friable callus บริเวณรอยตัดที่ฐานของอับละอองเกสร

2. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบชะมวงในที่มืดบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองครีม ลักษณะร่วน บริเวณรอบรอยตัด สามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่อัตราการเจริญค่อนข้างช้า

3. การเพาะเลี้ยงใบมะพูดในที่มีแสงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่สร้างมีสีเหลือง-น้ำตาล ลักษณะร่วน บริเวณรอยตัดและเส้นกลางใบ

4. การเพาะเลี้ยง friable callus มังคุดบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดแคลลัสเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด 420 มิลลิกรัม ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด 6.7 มิลลิเมตร และจำนวนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้สูงสุด 68.06 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ 5 เท่าต่อแคลลัส และเมื่อย้ายเลี้ยงประมาณ 10 ครั้ง (ย้ายทุก 8 สัปดาห์) แคลลัสสามารถพัฒนาเป็น compact callus ได้ 17.99 เปอร์เซ็นต์

5. การเพาะเลี้ยง friable callus มังคุดบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แคลลัสมีการสร้างโนดูลเฉลี่ย 22.22 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเฉลี่ย 1.42 โนดูลต่อแคลลัส

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

6. สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขก คือ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.25x10^{7}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 91.19 เปอร์เซ็นต์

7. สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบพะวา และมังคุด คือ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใบพะวาสูงสุด $4.9x10^{5}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และให้จำนวน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบมังคุดสูงสุด $5.6x10^{5}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 65.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเตรียมใบมังคุดโดยตัดใบและเก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1x10^{6}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.35 เปอร์เซ็นต์

8. แยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 12 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ และความมีชีวิตสูงสุด คือ $1.25x10^{7}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 91.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบพะวาอายุ 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ และความมีชีวิตสูงสุด คือ $1.1x10^{6}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 84.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบมังคุดอายุใบ 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.9x10^{5}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 77.63 เปอร์เซ็นต์

9. การแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกคู่ที่ 1 จากปลายยอด ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ $8.07x10^{6}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 81.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยง มีการพัฒนาการดีกว่าใบคู่ที่ 2 และ3

10. การเพาะเลี้ยงเลี้ยงโปรโตพาสต์ส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1.5x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด คือแบ่งเซลล์ได้สูงสุด 10 เซลล์ คิดเป็น 2.44 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 สัปดาห์ ส่วนโปรโตพลาสต์จากใบพะวา เลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรก 5.56 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดในอาหารเหลว สูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $5x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 6.93 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

11. การเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านในโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่งเสริมพัฒนาการโปรโตพลาสต์ ดีที่สุด (พบเซลล์เริ่มคอด) อย่างไรก็ตามยังไม่พบการแบ่งเซลล์ ส่วนการเติม PVP ในอาหารเหลวไม่ส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขก หากมีการศึกษาต่อไปก็เลือกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากโปรโตพลาสต์แตกน้อยที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตร. 2540. แผนพัฒนามังคุด. แผนพัฒนาพืช 2 ในช่วงแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 8 พ.ศ. 2540-2544.

ธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2533. การขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มงคล แซ่หลิม, สายัณห์ สดุดี, สมปอง เตชะโต, พิมพรรณ ตันสกุล และอรุณี ม่วงแก้วงาม. 2533. การหาพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับทำต้นตอมังคุดเพื่อให้ได้ในที่แห้งแล้งและความอุดมสมบูรณ์ต่ำในภาคใต้. รายงานการวิจัย. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ราตรี สุจารีย์ และ สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มแขก. แก่นเกษตร 24 : 14-22.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, ยุคลธร สถาปนศิริ, สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุมน มาสุธน. 2543. AFLP Markers สำหรับการตรวจสอบชนิดของพืชสกุล *Garcinia*. รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา ระหว่างวันที่ 6-8 ตุลาคม 2542. หน้า 62-66.

สมปอง เตชะโต. 2530. การพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอในแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของใบถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7. ว. สงขลานครินทร์ 9 : 153-158.

สมปอง เตชะโต. 2536. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) พะวา (*Garcinia speciosa* Wall.) และส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.). ว. สงขลานครินทร์ วทท. 19 : 147-156.

สมปอง เตชะโต และชวนพิศ นิยะกิจ. 2543. ผลของอายุผลและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสในพืชสกุล *Garcinia*. เกษตร 16 : 31-45.

Anderson, W. C. 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture. Part I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25 : 129-134.

Dhir, S. K., S. Dhir and J. M. Widholm. 1991. Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). Plant Cell Reports 10 : 39-43.

Ding, A. P., H. F. Wang and Y. F. Chao. 1995. Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. Starkrimson). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40 : 145-149.

Driver, A. and A. H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19 : 507-509.

Evans, D. A. and J. F. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture. *In* Handbook of Plant Cell Culture (eds. D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada) Vol. 1, pp. 124-176. New York : Macmillan Publishing Company .

Faure, O., F. Diemer, S. Moja and F. Jullien. 1998. Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52 : 209-212.

Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50 : 151-158.

Goh, H. K. L., A. N. Rao and C. S. Loh. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*G. mangostana* L.). Annals of Botany 62 : 87-93.

Goh, H. K. L., A. N. Rao and C. S. Loh. 1990. Direct shoot bud formation from leaf explant of seedlings and mature mangosteen (*G. mangostana* L.) trees. Plant Science 68 : 113-121.

Goh, C. J., P. Lakshmaman and C. S. Loh. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from exised leaves of mangosteen (*G. mangostana* L.). Plant Science 101 : 173-180.

Grosser, J. W., F. G. Gmitter, Jr. E. S. Louzada and J. L. Chandler. 1992. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. HortScience 27 : 1125-1127.

Hammatt, N. and N. J. Grant. 1998. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *Prunus avium* L. (wild cherry). Plant Cell Reports 17 : 526-530.

Hidano, Y. and M. Nuzeki. 1988. Protoplast culture of deciduous fruit trees. Scientia Horticulturae 37 : 301-306.

Huetteman, C. A. and J. E. Preece. 1993. Thidiazuron : A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 :105-119.

Jullien, F., F. Diemer, M. Colson and O. Faure. 1998. An optimising protocal for protoplast regeneration of three peppermint cultivars (*Mentha x piperita*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54 :153-159.

Jumin, H. B. and N. Nito. 1995. Embryogenic protoplast culture of orange jessamine (*Murraya puniculata*) and their regeneration into plants flowering *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41 : 277-279.

Kao, K. N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana*. Molec. Gen. Genet. 150 : 225-230.

Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1974. A methode for higher frequency intergeneric fusion of plant protoplast. Planta 15 :355-367.

Kunitake, H., T. Nakashima, K. Mori, M. Tanaka and M. Mii. 1995. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) by adding activated charcoal into protoplasts culture medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43 : 59-65.

Li, L. and H. W. Kohlenbach. 1982. Somatic embryogenesis in quite a direct way in cultures of mesophyll protoplasts of *Brassica napus* L. Plant Cell Reports 1 : 209-211.

Li, X. H., Q. S. Yan and Y. R. Sun. 1981. A wide-ranging medium for protoplasts. Annual report, Institute of Genetic, the Academy of Science of China : 77-78.

Louzada, E. S., J. W. Grosser, F. G. Gmitter, Jr. B. Nielsen and J. L. Chandler. 1992. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. HortScience 27 : 1033-1036.

Marchant, R., M. R. Davey and J. B. Power. 1997. Isolation and culture of mesophyll protoplast from *Rosa hybrida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50 : 131-134.

McCown, B. H. And G. Lloyd. 1981. Woody plant medium (WPM) - A mineral formation for microculture of woody plant species. HortScience 16 : 453. (Abtract)

Michael, M., S. P. McGlew, G. Hackett and B. Chawla. 1996. Shoot regeneration from tissue-culture leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44 : 195-199.

Mills, D. and F. A. Hammerschlag. 1994. Isolation of cells and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 99-105.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. Lst. Citrus Symp. 3 : 1155-1161.

Normah, M. N. 1992. Micropropagation of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) through callus and multiple shoot formation. *In* Biotechnology for Forest Tree mprovement. (eds. R. C. Ummaly, I. Umboh, S. S. Tjitrosomo and M. N. Normah) pp. 81-86, Borgor : Seameo Biotrop.

Othman, Y. and H.D. Tindall. 1995. Mangosteen Cultivation. Rome : FAO Plant Production and Protection Division.

Perales, E. H. and O. Schieder. 1993. Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 71-76.

Ratushnyak, Y. I., N. M. Piven and V. A. Rudas. 1989. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17 : 183-190.

Saito, A. and M. Suzuki. 1999. Plant regeneration from meristem-derived callus protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. Fuji). Plant Cell Reports 19 : 549-553.

Te-chato, S. 1997. Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony. Songklanarin J. Sci. Technol. 19 : 255-262.

Te-chato, S. 1998. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20 :15-20.

Te-chato, S. and W. Aengyong. 1988. Microplant propagation of mangosteen (*G. mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 10 : 1-7.

Te-chato, S. and M. Lim. 1999. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59 : 89-93.

Te-chato, S. and M. Lim. 2000. Improvement of micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. Scientia Horticulturae. 86 : 291-298.

Te-chato, S., M. Lim and P. Suranilpong. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*G. mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 115-120.

Te-chato, S., M. Lim and P. Suranilpong. 1995b. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 129-135.

Te-chato, S., M. Lim and P. Suranilpong. 1995c. Type of medium and cytokinin in relation with purple leaf and callus formation in mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 121-127.

Theodoropoulos, P. A. and K. A. Roubelakis-Angelakis. 1990. Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20 : 15-23.

Webb, C. L., M. R. Davey, J. A. Lucas and J. B. Power. 1994. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Lactuca perennis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38 : 77-79.

Zhang, Y. J., Y. Q. Qian, X. J. Mu, Q. G. Cai, Y. L. Zhou and X. P. Wei. 1998. Plant regeneration from *in vitro*-culture seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. Plant Cell Reports 17 : 819-821.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก องค์ประกอบของอาหารสูตร MS และ WPM

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	K8P	WPM
1. ธาตุอาหารหลัก			
NH_4NO_3	1,650.00	600.00	400.00
KNO_3	1900.00	1900.00	-
KH_2PO_4	170.00	170.00	170.00
$CaCl_2$1H2O	-	-	96.00
$Ca(NO_3)_2$4H_2O	-	-	556.00
$CaCl_2$2H_2O	440.00	600.00	-
$MgSO_4$7H_2O	370.00	300.00	-
2. ธาตุอาหารรอง			
KI	0.83	0.75	-
KCl	-	300.00	-
H_3BO_3	6.20	3.00	6.20
K_2SO_4	-	-	990.00
$MnSO_4$1H_2O	16.90	10.00	16.90
$ZnSO_4$7H_2O	10.60	2.00	8.60
$CuSO_4$5H_2O	0.025	0.025	6.25
$NaMoO_4$ 2H_2O	0.25	0.25	0.25
$CoCl_2$6H_2C	0.025	0.025	-
3. ธาตุเหล็ก			
$FeSO_4$7H_2O	27.80	27.80	27.80
Na_2EDTA	37.30	-	37.30
Sequestrene 330 Fe*	-	28.00	-

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	K8P	WPM
4. สารอินทรีย์			
Myo-inositol	100.00	100.00	104.10
PyridoxineHCL	0.50	2.00	0.50
ThiamineHCl	0.10	2.00	6.00
Glycine	2.00	2.00	2.00
Ascorbic acid	-	2.00	-
Biotin	-	0.1	-
L-Asparagine	-	20.00	-
L-Glutamine	-	40.00	-
Lactalbumin hydrolysate	-	100.00	-
Sucrose	30,000.00	30,000.00	30,000.00

pH 5.7

*ในการศึกษาใช้ $FeSO_4 7H_2O$ แทน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

วัน เดือน ปี เกิด 30 มกราคม 2518

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540