การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศ (*Chrysanthemum indicum* Linn.)

Tissue and protoplast culture of chrysanthemum (*Chrysanthemum indicum* Linn.)

สุชดา คงทน

Suchada Khongthon

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2544

ก
เลขหมู่ QK725 ส72 2544 ฉ.2
Bib Key ม11749

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศ (*Chrysanthemum indicum* Linn.)
ผู้เขียน	นางสาวสุชดา คงทน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อารักษ์ จันทศิลป์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศ (*Chrysanthemum indicum* Linn.)
ผู้เขียน	นางสาวสุชดา คงทน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

จากการนำเมล็ดเบญจมาศมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรอกซ์ 20 % เป็นเวลา 20 นาที มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 98% นำต้นที่ได้มาชักนำยอดรวมในอาหารสูตร MS ที่มี BA (N^6-benzyladenine) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ชิ้นส่วน ใบ ข้อ และปลายยอดจากต้นที่เพาะเลี้ยง พบว่าชิ้นส่วนของข้อและปลายยอดสามารถชักนำยอดรวมได้ แต่ชิ้นส่วนปลายยอดสามารถชักนำยอดได้ดีกว่า จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนปลายยอดไปเพิ่มจำนวนยอดรวมในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าที่ความเข้มข้นของ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้มากที่สุด คือ 8.32 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช นำยอดรวมที่ได้มาชักนำให้เกิดรากในสูตรอาหาร MS, half MS และสูตร MS ที่มีออกซินชนิดต่าง ๆ ซึ่ง คือ NAA (α-naphthaleneacetic acid), IAA (Indoleacetic acid) และ IBA (Indolebutyric acid) พบว่าในอาหารสูตร MS ที่มี NAA สามารถชักนำรากได้ดีที่สุด และได้รากที่มีลักษณะอวบและสมบูรณ์ จากนั้นจึงหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากในอาหารที่มี NAA 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ดี คือมีจำนวน 5.68 รากต่อต้น และได้รากที่มีลักษณะสมบูรณ์กว่าสูตรอื่น ๆ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 87.5% เมื่อนำต้นสมบูรณ์ที่ได้ลงปลูกในดินจะพบว่ามีอัตรารอดชีวิต 100% เมื่อเพาะเลี้ยงต้นเบญจมาศเป็นระยะเวลา 4-5 เดือน ก็จะออกดอก ซึ่งดอกที่ได้จะมีลักษณะเหมือนกับในธรรมชาติ

นำใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำการแยกโพรโทพลาสต์ในชนิดของเอนไซม์และความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าที่ความเข้มข้นของ เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์ 10 (Cellulase Onozuka

R-10) 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส (Driselase) 0.5% และมาเซอโรไซม์ อาร์ 10 (Macerozyme R-10) 0.5% ใช้สารละลายแมนนิทอล 0.6 M เป็นสารละลายปรับแรงดันออสโมติก โดยใช้น้ำหนักใบ 0.40 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้มากที่สุด คือ $2.32x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเวลาที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์คือ ที่ 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าใบที่เก็บในที่มืดก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์หรือใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืดก่อนการแยก ให้จำนวนโพรโทพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ นำโพรโทพลาสต์ที่ได้ไปย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตดเพื่อตรวจสอบความมีชีวิต พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุดคือ 87.8% เมื่อนำโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ไปเพาะลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเปรียบเทียบกันในสภาพมืด พบว่า โพรโทพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ได้ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด และสูตรอาหารที่มีการสร้างผนังเซลล์ได้ดีที่สุดคือ สูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 2% โดยใช้สารละลายแมนนิทอล 0.6 M เป็นสารละลายปรับแรงดันออสโมติก เมื่อลดความเข้มข้นของสารละลายปรับแรงดันออสโมติกลงทีละ 0.1 M ทุกวัน จนกระทั่งถึง 0.3 M พบว่ามีการแบ่งเซลล์ได้ 25.18% หลังจากการเพาะเลี้ยง 24-48 ชั่วโมง

Thesis Title	Tissue and protoplast culture of chrysanthemum (*Chrysanthemum indicum* Linn.)
Author	Miss Suchada Khongthon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2000

Abstract

The seeds of chrysanthemum (*Chrysanthemum indicum* Linn.) were surface sterilized in 20% Clorox for 20 minutes and cultured on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) without growth regulators for 4 weeks. It was found that seeds germinated and gave 98% uncontamination. Shoot tips, leaves and nodes of *in vitro* grown *Chrysanthemum indicum* Linn. were excised and cultured on MS medium supplemented with 2 mgl^{-1}BA (N^6-benzyladenine). Multiple shoots were initiated from node and shoot tip explants. Shoot proliferation from shoot tips was better than node explants. Therefore shoot tips were used as source of explants for further experiment and incubated on MS medium containing 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mgl^{-1}BA for 4 weeks. BA at 3.0 mgl^{-1} was found to be the optimum concentration for the induction of multiple shoots and gave the highest number of 8.32 shoot per explant. To promote rooting, medium supplemented with either NAA (α-naphthaleneacetic acid), IAA (indoleacetic acid) or IBA (indolebutyric acid) were tested. Roots were induced on MS medium supplemented with 1 mgl^{-1} NAA and gave 5.68 roots per shoot explant. The percentage of rooting was 87.5%. In addition, NAA containing medium produced thick and healthy root. Rooted shoots were acclimatized and successfully transplanted to soil. The percentage of survival was 100%.

Protoplasts were isolated from young leaves of these plantlets. Leaves (0.4 g) were digested with 5 ml of enzyme solution containing 2.5% (w/v) Cellulase Onozuka R- 10, 0.5% (w/v) Driselase, 0.5 % (w/v) Macerozyme R-10 in 0.6 M mannitol. The average yield of

isolated protoplasts was 2.32 x 10^5 per millilitre. Protoplasts could be released with no significant differences under both dark and light regimes. The viability of protoplast as assessed by fluoresescein diacetate was 87.5% at 3 hours. The culture of isolated protoplasts was investigated according to different methods namely liquid culture and semi-solid culture. The results revealed that cell wall regeneration was clearly visible on semi-solid MS medium supplemented with 1 mgl^{-1} NAA, 0.1 mgl^{-1} 2, 4 –D (2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid), 0.6 mgl^{-1} BA and 2% coconut water under dark condition. Cell division was observed during 24-48 hours after the osmotic pressure of the medium was gradually reduced at 0.1 M interval everyday from 0.6 M to 0.3 M. The percentage of dividing cell was 25.18%.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ก็ด้วยความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ทั้งในด้านการเรียน การวิจัย การเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยในการจัดหาเอกสารประกอบการวิจัยเป็นจำนวนมาก รวมทั้งช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ อย่างใกล้ชิด และเอาใจใส่เป็นอย่างดี ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการที่ปรึกษา และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อารักษ์ จันทศิลป์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจที่สำคัญ ขอขอบคุณ คุณธีร ศรีสวัสดิ์ ที่ช่วยเหลือในเรื่องการถ่ายภาพ พี่น้องและเพื่อนนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช ภาควิชาชีววิทยา ทุกคน และคุณสุระพงษ์ ยงยืน ที่ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ

สุชดา คงทน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	18
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	19
3. ผล	27
4. วิจารณ์	48
5. สรุป	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	65
ประวัติผู้เขียน	72

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. จำนวนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ข้อ และปลายยอด ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 27
2. ผลของ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดรวม ในเวลา 4 สัปดาห์ 29
3. ผลของชนิดอาหารและออกซินต่อการชักนำราก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 3 สัปดาห์ในสูตรอาหารต่าง ๆ 31
4. ผลของ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชักนำรากเป็น ระยะเวลา 3 สัปดาห์ 33
5. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเบญจมาศเมื่อย้ายไปปลูกในดิน 35
6. ผลของชนิดเอนไซม์และเวลาในการอินคูเบทต่อจำนวนโพรโทพลาสต์ 39
7. น้ำหนักใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส 0.5% และ มาเซอโรไซม์ 0.5% ที่เวลา 3 ชั่วโมง 40
8. ผลของการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้ใบที่เก็บในที่มืดและไม่ได้เก็บในที่มืด ในเอนไซม์เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับ ไดรซีเลส 0.5%และ มาเซอโรไซม์ 0.5% ที่เวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้น้ำหนักใบ 0.4 กรัมน้ำหนักสด 41
9. ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับ ไดรซีเลส 0.5%และมาเซอโรไซม์ 0.5% ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง 43
10. ผลของสูตรอาหารต่างๆ ในการสร้างผนังเซลล์ของเบญจมาศ 44
11. สูตรอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแบ่งเซลล์ 46

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ต้นเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุม การเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 28
2. เปรียบเทียบการเกิดจำนวนยอดรวมของชิ้นส่วนใบ(A) ข้อ(B) และปลายยอด(C) ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 28
3. จำนวนยอดรวมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) และ BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 30
4. การชักนำรากในอาหารสูตรต่าง ๆ คือ อาหารสูตร MS (A) อาหารสูตร half MS (B) อาหาร สูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร(C) อาหารสูตร MS ที่มี IAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) และ อาหารสูตร MS ที่มี IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (E) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ 32
5. การชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) และ NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ 34
6. ต้นเบญจมาศเมื่อนำมาปรับสภาพในเวอร์มิคูไลต์ 36
7. ต้นเบญจมาศที่ย้ายมาปลูกในดิน 36
8. ต้นเบญจมาศหลังจากย้ายปลูกในดินเป็นเวลา 4-5 เดือน 37
9. ดอกเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อหลังจากย้ายไปปลูกในดินเป็นเวลา 4-5 เดือน 37
10. ลักษณะโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส 0.5% และ มาเซอโรไซม์ 0.5% ที่เวลา 3 ชั่วโมง ใช้น้ำหนักใบ 0.4 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 5.0 มิลลิลิตร ได้แก่ โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เต็มเซลล์ (A) โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (B) โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เรียงชิดกับผนังเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง (C) และโพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์น้อย (D) 42

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

11. (A) โพรโทพลาสต์ที่ตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด
(B) โพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟอร์ไวท์
(C) โพรโทพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์
(D) โพรโทพลาสต์ที่มีการแตกหน่อเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี ซูโครส 3% 47

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	N^6-benzyladinine
CFW	=	Calcofluor white
C.V.	=	Coefficient of Variation
CW	=	Coconut water
DMRT	=	Duncan's Multiple Range Test
FDA	=	Fluorescein diacetate
IAA	=	Indoleacetic acid
IBA	=	Indolebutyric acid
M	=	Molar
MS	=	Murashige and Skoog
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เบญจมาศเป็นไม้ดอกที่มีผู้นิยมปลูกกันมากในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศในกลุ่มยุโรป และอเมริกา เนื่องจากทำรายได้ให้กับผู้ปลูกเลี้ยงได้เป็นอย่างดี และมีความสำคัญเป็นอันดับ 2 รองจากกุหลาบ เนื่องจากรูปทรงที่มีหลายขนาดหลายรูปแบบและหลากสีสันสวยงาม มีอายุการปักแจกันไม่ต่ำกว่า 7 วัน การปลูกเบญจมาศส่วนใหญ่เป็นการปลูกในรูปของไม้ตัดดอก (cut flower) อย่างไรก็ตาม เบญจมาศยังสามารถปลูกเป็นไม้กระถาง (pot plants) ได้ด้วย (วัลลภ พรหมทอง, 2541) สำหรับประเทศไทยได้มีการนำเข้าพันธุ์เบญจมาศมาจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อปลูกทั้งจากประเทศสหรัฐอเมริกา เนเธอแลนด์ ไต้หวัน และญี่ปุ่น โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะหาพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย (ปัจฉิมา สมิตมาน และคณะ, 2532) ซึ่งมีหลายประเภทคือ Summer Chrysanthemum, Winter Chrysanthemum และJuly-August Chrysanthemum ทำให้ได้พันธุ์ที่ปลูกให้ออกดอกตลอดทั้งปี พันธุ์ที่ปลูกเฉพาะในฤดูหนาวและรวมทั้งพันธุ์ที่ปลูกแล้วออกดอกเฉพาะในฤดูฝน ซึ่งมีสีแปลก ๆ นอกจากสีเหลืองและขาว คือมีทั้งพันธุ์สีแดง สีกลีบบัว สีม่วงอ่อนและสีน้ำตาล เป็นต้น (สมเพียร เกษมทรัพย์, 2534) เบญจมาศสามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยวิธีการตัดยอดหรือหน่อ มาปักชำ ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ช่วยให้การเกิดแพร่ระบาดของเชื้อต่าง ๆ ได้ เช่น ราและแบคทีเรีย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนับเป็นวิธีการที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์พืชได้เป็นจำนวนมากและปลอดเชื้อรวมไปถึงการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ ซึ่งโพรโทพลาสต์สามารถแยกได้จากชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ลำต้น ราก โดยใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) จากนั้นนำโพรโทพลาสต์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมก็จะมีการพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนี ซึ่งสามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นพืชขึ้นมาใหม่ได้ (Blackhall *et al.*, 1994)

ปัจจุบันการปลูกเบญจมาศในประเทศไทยได้รับการพัฒนาไปเป็นอย่างมาก ทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมรวมถึงการปรับปรุงพันธุ์โดยเฉพาะทางด้านการเพาะเลี้ยง

โพรโทพลาสต์ซึ่งจะทำให้ได้พันธุ์ใหม่ โดยการทำให้โพรโทพลาสต์ต่างชนิดกันรวมกัน (protoplast fusion) นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาใช้กับโพรโทพลาสต์ อีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้นอกจากจะศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วยังศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์รวมทั้งการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศ ซึ่งเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึง การขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เบญจมาศอยู่ในวงศ์ Compositae มีชื่อสามัญว่า Chrysanthemum ซึ่งมาจากภาษากรีก คำว่า "Chryos" แปลว่า สีทองหรือสีเหลือง (gold) และ "Authemum" แปลว่า ดอกไม้ ฉะนั้น Chrysanthemum จึงมีความหมายว่า "ดอกไม้สีเหลือง" ทั้งนี้เนื่องจากครั้งแรกที่พบเบญจมาศนั้นพบเพียง 2 ชนิด (spcies) คือ *Chrysanthemum indicum* และ *Chrysanthemum chinensis* ซึ่งมีดอกสีเหลืองทั้งคู่ ต่อมาภายหลังจึงพบ *Chrysanthemum morifolium* ในประเทศจีน เบญจมาศชนิดนี้มีความแข็งแรงและทนทานกว่า *Chrysanthemum indicum* (สมเพียร เกษมทรัพย์, 2534)

การจำแนกลักษณะของดอกเบญจมาศ

ลักษณะของดอกเบญจมาศ ซึ่งแบ่งโดย "National Chrysanthemum Society" จำแนกออกเป็น 12 กลุ่ม (สุเม อรัญนารถ, 2533) ดังนี้ คือ

1. Irregular incurve ดอกมีขนาดใหญ่ ความกว้างความสูงของดอกมีขนาดใกล้เคียงกัน กลีบดอกย่อยวงนอกกว้าง และโค้งงุ้มเข้าหาใจกลางดอกอย่างมีระเบียบ และสวยงาม กลีบดอกย่อยวงนอกเรียงแบบหลวม ๆ และห้อยลงมาด้านล่าง

2. Regular incurve ลักษณะดอกคล้ายแบบ Irregular incurve เพียงแต่กลีบดอกวงนอกมีลักษณะตั้งแต่แคบถึงกว้าง กลีบดอกย่อยวงนอกจัดเป็นระเบียบและไม่ห้อยลงด้านล่าง

3. Intermediate incurve กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก มีขนาดแคบจนถึงกว้างคล้ายกับ Regular แต่ขนาดจะสั้นกว่าและกลีบดอกโค้งเข้า เฉพาะส่วนปลายกลีบเท่านั้น

4. Decorative ดอกมีขนาดตั้งแต่ดอกใหญ่ถึงขนาดดอกเล็ก กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก สั้นและกว้างกว่าประเภท incurve กลีบดอกวงนอกมักห้อยลงมาด้านปลายกลีบ แต่กลีบดอกวงในโค้งเข้า จึงทำให้รูปทรงของดอกแบน

5. Reflex กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกขนาดตั้งแต่แคบจนถึงกว้างและยาวคล้ายแบบ incurve แต่แทนที่กลีบดอกจะงุ้มเข้าหาใจกลางดอก กลับห้อยลงด้านล่างใน

6. Pompon กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกสั้นกว้าง และโค้งเข้าหาใจกลางดอกทั้งแบบที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ เมื่อดอกบานจะไม่เห็นดอกย่อยวงใน จึงทำให้ดอกมีลักษณะกลมนูนสวยงาม

7. Single กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก มีเพียง 1-5 ชั้นเท่านั้นและเรียงตัวทำมุมฉากกับก้านดอก กลีบดอกของดอกย่อยวงในไม่พัฒนา แต่รวมกันเป็นกระจุกตรงใจกลางดอก

8. Anemone มีการจัดเรียงตัวของกลีบดอกย่อยวงนอกและวงใน คล้ายกับ Single และรวมตัวกันเป็นกระจุกเห็นเด่นชัด

9. Spoon กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก เป็นหลอดและตรง แต่ปลายกลีบจะคลี่แผ่ออกทำให้มองดูคล้ายช้อน การเรียงตัวเป็นระเบียบ ขนาดใกล้เคียงกัน กลีบย่อยวงในไม่พัฒนารวมตัวกันเป็นกระจุก ตรงกลางดอก

10. Spider กลีบดอกของดอกย่อยวงนอก รอบนอก ๆ ยาวมากและเป็นหลอดขนาดเล็กห้อยลงมาด้านล่าง ส่วนรอบในมีขนาดสั้นบ้างยาวบ้าง ปลายกลีบดอกม้วนงอแบบคอดกลมหรือเป็นตะขอก็ได้

11. Quill กลีบดอกของดอกย่อยวงนอกเป็นหลอดตรงและสั้นกว่าแบบ Spider ปลายกลีบดอกเปิดออกเป็นรูกลวง

12. Brush & Thistle ดอกมีขนาดเล็กกลีบดอกของดอกย่อยวงนอกเป็นแบบหลอดขนาดเล็ก การจัดเรียงตัวของกลีบดอก ตั้งตรงขนานกับก้านดอก

2. พันธุ์เบญจมาศ

เบญจมาศสำหรับปลูกเป็นไม้ตัดดอกมีหลายพันธุ์ด้วยกันที่คัดเลือกจากบริษัท Yoder ของสหรัฐอเมริกา พันธุ์ที่ดีที่สุด (สมเพียร เกษมทรัพย์, 2534) ได้แก่

1. Golden Mefo ดอกมีสีเหลืองเข้มขนาดดอกใหญ่ กลีบดอกงุ้มเข้าหาใจกลางของดอก ฟอร์มสวย การจัดเรียงของกลีบดอกเป็นไปอย่างมีระเบียบ กลีบดอกมันเป็นเงาลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง ดูสวยงามมาก อีกทั้งก้านดอกยาวเหมาะเป็นไม้ตัดดอกอย่างยิ่ง

2. Mrs. Roy ดอกมีขนาดใหญ่และใหญ่กว่าพันธุ์ Golden Mefo กลีบดอกงุ้มเข้าหาใจกลางของดอก การจัดเรียงของกลีบดอกเป็นไปอย่างมีระเบียบ มีสีสรรไม่สวย คือ ดูแห้งแล้งไม่มีชีวิตชีวา แต่ถ้าดูในแง่ความแปลกแล้ว ดูแปลกกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือกลีบดอกด้านในมีสีเหลืองด้านนอกมีสีแดง แปลกตา ก้านดอกยาว

3. Gold Lode ดอกมีขนาดไม่ใหญ่นัก เมื่อเทียบกับพันธุ์ Golden Mefo และ Mrs. Roy แต่มีการเจริญเติบโตดี ต้านทานโรคและแมลงดีมาก ขยายพันธุ์ได้ง่าย เพราะงอกรากเร็วมาก ใช้เวลาปักชำเพียง 10 วันเท่านั้น แต่ก้านดอกสั้น ดอกดก เหมาะที่จะปลูกเป็นไม้กระถางมากกว่าไม้ตัดดอก

3. การขยายพันธุ์

3.1 ขยายพันธุ์โดยการปักชำ

การขยายพันธุ์โดยการปักชำ ที่นิยมทำทุกวันนี้ คือ การปักชำโดยใช้ terminal cuttings คือ ใช้ส่วนยอดของกิ่ง กิ่งที่เหมาะสำหรับการนี้ควรจะเป็นกิ่งที่อยู่ส่วนล่าง ๆ หรือโคนของพุ่มต้นมากกว่ากิ่งที่อยู่ส่วนบน ทั้งนี้จากการทดลองพบว่า กิ่งที่อยู่ส่วนล่างหรือโคนต้นนั้นส่วนมากเป็นกิ่งมีตาใบมากกว่าตาดอก เมื่อนำเอาส่วนยอดของกิ่งไปปักชำจึงทำให้ออกรากง่ายได้กิ่งชำที่สมบูรณ์กว่า อีกประการหนึ่งที่สำคัญที่สุด คือ ควรจะเลือกสรรกิ่งชำจากต้นที่ปราศจากเชื้อโรค ทั้งนี้เพราะโรคบางชนิดที่เกิดขึ้นกับเบญจมาศถ่ายทอดไปในที่ต่าง ๆได้โดยติดไปกับปักชำ และควรจะเลือกจากต้นที่มีลักษณะดีเด่น ต้นมีสภาพสมบูรณ์ปราศจากโรคและแมลงรบกวน

3.2 การขยายพันธุ์โดยใช้หน่อ

เบญจมาศบางพันธุ์สามารถแตกหน่อได้ดีมาก โดยเฉพาะพันธุ์เบญจมาศที่สั่งมาจากญี่ปุ่นต้นจะแตกหน่อเป็นจำนวนมาก โดยหนึ่งต้นจะให้จำนวนอย่างน้อย 10 หน่อ แต่ละหน่อจะมีรากติดอยู่ด้วย เมื่อแยกเอาหน่อเหล่านี้ไปปลูกจะได้ต้นเบญจมาศที่แข็งแรง มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการปลูกโดยใช้กิ่งปักชำ เบญจมาศบางพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยขณะนี้ เช่น พันธุ์เหลืองเข้ม ชาวสวนเรียกพันธุ์เหลืองเขี้ยว ถ้าปลูกในฤดูหนาวจะให้ดอกน้อยแต่จะให้หน่อเป็นจำนวนมาก (ไพฑูรย์ กิจเภาสงฆ์, 2527 ; สมเพียร เกษมทรัพย์, 2534)

3.3 การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นพืชไม่ว่าจะเป็นเซลล์ โพรโทพลาสต์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย เกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน และฮอร์โมนพืช ในสภาพปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหลาย ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง (Street,1977)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากการที่ Gottlieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ได้ทำการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยง เพื่อจะทำการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ เมื่อปี ค.ศ. 1902 แต่เขาก็พบความสำเร็จเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิด โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมาในปี ค.ศ. 1938 สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะและแคลลัส (callus) ของพืชได้หลายชนิด และนับตั้งแต่บัดนั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆอีกมากมาย จนกระทั่งปัจจุบันนี้ สามารถทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวๆ และโพร-โทพลาสต์ของพืชได้หลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาร่วมด้วยเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ๆ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิวัฒนาการอีกก้าวหนึ่งของวงการไม้ดอก สมเพียร เกษมทรัพย์ และสุเม อรัญนาถ (2524 อ้างโดย สมเพียร เกษมทรัพย์ 2534) ได้ทำการทดลองขยายพันธุ์เบญจมาศที่ใช้ปลูกเป็นไม้กระถางพันธุ์ 'Golden St Moritz' โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ คือ ตาข้าง ลำต้น และใบ ในสูตรอาหารเหลวและแข็งดัดแปลงมาจากสูตรอาหารของ MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยเติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN (kinetin) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าส่วนตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารแข็งเกิดแคลลัสที่มีสีเขียวมากที่สุด เมื่อนำแคลลัสที่ได้ทั้งจากอาหารแข็งและเหลวไปเลี้ยงบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่มี NAA และKN ความเข้มข้นต่างกัน 9 สูตร เพื่อที่จะให้แคลลัสเจริญเป็นต้นต่อไป ผลการทดลองปรากฏว่า แคลลัสจากอาหารในสูตร MS ซึ่งมี KN 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดเป็นต้นจำนวนมากที่สุดและเมื่อนำต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในเครื่องปลูกทั้งที่อบและไม่อบฆ่าเชื้อโรค ปรากฏว่าได้เปอร์เซ็นต์ต้นรอดสูงใกล้เคียงกัน

Jaacov และ Langhans (1972) ศึกษาการเพิ่มจำนวนของเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) โดยใช้ปลายยอดในการขยายพันธุ์ โดยทำการตัดปลายยอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ทำให้เกิดแคลลัส จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสแล้วนำชิ้นส่วนของแคลลัสย้ายลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวอีกครั้งเพื่อชักนำให้เกิดต้น เมื่อต้นมีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จึงย้ายลง Hoagland ' s solution จากนั้นจึงย้ายพืชลงไปปลูกในดิน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ปลายยอดเบญจมาศเพียง 1 ยอด สามารถเพิ่มจำนวนต้นเบญจมาศได้มากถึง 100,000 ต้นใน1 ปี

Chen และคณะ (1985) ศึกษาการขยายพันธุ์โดยใช้ใบของเบญจมาศ 8 สายพันธุ์ที่งอกในฤดูใบไม้ผลิ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA (N^6-benzyladenine) 3-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดตาได้ดีที่สุด และอาหารสูตร ¼ MS ที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่ชักนำรากได้ดีที่สุด การชักนำให้เกิดตาจากชิ้นส่วนของใบจะเกิดมากที่สุดที่ปลายใบ และเกิดน้อยที่สุดที่โคนใบ

Prasad และ Chatuvedi (1988) ได้นำปลายยอด ใบ ลำต้น และรากเบญจมาศสายพันธุ์ Birbal Sahni มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA, IAA (indoleacetic acid), NAA และ KN ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดสามารถชักนำยอดรวมได้สูงสุดถึง 9 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วนพืช ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อยอดมีความยาว 2 เซนติเมตร จะเกิดราก จากนั้นจึงย้ายไปปลูกในดิน

Sangwan และคณะ (1987) รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด เบญจมาศ ลิ้นมังกร และมันฝรั่ง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ พบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกิดจำนวนยอดรวมคือ ขนาดของชิ้นส่วนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าขนาดความยาวของปลายยอด 3-5 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชนิดเดียวหรือผสมให้ยอดเบญจมาศที่ไม่ปกติจากการชักนำโดยใช้แคลลัส อย่างไรก็ตาม จำนวนยอดรวมของเบญจมาศเกิดได้ดีในอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีหรือไม่มี GA_3 (gibberellic acid) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรก็ได้ ซึ่งยอดที่ได้จะมีการยืดยาวออก 4-5 เซนติเมตร จากนั้นจึงย้ายไปชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มี ซูโครส 1% และ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ดีในลิ้นมังกร คือ สูตรอาหาร MS ที่มี NAA หรือ IAA 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN หรือ BA 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมันฝรั่ง คือ MS ที่มี KN 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้น 2-3 สัปดาห์ จึงย้ายมาเพิ่มจำนวนยอดในอาหารสูตร MS ที่มี IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Calcium panthothenate 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วชักนำรากในอาหารที่มี IAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 1% และพบว่า ประมาณ 60 % ของจำนวนต้นทั้งหมดเมื่อย้ายลงดินแล้วจะได้ต้นปกติ

Bhattacharya และคณะ (1990) ทำการขยายพันธุ์เบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) โดยชักนำให้เกิดแคลลัสจากต้นและใบในอาหารสูตร MS ที่มี

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดแคลลัสสีเขียวจากชิ้นส่วนของใบและต้นเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ ขนาดแคลลัสประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร เจริญไปเป็นต้นได้ 2-3 ต้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละต้นเมื่อย้ายลงในอาหารเหลว พบว่าสามารถเกิดต้นใหม่ได้ถึง 150 ต้น นำไปชักนำรากในอาหารสูตร half MS หรือ สูตร White จากการศึกษาพบว่าใน 1 ปี สามารถผลิตต้นเบญจมาศได้ 10^{14} ต้นจากเบญจมาศเพียงต้นเดียว

Lu และคณะ (1990) ศึกษาการเกิดจำนวนยอดรวมของเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) โดยตรงจากชิ้นส่วนของต้นเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนต้นสามารถเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ 100 % และมีจำนวนยอดรวมถึง 4.6 ยอด นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดต้นน้อยลงเมื่อใช้ชิ้นส่วนพืชที่แก่

May และ Trigiano (1991) ศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซีส (somatic embryogenesis) จากเส้นกลางใบของ *Dendranthema grandiflora* Tzvelev ในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาถึงแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส พบว่าเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซีสในเวลา 28 วัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่สว่าง 10 วัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดอีก 14 วัน ตามลำดับ โซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซีส ไม่เกิดขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงในที่มืดหรือสว่างเพียงอย่างเดียว เอ็มบริโอจะเกิดในอาหารที่มีซูโครส 12-15% ถ้าความเข้มข้นของซูโครสต่ำจะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของต้นและรากด้วย

Kushal และคณะ (1994) ได้นำยอดเบญจมาศสายพันธุ์ Riot (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv Riot) เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดใหม่ภายใน 12 สัปดาห์ และเกิดรากในอาหารสูตร half MS ร่วมด้วย IBA (indolebutyric acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลเช่นเดียวการปักชำ และเมื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติยังคงมีลักษณะเหมือนเดิม

Lee และคณะ (1997) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแผ่นใบของเบญจมาศ (*Chrysanthemum coronarium* L.) ได้พัฒนาเป็นยอดรวมประมาณ 73% ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารสูตร MS ที่มี BA และ NAA อย่างละ 2.5 μM จำนวนยอดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยง

ในอาหารสูตรที่มี $AgNO_3$ เข้มข้น 1 µM จากนั้นนำต้นมาชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 5-25 µM

Ihsanul และคณะ (1998) ได้นำยอดเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ ที่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0 % (w/v) แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาความสัมพันธ์ของ $HgCl_2$ กับเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน พบว่าที่ $HgCl_2$ 0.5 % ให้การปนเปื้อนต่ำสุด และเกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.5-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ BA 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Oka และคณะ (1999) ชักนำให้เกิดตาข้างและเอ็มบริออยด์จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของเบญจมาศ (*Chrysanthemum coronarium*) ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือในสูตรอาหารที่มี BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตาข้างจะเกิดขึ้นที่รอยตัดของใบภายในเวลา 6-9 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เอ็มบริออยด์เกิดที่รอยตัดภายในเวลา 9-12 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เอ็มบริออยด์ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะคล้ายใบเลี้ยงและส่วนใต้ใบเลี้ยงแต่ไม่มีลักษณะโครงสร้างของรากซึ่งทั้งตาข้างและเอ็มบริออยด์เกิดจากเนื้อเยื่อเจริญที่มาจากอิพิเดอร์มิส (epidermis) และซับอิพิเดอร์มิส (subepidermis) ซึ่งไม่ได้เกิดจากแคลลัส

นอกจากเบญจมาศแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังประสบความสำเร็จในพืชวงศ์เดียวกับเบญจมาศ อีกหลายชนิดดังนี้

ปิยรัตน์ บุษบงก์ไพฑูรย์ (2542) ทำการเพาะเลี้ยงดาวเรืองอเมริกัน (*Tagetes erecta* L.) จากชิ้นส่วน ใบ ลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ข้อ และปล้อง โดยใช้ดาวเรืองอเมริกันสายพันธุ์ซอฟเวอร์เรน สีทอง พันธุ์ดิสโคพเวอร์รี สีเหลือง และพันธุ์วานิลา ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี NAA ร่วมกับ BA อย่างละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA หรือ KN ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นจากทุกชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA ร่วมกับ BA เมื่อนำแคลลัสที่ได้และชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA หรือ KN ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ในพันธุ์ซอฟเวอร์เรน สีทอง มีการเกิดยอดรวมได้ดีจากแคลลัส

ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ในอาหารที่มี NAA ร่วมกับ BA อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากชิ้นส่วนใบที่มาจากสูตรที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในพันธุ์ดิสโคพเวอร์รีสีเหลือง มีการเกิดยอดรวมได้ดีจากชิ้นส่วนใบที่มาจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากชิ้นส่วนข้อที่มาจากอาหารที่มี KN 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และในพันธุ์วานิลลา สีขาว มีการเกิดยอดรวมได้ดีจากแคลลัสที่ได้จากข้อในอาหารที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากชิ้นส่วนข้อที่มาจากสูตรที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์จึงย้ายลงปลูกในดิน พบว่า พันธุ์ดิสโคพเวอร์รีมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดถึง 92.9%

Kothari และ Chandra (1984) ทำการขยายพันธุ์ดาวเรือง (*Tagetes erecta*) สายพันธุ์ African Marigold โดยใช้ชิ้นส่วนใบเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA, IAA, IBA, NAA และ KN พบว่าสูตรอาหารที่มี BA 3-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมมากที่สุด และเมื่อย้ายเลี้ยงลงในอาหารที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ยอดยืดยาวออก เมื่อได้ยอดที่ยืดยาวแล้วก็นำมาชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงย้ายต้นที่ได้ไปลงปลูก ในดิน

Parthasarathy และ Nagaraju (1995) ศึกษาความเข้มข้นของ BA ในการชักนำให้เกิดยอดรวมของเยอบีร่า ในสายพันธุ์ Gold Dust โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี BA 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS ที่มี BA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร½ MS

Wildi และคณะ (1998) ขยายพันธุ์ *Petasites hybridus* ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับเบญจมาศ โดยใช้ชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และตาดอก ชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่มี BA 17.6 µM ร่วมกับ NAA 0.54 µM เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนก้านใบชักนำยอดได้ 40% สำหรับชิ้นส่วนใบชักนำยอดได้ 27% และชิ้นส่วนของตาดอกสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดถึง 76% จากนั้นแยกยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มีไซโทไคนินชนิดต่าง ๆ คือ 2iP, BA, TDZ และ KN ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.54 µM พบว่าอาหารสูตรที่มี KN 8.8 µM ร่วมกับ NAA 0.54 µM สามารถชักนำยอดรวมได้มากที่สุด

Cuenca และ คณะ (1999) ชักนำยอดรวมโดยใช้ก้านช่อดอก *Centaurea paui* Loscos ex Willk. ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับเบญจมาศ ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ KN 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้ยอดยืดยาว ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการ

เจริญเติบโต จากนั้นชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มี IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชักนำให้ได้ต้นสมบูรณ์ได้ 40% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน และเมื่อย้ายไปปลูกลงดิน พบว่ามีชีวิตรอด 70%

Le และคณะ (1999) ศึกษาการเกิดต้นและจำนวนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงก้านดอกของเยอบีร่า (*Gerbera jamesonii* Bolus) สายพันธุ์ Illusion, Jamilla และ Mariola โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือในสูตรอาหารที่มี TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดจำนวนยอดในอัตรา 10 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วนพืช และชักนำรากในสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จากนั้นจึงย้ายปลูกลงดิน

4. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

โพรโทพลาสต์ คือ เซลล์พืชที่ไม่มีผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์อาจถูกทำลายด้วยวิธีกลหรือด้วยเอนไซม์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยตรงดังนั้น การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ จึงหมายถึง การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์หลังจากนั้น โพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจะมีความสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เกิดการแบ่งเซลล์กลายเป็นแคลลัสจนในที่สุดสามารถชักนำให้เกิดรีเจนเนอเรชั่นจากแคลลัสขึ้นมาใหม่ การแยกโพรโทพลาสต์ แบ่งออกได้ 2 วิธี (Street, 1977) คือ

1.วิธีกล (Mechanical isolation)

เป็นการแยกโพรโทพลาสต์ออกมาจากเนื้อเยื่อพืชโดยการนำเอาเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในสารละลายไฮเปอร์โทนิก จะทำให้เซลล์เหี่ยวและเยื่อหุ้มเซลล์หดตัวผละจากผนังเซลล์ จากนั้นใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อพืชเป็นชิ้นเล็ก ๆ เมื่อนำไปแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าเดิมจะทำให้เซลล์พองตัวได้โพรโทพลาสต์ที่มีลักษณะกลม วิธีนี้ได้โพรโทพลาสต์จำนวนน้อยและมักมีเศษชิ้นส่วนที่ไม่ต้องการปะปนอยู่มาก

2. วิธีการใช้เอนไซม์ (Enzymatic isolation)

วิธีนี้ใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ เพื่อให้โพรโทพลาสต์หลุดออกมา เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้สมบูรณ์และมีปริมาณมาก เอนไซม์ที่ใช้ย่อยเซลล์ส่วนใหญ่แทบทั้งหมดได้จากเห็ดราและเป็นพวกไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme)

โดยทั่วไป องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชจะมี เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ดังนั้นในการแยกโพรโทพลาสต์จึงต้องใช้เอนไซม์พวกเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้โพรโทพลาสต์และชั้นระหว่างเซลล์ คือ มิดเดิลลาเมลลา จะมีกรดเพคติคเชื่อมอยู่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์พวกเพคติเนสร่วมด้วย กลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลสจะมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่ เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 4.5 – 5.0 และ 45 – 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนกลุ่มเพคติเนสมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 5.5–6.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539)

วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

การเลี้ยงโพรโทพลาสต์ทำได้หลายวิธี (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2540) คือ

1. แบบ Drop culture หรือ Hanging /sitting culture โดยเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารที่มีความหนาแน่นประมาณ $5x10^4$ มิลลิลิตร แล้วใช้ automatic pipette เพื่อหยดสารแขวนลอยของ โพรโทพลาสต์ลงบนฝาด้านในของจานแก้วให้ได้หยดขนาดเล็กประมาณ 20-40 µl ปิดฝาจานแก้วแล้วพันทับด้วยแผ่น Nescofilm เพื่อเก็บรักษาความชื้น

2. แบบ Microchamber culture โดยเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในช่องเล็กๆ ที่เกิดจากการใช้กระจกปิดสไลด์ 3 แผ่นวางทับและยึดติดกันด้วย mineral oil หรือใช้สไลด์หลุมแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3. แบบ liquid culture โดยเลี้ยงสารแขวนลอยโพรโทพลาสต์ความหนาแน่น $5x10^4$ ถึง $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานแก้วปิดฝาครอบแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

4. แบบ liquid on agar culture โดยเลี้ยงสารแขวนลอยโพรโทพลาสต์เป็นชั้นบางๆ ประมาณ $5x10^4$เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานแก้วที่มีวุ้นแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

5. แบบ multiple drop array โดยหยดโพรโทพลาสต์ขนาดประมาณ 40 µl หลายๆ หยด ลงบนฝาครอบด้านในของจานแก้ว ปิดฝาครอบแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

6. แบบ microdroplet culture โดยหยดโพรโทพลาสต์ขนาดเล็ก ประมาณ 0.25-0.5 µl แต่ละหยดให้มีเพียง 1 เซลล์ ลงบนจานแก้วปิดฝา ครอบแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

7. การเลี้ยงใน semisolid media culture ซึ่งมีได้ 2 แบบ คือ

   7.1 ใช้วุ้น (agar) ประมาณ 2-4 % เป็นตัวทำให้กึ่งแข็ง โดยหลอมที่ 43-45 $^{\circ}C$ แล้วผสมกับโพรโทพลาสต์ที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว

7.2 ใช้ agarose หรือ alginate ซึ่งได้แก่ agarose, alginate, gelatin และ polyacrylamide แทนการใช้วุ้น

8. แบบ filter paper disc on agar media โดยเทอาหารแข็งลงในจานแก้ว แล้ววางกระดาษกรองทับเพื่อดูดซับอาหาร จากนั้นหยดโพรโทพลาสต์ลงบนกระดาษกรอง

9. แบบ Feeder layer โดยเลี้ยงโพรโทพลาสต์บนกระดาษกรองที่พับโค้งเป็นรูปสะพาน ที่มีปลาย 2 ข้างจุ่มอยู่ในอาหารเหลวเพื่อดูดซับอาหาร

10. แบบ Nurse culture โดยใช้แคลลัสเป็นตัวช่วย ในการเจริญเติบโตของโพรโทพลาสต์ เนื่องจากในระยะแรกโพรโทพลาสต์ยังไม่สามารถผลิตสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง แล้วหยดโพรโทพลาสต์บนกระดาษกรองที่วางทับบนผิวอาหาร

11. แบบ Reservoir media culture โดยแบ่งพื้นที่ในจานแก้วเป็นช่องอาหารส่วนหนึ่งสำหรับเลี้ยงโพรโทพลาสต์ และมีช่องสำหรับสำรองไว้อีกส่วนหนึ่ง

12. แบบ Agar drop culture โดยเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ในจานแก้ว แล้วเตรียมอาหารที่มีสภาพแข็งกว่ามาหยดลงในหยดของโพรโทพลาสต์เดิม เพื่อใช้เป็นอาหารสำรอง

การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศและพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับเบญจมาศนับได้ว่าประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก เช่น

อำนวย คำตื้อ และ เซเอบิ โอกะ (2537) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบเลี้ยงของผักสลัดพันธุ์ Kaiser อายุ 4 วัน ที่เพาะในอาหารสูตร MS โดยนำโพรโทพลาสต์ที่แยกออกจากผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กัน คือ $1x10^4$, $2x10^4$ และ $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนอาหารสูตร 1/2 MS (80 มิลลิกรัมต่อลิตร NH_4NO_3) ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 0.3 M โดยเติม sodium succinate 10 mM และ casamino acid 0.1% ใช้วุ้นอาหาร Gelrite 0.3% ปรับ pH 6.0 และนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบเดียวกันในสภาพมืด ณ อุณหภูมิห้อง (10-15 องศาเซลเซียส) โดยเปรียบเทียบสภาพนิ่ง กับการวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่า ทุกความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์ทั้ง 2 สภาพ สามารถสร้างกลุ่มของเซลล์ได้ดีมาก แต่ในสภาพที่วางบนเครื่องเขย่าสามารถสร้างกลุ่มของเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นพืชได้ดีกว่าสภาพนิ่ง และความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์ต่ำจะมีประสิทธิภาพในการสร้างกลุ่มเซลล์ได้ดีกว่า

ความหนาแน่นสูง สำหรับการศึกษาผลของวุ้นอาหารชนิดต่าง ๆ คือ agar (Wako) ที่มีความเข้มข้น 0.3%, 0.5%, 0.8% สำหรับ agarose (Sigma type II) ใช้ความเข้มข้น 0.2%, 0.3%, 0.4% และ Gelrite ความเข้มข้น 0.2%, 0.3%, 0.4% พบว่า Gelrite 0.4% จะมีประสิทธิภาพในการสร้างกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นต้นพืชที่ดีที่สุด ส่วนagar (Wako) และ agarose (Sigma type II) ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวุ้นอาหารในการเพาะเลี้ยง

Okamura และคณะ (1984) ศึกษาผลของแอมโมเนียมอิออนในการยับยั้งการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของพืชในวงศ์ Asteraceae บางสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Artemisia vulgaris* และเบญจมาศ 2 สายพันธุ์ คือ *Chrysanthemum indicum* และ *Chrysanthemum zawadskii* โดยพบว่าแอมโมเนียมอิออน ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของพืชในวงศ์นี้แต่ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของยาสูบ แอมโมเนียมอิออนมีผลยับยั้งอย่างรุนแรงในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของ *Artemisia vulgaris* แต่จะยับยั้งปานกลางใน *Chrysanthemum indicum* และ *Chrysanthemum zawadskii*

Lenee และ Chupeau (1986) ทำการแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ชั้นมีโซฟิลล์ของใบ ต้น ใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยง เพื่อหาความหนาแน่นและนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่าส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุดและนำไปเพาะเลี้ยงโดยใช้ความหนาแน่นต่ำในสูตรอาหารที่มี glutamine หรือ ammonium succinate เป็นแหล่งไนโตรเจนและมี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสมในการแบ่งเซลล์โดยมีการสร้าง cell plate และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

Rambaud และคณะ (1990) ศึกษาปัจจัยบางประการที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของใบ *Cichorium intybus* L. var. Magdeburg โดยเพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมง และความเข้มแสง 15 วัตต์ต่อตารางเมตร ในสูตรอาหาร MS ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 10 กรัมต่อลิตร พบว่า จะมีการสร้างผนังเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมงและจะแบ่งเซลล์ภายหลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน จากนั้นชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นที่สมบูรณ์ได้

Polgar และ Krasnyanski (1992) ศึกษาการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของทานตะวัน (*Helianthus maximiliani*) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นโดยนำกลุ่มเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จากนั้นนำใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์

แขวนลอยมาแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารแข็งสูตร V-KM (Binding and Nehls, 1977 อ้างโดย Polgar and Krasnyanski, 1992) และปิดทับด้วยอาหารเหลวสูตร V-KM พบว่า กลุ่มโคโลนีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จะพัฒนาให้เอ็มบริโอระยะ globular และโครงสร้างดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอที่มีลักษณะปกติและไม่ปกติเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ร่วมกับ BA และชักนำให้เกิดต้นสมบูรณ์ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจากนั้นจึงย้ายไปปลูกในดิน

Lindsay และ Ledger (1993) ได้ศึกษาการเกิดพืชต้นใหม่จากโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศ (*Dendranthema zawadskii* X *D. grandiflora*) โดยแยกและเพาะเลี้ยงโพรโท-พลาสต์จากใบ พบว่า สามารถสร้างผนังเซลล์จากการเพาะเลี้ยงภายใน 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวสูตร V-KM (Binding and Nehls, 1977 อ้างโดย Linsay and Ledger, 1993) หลังจากเพาะเลี้ยง 21 วัน เกิดกลุ่มแคลลัสขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นย้ายไปยังอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำชักนำต้น พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 33 วัน เกิดต้นสมบูรณ์

Webb และคณะ (1994) เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบผักกาดหอม (*Lactuca perennis*) ในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการลดระดับสารอนินทรีย์ ร่วมกับ 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีอะติน (zeatin) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้วุ้น agarose พบว่า สามารถทำให้โพรโทพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนี จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (ซึ่งยังลดระดับของสารอนินทรีย์) ที่มี 2,4-D, NAA และซีอะติน 0.1, 1.0, 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงย้ายไปยังสูตรMS (ปกติ) ที่มี BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งได้ต้นสมบูรณ์ภายใน 21 สัปดาห์ นับตั้งแต่แยกโพรโทพลาสต์

Wingender และคณะ (1996) เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากส่วนใต้ใบเลี้ยงของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) 4 สายพันธุ์ (Florom-328, Cerflor, Euroflor, Frankasol) เพาะเลี้ยงโดยหยดโพรโทพลาสต์ที่มีวุ้น agarose ลงในจานเพาะเลี้ยงแล้วปิดทับด้วยอาหารเหลว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22-28 วัน โดยในสัปดาห์แรกใช้อาหารที่มีไซโทไคนินและออกซินในอัตราส่วน 0.8/1 จากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของออกซิน ให้สูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และอัตราส่วนของไซโทไคนินต่อออกซิน 8/1 ในสัปดาห์ที่ 3 และ4 จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีไซโทไคนินต่อออกซิน ในอัตราส่วน 40/1 พบว่า เกิดแคลลัสและเริ่มปรากฏเอ็มบริโอ ระยะ globular ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็น leaf primodia และได้ต้นที่ยืดยาว ชักนำราก

โดยตัดต้นที่ได้จุ่มในสารละลายออกซินแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จะได้ต้นที่สมบูรณ์ และย้ายปลูกลงดินได้ ซึ่งใช้เวลาในการเริ่มแยกโพรโทพลาสต์จนกระทั่งได้ต้นสมบูรณ์เป็นเวลา 13 สัปดาห์

Henn และคณะ (1998) ศึกษาการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากชั้นมีโซฟิลล์ของใบทานตะวัน 2 สายพันธุ์ (*Helianthus nuttallii* T&G และ *Helianthus giganteus*) โดยเพาะเลี้ยงแบบฝังในอะกาโรสและปิดทับด้วยอาหารเหลวสูตร mKM (Wingender *et al.*, 1996) หลังจากเพาะเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ ก็เกิดแคลลัส ซึ่งประสิทธิภาพการเจริญไปเป็นกลุ่มเซลล์ของ *Helianthus nuttallii* T&G เท่ากับ 1.5% และ *Helianthus giganteus* เท่ากับ 2.5% จากนั้นจึงย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและชักนำรากในสูตรอาหารที่มี NAA เมื่อเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ย้ายไปปลูกในดินและจะออกดอกหลังจากนั้น 3 เดือนและเก็บเกี่ยวเมล็ดได้

นอกจากเบญจมาศและพืชในวงศ์เดียวกับเบญจมาศแล้วที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ยังพบว่าไม้ดอกไม้ประดับอีกหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จเช่นเดียวกัน ได้แก่

Loh และ Rao (1985) ได้ทำการแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า สายพันธุ์ Noorah Alsagoff โดยใช้เอนไซม์ผสม พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 1% ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.2% และไดรซีเลส 0.5% โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอล 0.5 M ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด คือ $1x10^6$ โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีออกซินชนิดต่าง ๆ ร่วมกับ KN พบว่ามีการแบ่งเซลล์ 14-16% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 48-75% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

Kanchanapoom และ Wuttisit (1996) ได้นำใบกล๊อกซีเนียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแยกโพรโทพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส 3% น้ำตาลซอร์บิทอล 0.4 M $CaCl_2$ เข้มข้น 10 mM และ MES เข้มข้น 10 mM บ่มเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้จำนวนโพรโทพลาสต์เฉลี่ย $3.5x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โพรโทพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์และเกิดกลุ่มโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 4.5 µM และBA 2.8 µM จากนั้นชักนำให้เกิดต้นจากกลุ่มแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.8 µM และ NAA 5.4 µM

Kim และ Lee (1996) ศึกษาการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์คาร์เนชั่น โดยนำโพรโทพลาสต์ที่แยกจากใบคาร์เนชั่น จำนวน $5x10^5$ โพรโพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยง

ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 9% พบว่ามีการแบ่งเซลล์ประมาณ 18% และเริ่มเกิดกลุ่มโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายกลุ่มโคโลนีไปเพาะเลี้ยงในที่สว่าง (21.5 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ก็เกิดกลุ่มแคลลัส มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร จากนั้นจึงย้ายแคลลัสสีเขียวลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D เพื่อชักนำแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ภายในเวลา 4 สัปดาห์ จึงย้ายแคลลัสนั้นไปยังอาหารสูตร N_6 (Chu *et al.*, 1975 อ้างโดย Kim and Lee, 1996) ที่มี 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซส 20.0 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสว่าง หลังจากนั้น 5 สัปดาห์จึงเกิดยอด 10-15 ยอดต่อแคลลัส แล้วชักนำรากในสูตรอาหารที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์จึงย้ายลงดิน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ของเบญจมาศโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของใบเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. พืชทดลอง : เมล็ดเบญจมาศ (*Chrysanthemum indicum* Linn.) จากบริษัท เอ เอฟ เอ็ม ฟลาวเวอร์ซีส จำกัด
2. สารเคมีต่าง ๆ
   - สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (ดูรายละเอียดในภาคผนวกที่ 1)
   - สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ 2 ,4-D, NAA, BA
   - สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ คือ เอธิลแอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ สารจับใบ(Tween 20)
   - เอนไซม์สำหรับย่อยโพรโทพลาสต์ เช่น เซลลูเลส โอโนซูกะอาร์ –10 (Yakult Honsha Co., Ltd. Lot # 201050), ไดรซีเลส (Kyowa Hakko Co., Ltd. Lot # 4111) มาเซอโรไซม์ อาร์–10 (Yakult Honsha Co., Ltd. Lot # 202018)
   - สารเคมีสำหรับปรับระดับความดันออสโมติก คือ น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลซูโครส
   - สารเคมีสำหรับย้อมตรวจสอบความมีชีวิต (fluoresescein diacetate, FDA) และการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ (calcoflour white, CFW)
   - วุ้น agarose Type I-A: Low EEO (Sigma Co., Ltd. Lot # 90H0155)
3. เวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) และดิน
4. เครื่องแก้วและพลาสติกชนิดต่าง ๆ เช่น พลาสเจอร์ปิเปต จานเพาะเลี้ยง สไลด์ กระจกปิดสไลด์ หลอดเซนตริฟิวจ์ ฟลาสก์ บีกเกอร์
5. เครื่องมือที่ใช้เตรียมเอนไซม์ เช่น เครื่องกรองจุลินทรีย์ กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Millipore membrane filter)
6. เครื่องมือผ่าตัด ปากคีบ มีด
7. ตะแกรงกรอง (nylon mesh filter) ขนาด 141 และ 280 ไมโครเมตร

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   - เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PJ 400
   - เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น AJ 100
   - เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (stirring heating plate) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น MR 3001
   - เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Horiba รุ่น F-13
   - เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp รุ่น R- 245
   - หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ยี่ห้อ Eyela รุ่น MAC-601
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ IEC รุ่น HN-S II
3. กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด (inverted microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น IMT-2
4. สไลด์ฮีมาไซโทมิเตอร์ (hemacytometer slide)
5. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (laminar air fiow cabinet) ยี่ห้อ ISSCO รุ่น HS-124
6. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงที่ติดหลอดไฟยี่ห้อ Phillip ขนาด TDL 36W/54 ให้ความเข้มแสงประมาณ 1,500-2,000 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ตอนคือ

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ

1.1 การเตรียมต้นกล้าที่ปลอดเชื้อ

1.2 การชักนำยอดจากชิ้นส่วนของ ใบ ข้อ และปลายยอด

1.3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมในการชักนำยอดรวม

1.4 การชักนำรากจากยอดที่ได้

1.5 การอนุบาลต้นเบญจมาศในดิน

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของใบเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์

2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

2.3 สูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ

1.1 การเตรียมต้นกล้าที่ปลอดเชื้อ

นำเมล็ดเบญจมาศมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% นาน 2 นาที แล้วย้ายไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 20% โดยหยดทวีน 20 จำนวน 1-2 หยด นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 เดือน

1.2 การชักนำยอดจากชิ้นส่วนของใบ ข้อ และปลายยอด

หลังจากเพาะเมล็ดเบญจมาศเป็นระยะเวลา 1 เดือน นำต้นที่ได้มาตัดออกเป็นชิ้นส่วนของ ใบ ข้อ และปลายยอด โดยใช้ใบอ่อนคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด นำมาตัดให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนข้อ ใช้ข้อที่ 2-4 โดยตัดข้อให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร และใช้ชิ้นส่วนปลายยอดโดยนับลงมาถึงข้อที่ 2 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางชิ้นส่วนของใบตามแนวราบโดยให้ด้าน abaxial ของใบ

สัมผัสกับอาหาร ส่วนชิ้นส่วนข้อ และยอดวางตามแนวตั้งตามธรรมชาติ โดยใช้ หนึ่งชิ้นส่วนต่อหนึ่งขวดอาหาร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกผลโดยนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนต่างๆ

1.3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำยอดรวม

เมื่อได้ชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการชักนำยอดแล้ว นำชิ้นส่วนนั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวดใช้ชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลโดยนับจำนวนยอดรวมต่อชิ้นส่วน เปรียบเทียบกันที่ที่ระดับต่าง ๆ ของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT (Duncan 's Multiple Range Test) จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป IRRISTAT

1.4 การชักนำรากจากยอดที่ได้

แยกยอดที่ชักนำได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS, half MS และ MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เช่น NAA, IBA และ IAA ความเข้มข้นอย่างละ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำราก จากนั้นเลือกสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีการชักนำรากที่ดีที่สุดมาเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 1.0, 2.0 และ3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด บันทึกผลโดยนับจำนวนรากต่อต้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป IRRISTAT พร้อมทั้งสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช

1.5 การอนุบาลต้นเบญจมาศในดิน

เมื่อได้ต้นสมบูรณ์แล้ว นำต้นที่ได้ไปปรับสภาพโดยนำไปเพาะเลี้ยงในเวอร์มิคูไลต์ ในช่วงแรกจะรดน้ำและปิดฝาขวดไว้จากนั้นจึงค่อย ๆ เปิดฝา เมื่อเห็นว่าต้นแข็งแรงดีแล้วจึงย้ายลงดินและบันทึกผลความมีชีวิตหลังจากย้ายลงดินทุก 15 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของใบเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จะต้องมีการแยกโพรโทพลาสต์ก่อน ในการทดลองนี้จะแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ และใช้น้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M เป็นสารละลายปรับแรงดันออสโมติก ซึ่งมีวิธีการเตรียมเอนไซม์และวิธีการแยกโพรโทพลาสต์ดังต่อไปนี้

วิธีการเตรียมเอนไซม์

เตรียมเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 2.5% Cellulase + 0.5% Driselase + 0.5% Macerozyme โดยใช้สารละลายแมนนิทอล 0.6 M เป็นสารละลายปรับแรงดันออสโมติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยชั่ง

Cellulase onozuka R-10	1.25	กรัม
Driselase	0.25	กรัม
Macerozyme R-10	0.25	กรัม
Mannitol	5.46	กรัม

ละลายเอนไซม์และน้ำตาลในสารละลาย CPW (ดูรายละเอียดในภาคผนวกที่ 2) pH 5.7 และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสนำไปกรองโดยใช้เครื่องกรองเอนไซม์ที่มีกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

วิธีการแยกโพรโทพลาสต์

1. นำใบเบญจมาศมาแช่ในสารละลายแมนนิทอล 0.7 M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อพลาสโมไลซ์ จากนั้นดูดสารละลายแมนนิทอลออกแล้วหั่นใบเป็นชิ้นเล็กๆตามขวางของใบใส่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด15x60 มิลลิเมตร
2. ดูดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M เป็นสารละลายปรับแรงดันออสโมติก ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนของใบอยู่
3. นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30–32 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ ตามที่กำหนด
4. เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปกรองแล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีโพรโทพลาสต์อยู่แล้วนำไปแขวนลอยในสารละลายซูโครส 0.7 M เพื่อทำซูโครสเกรเดียนต์ (sucrose gradient) แยกโพรโทพลาสต์และเศษเซลล์ออกจากกัน

5. นำไปปั่นแยกส่วนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ก็จะเห็นชั้นวงแหวนของโพรโทพลาสต์ลอยอยู่ระหว่างชั้นของสารละลายเอนไซม์กับชั้นของซูโครส ส่วนเศษเซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด
6. ทำการล้างโพรโทพลาสต์ที่ได้ด้วยอาหารเหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และทำซ้ำอีกครั้ง
7. แขวนลอยโพรโทพลาสต์ไว้ในอาหาร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
8. นับจำนวนโพรโทพลาสต์โดยใช้สไลด์ฮีมาไซโทมิเตอร์

ในการแยกโพรโทพลาสต์จะมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของเอนไซม์ เวลาในการอินคูเบท น้ำหนักใบ เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์

2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์

2.1.1 ชนิดของเอนไซม์ และเวลาในการอินคูเบท

เอนไซม์ที่ใช้ E1 = 2.5% Cellulase + 0.5% Driselase

E2 = 2.5% Cellulase + 0.5% Macerozyme

E3 = 2.5% Cellulase + 0.25% Driselase + 0.25% Macerozyme

E4 = 2.5% Cellulase + 0.5% Driselase + 0.5% Macerozyme

นำใบที่มีน้ำหนัก 0.2 กรัม มาแยกโพรโทพลาสต์ตามวิธีการแยก โดยใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร อินคูเบทที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

2.1.2 น้ำหนักใบ

นำใบมาชั่งน้ำหนักที่ 0.2, 0.4 และ 0.6 กรัม มาทำการแยกโพรโทพลาสต์ตามวิธีการแยก โดยใช้เอนไซม์และเวลาที่เหมาะสมตามข้อ 2.1.1 ใช้เอนไซม์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร

2.1.3 การเก็บใบไว้ในที่มืด

นำใบที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้น้ำหนักตามข้อ 2.1.2 มาแยกโพรโทพลาสต์ตามวิธีการแยกเปรียบเทียบกับใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจาก ข้อ 2.1.1

บันทึกผล

บันทึกผลทุกสภาวะโดยสุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์แล้วตรวจนับด้วยสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ จากนั้นนำโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมมาตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์โดยย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด (ดูรายละเอียดในภาคผนวกที่ 2) แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ สุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

วิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดของเอนไซม์ เวลาในการอินคูเบท น้ำหนักใบ และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป IRRISTAT และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่เก็บไว้ในที่มืดเปรียบเทียบกับใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืดโดยใช้โปรแกรม SPSS

2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

2.2.1 เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารเหลว

2.2.2 เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยใช้วุ้นอะกาโรส 0.2%

นำโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จำนวน $1x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x60 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มี น้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.6 M ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าเบา ๆ ทั้ง 2 วิธี แล้วนำไปเลี้ยงในที่มืด ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโพรโทพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด บันทึกผลการสร้างผนังเซลล์โดยย้อมสีแคลคอฟอร์ไวท์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวกที่ 3) และบันทึกการแบ่งเซลล์ในแต่ละวิธีการเลี้ยงเปรียบเทียบกันหลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง สุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป IRRISTAT

2.3 สูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

นำโพรโทพลาสต์ จำนวน $1x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร หยดลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x60 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดโดยใช้สูตรอาหารต่าง ๆ

สูตรที่ 1 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีน้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M

สูตรที่ 2 MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 2% โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M ซึ่งสารควบคุมการเจริญในชุดนี้ดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร V-KM (Binding and Nehls, 1977 อ้างโดย George *et al.*, 1987)

สูตรที่ 3 MS ที่มี 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M (May and Trigiane, 1991)

สุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ จากนั้นนำสูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการสร้างผนังเซลล์มาดัดแปลงโดยการเติมซูโครส การมีและไม่มีน้ำมะพร้าว การเปลี่ยนสารละลายปรับแรงดันออสโมติกจากน้ำตาลแมนนิทอลเป็นน้ำตาลซูโครส และลดความเข้มข้นของสารละลายปรับแรงดันออสโมติกลงทีละ 0.1 M ทุกวัน จนกระทั่งถึง 0.3 M เพื่อหาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการแบ่งเซลล์ และบันทึกการแบ่งเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์และเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป IRRISTAT

บทที่ 3

ผล

ตอนที่1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ

1.1 การเตรียมต้นกล้าที่ปลอดเชื้อ

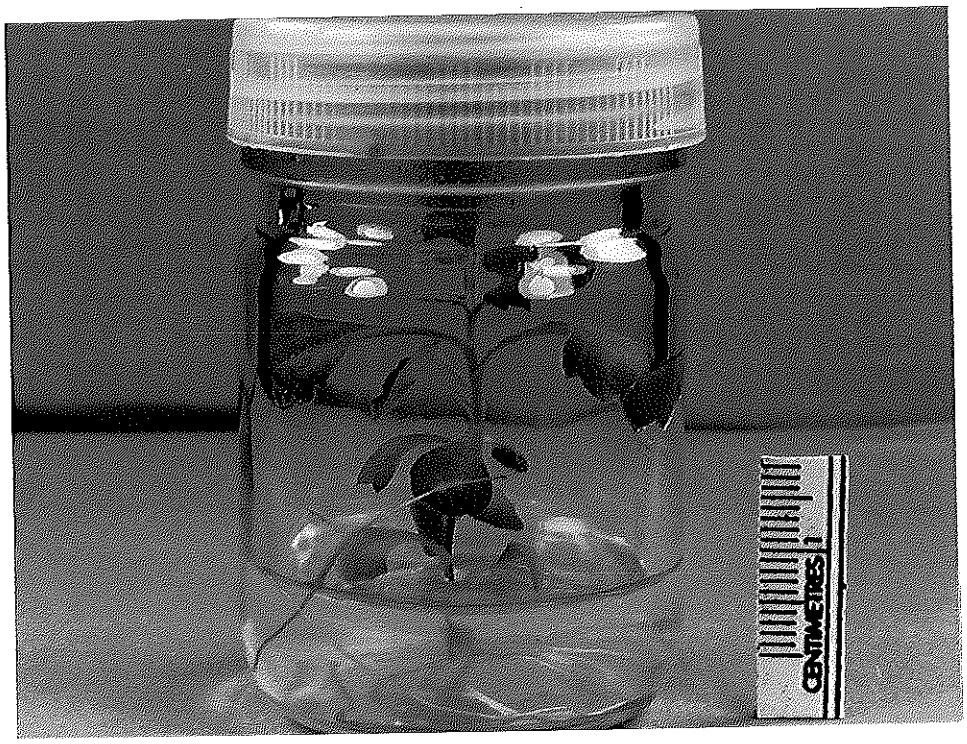
จากการเตรียมต้นกล้าที่ปลอดเชื้อของเบญจมาศโดยนำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% นาน 2 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 20% โดยหยดทวีน 20 จำนวน 1-2 หยด นาน 20 นาที เพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ คือ มีทั้งต้นและรากจาก 1 เมล็ด (ภาพที่1) และจากผลการทดลองพบว่าพืชมีอัตรารอดชีวิต 98%

1.2 การชักนำยอดจากชิ้นส่วนของใบ ข้อ และปลายยอด

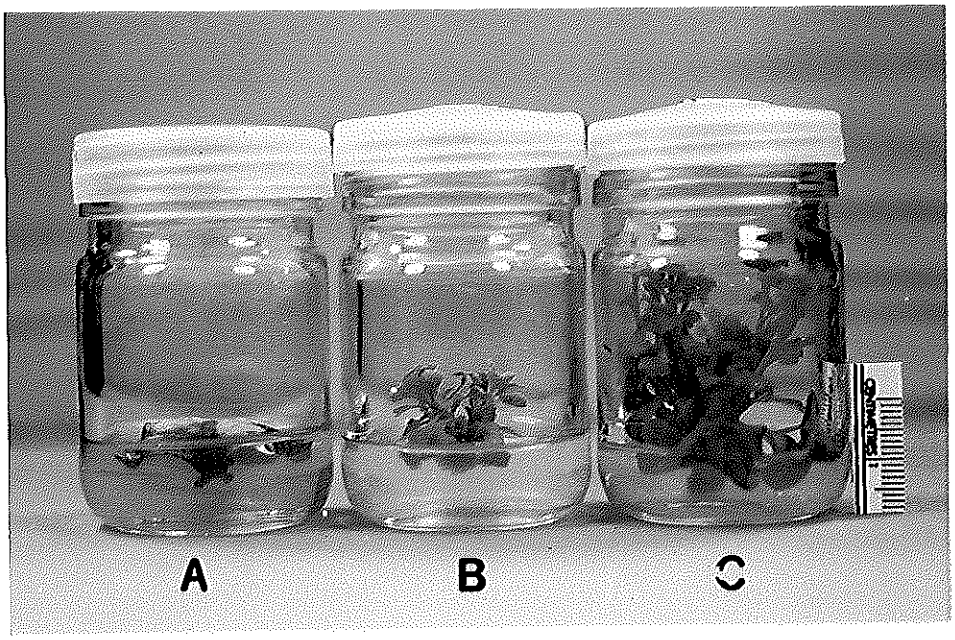
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชของใบ ข้อ และปลายยอด ที่ได้จากขั้นตอน 1.1 โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเหล่านี้ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนของใบไม่เกิดต้น โดยภายในสัปดาห์แรกชิ้นส่วนใบม้วนงอและเมื่อเพาะเลี้ยงไปอีก 2 สัปดาห์แผ่นใบเริ่มมีสีเหลืองจนเป็นสีน้ำตาลและอาหารก็มีสีคล้ำด้วย ส่วนชิ้นส่วนข้อและปลายยอดเกิดยอดเพิ่มขึ้นโดยชิ้นส่วนของข้อเกิดจำนวนยอดรวมได้น้อยกว่า 3 ยอดแต่ชิ้นส่วนของปลายยอดเกิดจำนวนยอดรวมมากกว่าชิ้นส่วนของข้อ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ข้อ และปลายยอด ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชิ้นส่วนพืช	จำนวนยอด/ชิ้นส่วนพืช
ใบ	0
ข้อ	1-3
ปลายยอด	4-6



ภาพที่ 1 ต้นเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการเกิดจำนวนยอดรวมของชิ้นส่วนใบ (A) ข้อ (B) และปลายยอด (C) ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

1.3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมในการชักนำยอดรวม

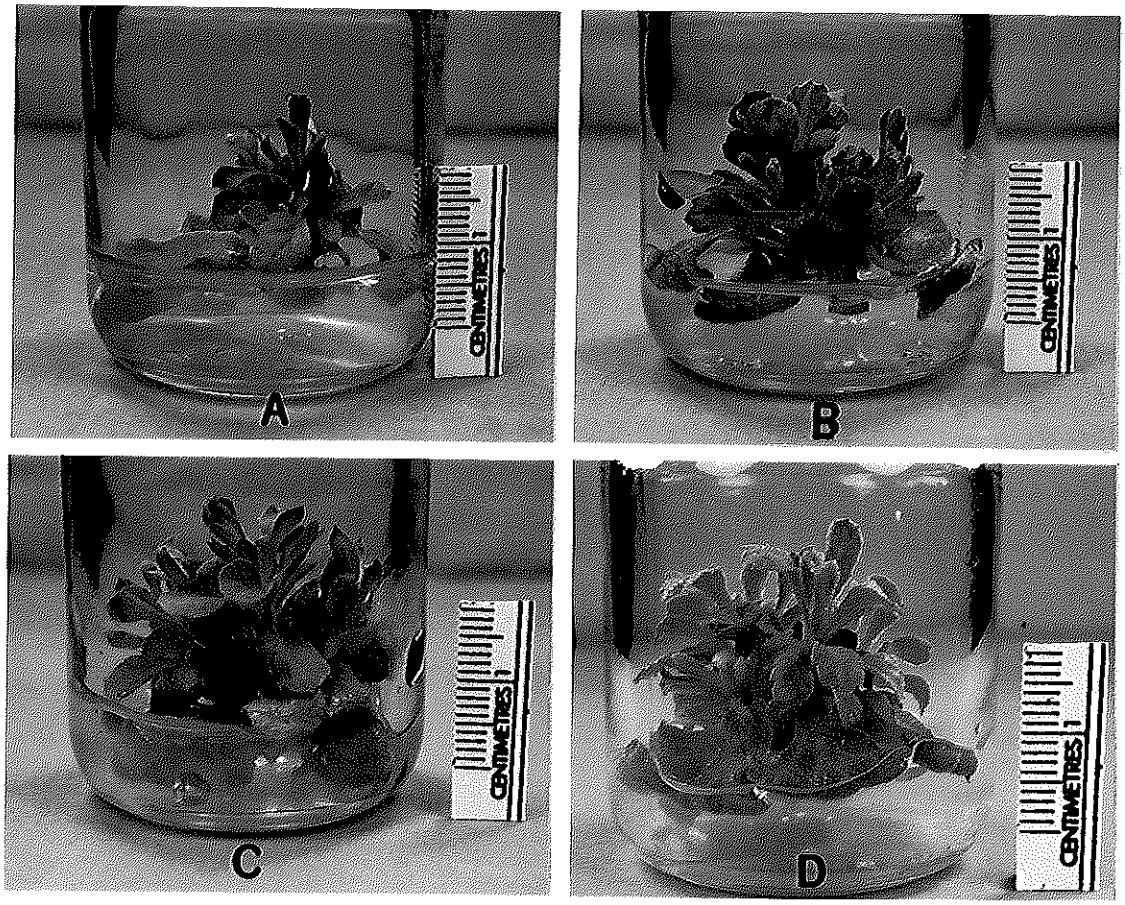
จากผลการทดลองในข้อ 1.2 พบว่า ชิ้นส่วนข้อและปลายยอดสามารถเกิดยอดรวมได้ แต่ชิ้นส่วนของปลายยอดเกิดยอดรวมได้มากกว่า ดังนั้นจึงนำปลายยอดมาชักนำให้เกิดจำนวนยอดให้ได้มากกว่าเดิม โดยการนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากในเวลา 4 สัปดาห์ โดยที่ความเข้มข้นของ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดรวมได้ 4.40 ยอด ส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้เท่ากับ 5.36 ยอด ที่ความเข้มข้นของ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้มากที่สุด คือ 8.32 ยอด และที่ความเข้มข้นของ BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ 6.55 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชทั้งหมด ซึ่งสามารถชักนำยอดได้น้อยกว่าที่ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดรวมในเวลา 4 สัปดาห์

MS+ BA(mg/l)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืชทั้งหมด
1.0	4.40c[1]
2.0	5.36c
3.0	8.32a
4.0	6.55b
F-Test	**
C.V. (%)	13.5

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 3 จำนวนยอดรวมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) และ BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4 การชักนำรากจากยอดที่ได้

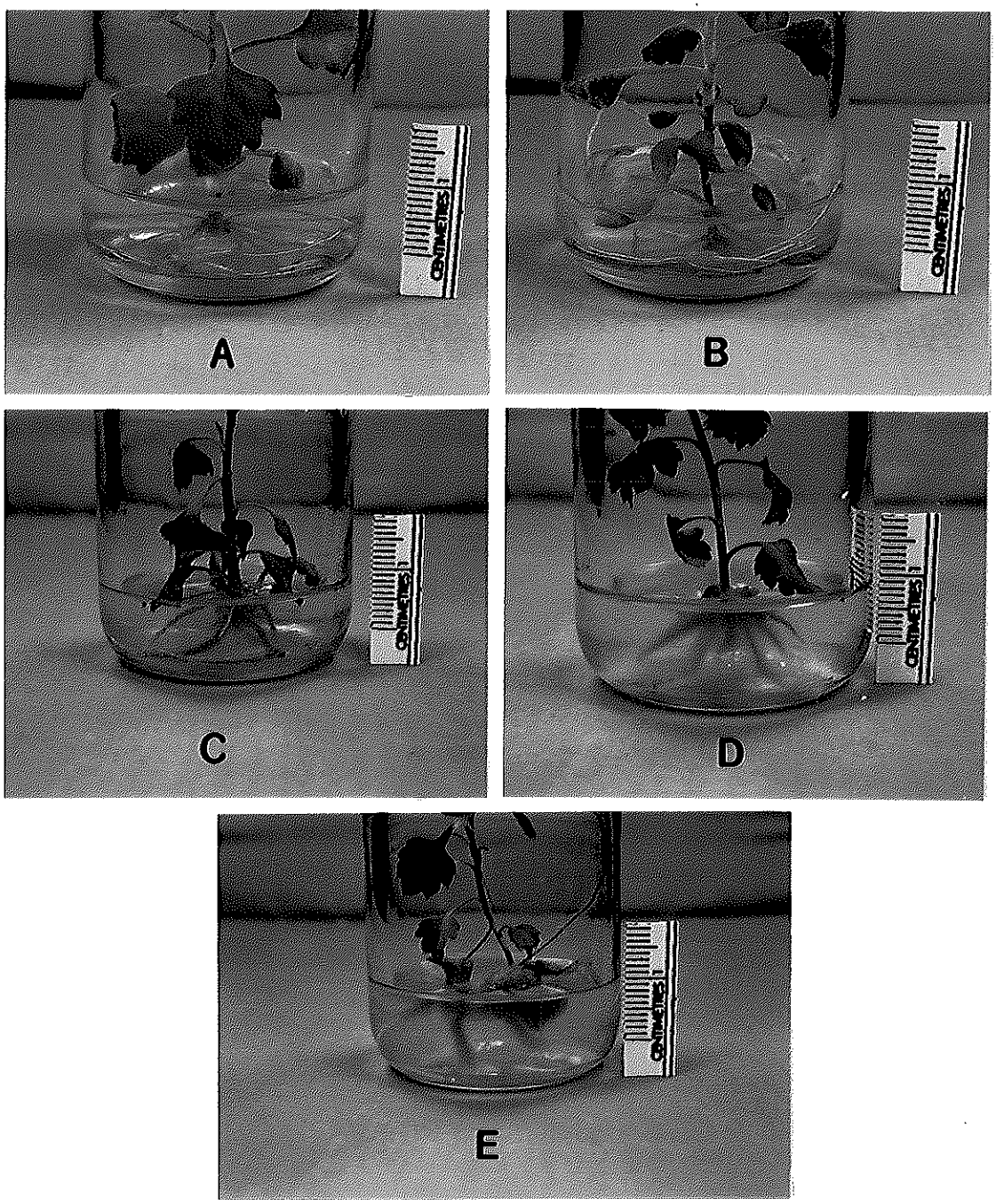
เมื่อได้ยอดจากข้อ1.3 แล้วนำมาชักนำรากในอาหารสูตร MS, half MS และ MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ เช่น NAA, IBA และ IAA พบว่าในอาหารสูตร half MS สามารถชักนำรากได้มากที่สุดคือ 6.06 รากต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 100% แต่เมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก พบว่ารากที่ได้จากการชักนำในอาหารสูตร half MS จะผอม ยาวและมีการแตกแขนง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรากที่ชักนำได้จากสูตร MS ที่มี NAA พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดีกว่า คือ มีรากยาว อวบ และสมบูรณ์ ซึ่งลักษณะรากเช่นนี้สามารถดูดสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดรากน้อยกว่า คือ 87.5% และมีจำนวนรากต่อต้น 5.87 แต่เมื่อพิจารณาจำนวนรากต่อต้นโดยเปรียบเทียบทางสถิติแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพราะฉะนั้นอาหารสูตร MS ที่มี NAA จึงเป็นสูตรอาหารที่ชักนำรากได้ดีที่สุด ส่วนในสูตรอาหารที่มี IAA และ IBA มีเปอร์เซ็นต์การชักนำรากได้น้อยคือ 69.1 และ 60% สามารถชักนำรากต่อต้นได้ 4.00 และ 3.81 รากต่อต้น ตามลำดับ นอกจากนั้นทั้ง 2 สูตรนี้ยังเกิดแคลลัสอีกด้วย (ตารางที่ 3 และภาพที่4)

ตารางที่ 3 ผลของชนิดอาหารและออกซินต่อการชักนำราก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ในสูตรอาหารต่าง ๆ

สูตรอาหาร	จำนวนรากต่อต้น	การเกิดราก (%)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
MS	5.31ab[1]	83.3a	ยาว ผอม
Half MS	6.06a	100.0a	ยาว ผอม แตกแขนง
MS+NAA 1 mg/l	5.87a	87.5a	อวบ สมบูรณ์
MS+IAA 1 mg/l	4.00bc	69.1b	แคลลัส ขนราก
MS+IBA 1 mg/l	3.81c	60.0c	แคลลัส ขนราก
F-Test	**	**	
C.V. (%)	17.4	4.0	

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 4 การชักนำรากในอาหารสูตรต่าง ๆ คือ อาหารสูตร MS (A) อาหารสูตร half MS (B) อาหาร สูตร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร(C) อาหารสูตร MS ที่มี IAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) และ อาหารสูตร MS ที่มี IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (E) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

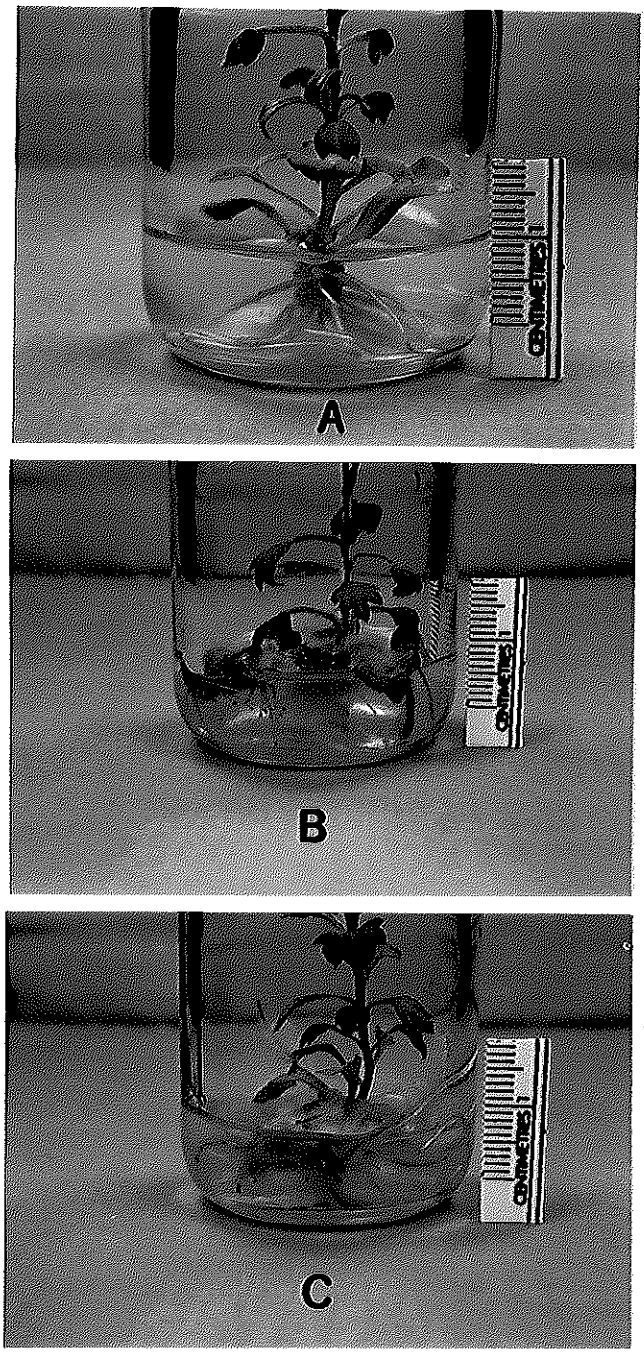
จากการทดลองข้างต้นพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากคือ สูตร MS ที่มี NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงได้นำสูตรอาหารนี้มาหาความเข้มข้นของ NAA ที่เหมาะสมในการชักนำรากโดยใช้ความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงไป 3 สัปดาห์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้มากที่สุด คือ 5.68 รากต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์การชักนำราก 87.5% ซึ่งมากกว่าที่ความเข้มข้นของ NAA 2.0 และ 3.0 คือ 66.6 และ 56.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และเมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐาน พบว่าที่ความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รากที่ได้อวบและสมบูรณ์ ส่วนที่ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 เกิดแคลลัส (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 ผลของ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชักนำรากเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

อาหารสูตร MS+NAA	จำนวนรากต่อต้น	การเกิดราก(%)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
1.0	5.68a[1]	87.5a	อวบ สมบูรณ์
2.0	4.06b	66.6b	แคลลัส ขนราก
3.0	3.56b	56.2c	แคลลัส ขนราก
F-Test	**	**	
C.V.(%)	11.6	6.4	

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 5 การชักนำรากในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) และ NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 3 สัปดาห์

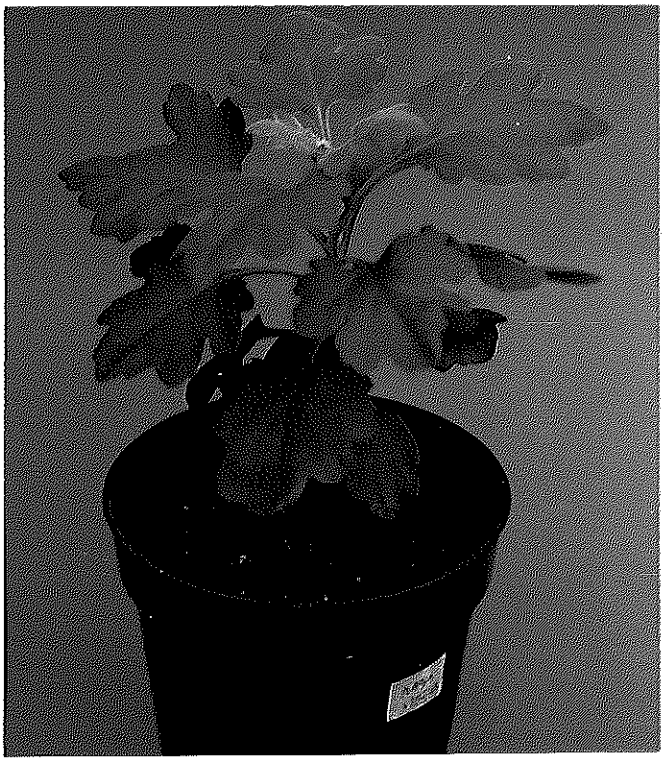
1.5 การอนุบาลต้นเบญจมาศในดิน

จากการนำต้นสมบูรณ์ไปปรับสภาพโดยนำไปเพาะเลี้ยงในเวอร์มิคูไลต์ ก็จะได้ต้นสมบูรณ์มากขึ้น โดยมียอดยืดยาวออก และลำต้นแข็งแรง (ภาพที่ 6) จากนั้นจึงย้ายไปปลูกในดิน และดูแลรักษาตามปกติเหมือนดูแลพืชในธรรมชาติ (ภาพที่ 7) และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% เมื่อสังเกตการเจริญเติบโตทุก ๆ 15 วัน (ตารางที่ 5) เมื่อเพาะเลี้ยงต้นเบญจมาศในดินเป็นระยะเวลา 4-5 เดือน ก็จะออกดอกโดยดอกที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์เหมือนในธรรมชาติ (ภาพที่ 8 และ 9)

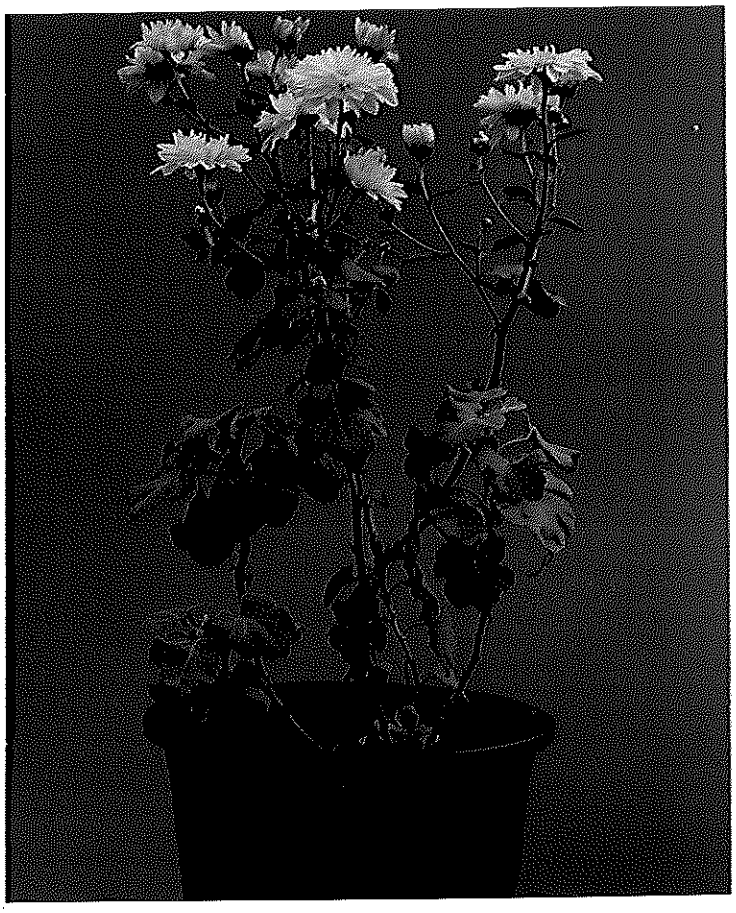
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเบญจมาศเมื่อย้ายไปปลูกในดิน

เวลา (วัน)	การรอดชีวิต (%)
15	100
30	100
45	100
60	100

ภาพที่ 6 ต้นเบญจมาศเมื่อนำมาปรับสภาพในเวอร์มิคูไลต์



ภาพที่ 7 ต้นเบญจมาศที่ย้ายมาปลูกในดิน



ภาพที่ 8 ต้นเบญจมาศหลังจากย้ายปลูกในดินเป็นเวลา 4-5 เดือน

ภาพที่ 9 ดอกเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อหลังจากย้ายไปปลูกในดินเป็นเวลา 4-5 เดือน

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของใบเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์

2.1.1 ชนิดของเอนไซม์และเวลาในการอินคูเบท

จากการทดลองหาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% (E4) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ออกมาได้จำนวนมากที่สุดคือ $1.89x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% (E1) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวน $0.91x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ผสมที่แยกโพรโทพลาสต์ออกมาได้น้อยที่สุดคือ เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% (E2) ส่วนที่เวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์ชุด E4 และ E1 สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้ใกล้เคียงกัน คือ $1.38x10^5$ และ $1.28 x10^5$ ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.25% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.25% (E3) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้น้อย และที่เวลา 5 ชั่วโมง เอนไซม์ชุด E4 ก็ยังสามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติสำหรับ E2 และE3 ให้จำนวนโพรโทพลาสต์น้อยที่สุด คือ $0.37 x10^5$และ $0.29 x10^5$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เอนไซม์ชุด E1 และ E2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสม 2 ชนิด แยกโพรโทพลาสต์ได้มากที่เวลา 4 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 5 ชั่วโมง ส่วน E3 และ E4 ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสม 3 ชนิด ให้โพรโทพลาสต์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 และลดลงเมื่อใช้เวลานานขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ เพราะฉะนั้น ชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ คือ E4 ส่วนเวลาที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์คือ ที่เวลา 3 ชั่วโมง เพราะสามารถให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด

ตารางที่ 6 ผลของชนิดเอนไซม์และเวลาในการอินคูเบทต่อจำนวนโพรโทพลาสต์

เอนไซม์ (% w/v)	โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (x 10^5)			F-Test
	3 h	4h	5h	
E1= 2.5 % Cellulase onozuka R-10 + 0.5 % Driselase	0.91b[1]	1.28a	0.87b	
E2= 2.5 % Cellulase onozuka R-10 + 0.5 % Macerozyme R-10	0.45d	0.52b	0.37c	
E3= 2.5 % Cellulase onozuka R-10 + 0.25% Driselase + 0.25 % Macerozyme R-10	0.56c	0.38c	0.29c	
E4= 2.5 % Cellulase onozuka R-10 + 0.5 % Driselase + 0.5 % Macerozyme R-10	1.89a	1.38a	1.01a	
F – Test				**
C.V. (%)				7.8

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.1.2 น้ำหนักใบ

จากการทดลองหาน้ำหนักของใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ ที่เวลา 3 ชั่วโมงโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% โดยใช้น้ำหนักใบที่ 0.20, 0.40 และ 0.60 กรัม น้ำหนักสด ในสารละลายเอนไซม์ 5.0 มิลลิลิตร พบว่า ที่น้ำหนักใบ 0.20 กรัม สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวน 1.87×10^5 ส่วนที่น้ำหนักใบ 0.40 กรัม ให้จำนวนโพรโทพลาสต์ออกมามากกว่าที่น้ำหนักใบอื่น ๆ คือ 2.32×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และที่ 0.60 กรัม ให้โพรโทพลาสต์ออกมาได้น้อยที่สุดคือ 0.89×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ แสดงว่าที่ 0.40 กรัม สามารถให้โพรโทพลาสต์ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 น้ำหนักใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% ที่เวลา 3 ชั่วโมง

น้ำหนักใบ (กรัม)	โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (x 10^5)
0.20	1.87b[1]
0.40	2.32a
0.60	0.89c
F-Test	**
C.V.(%)	7.5

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

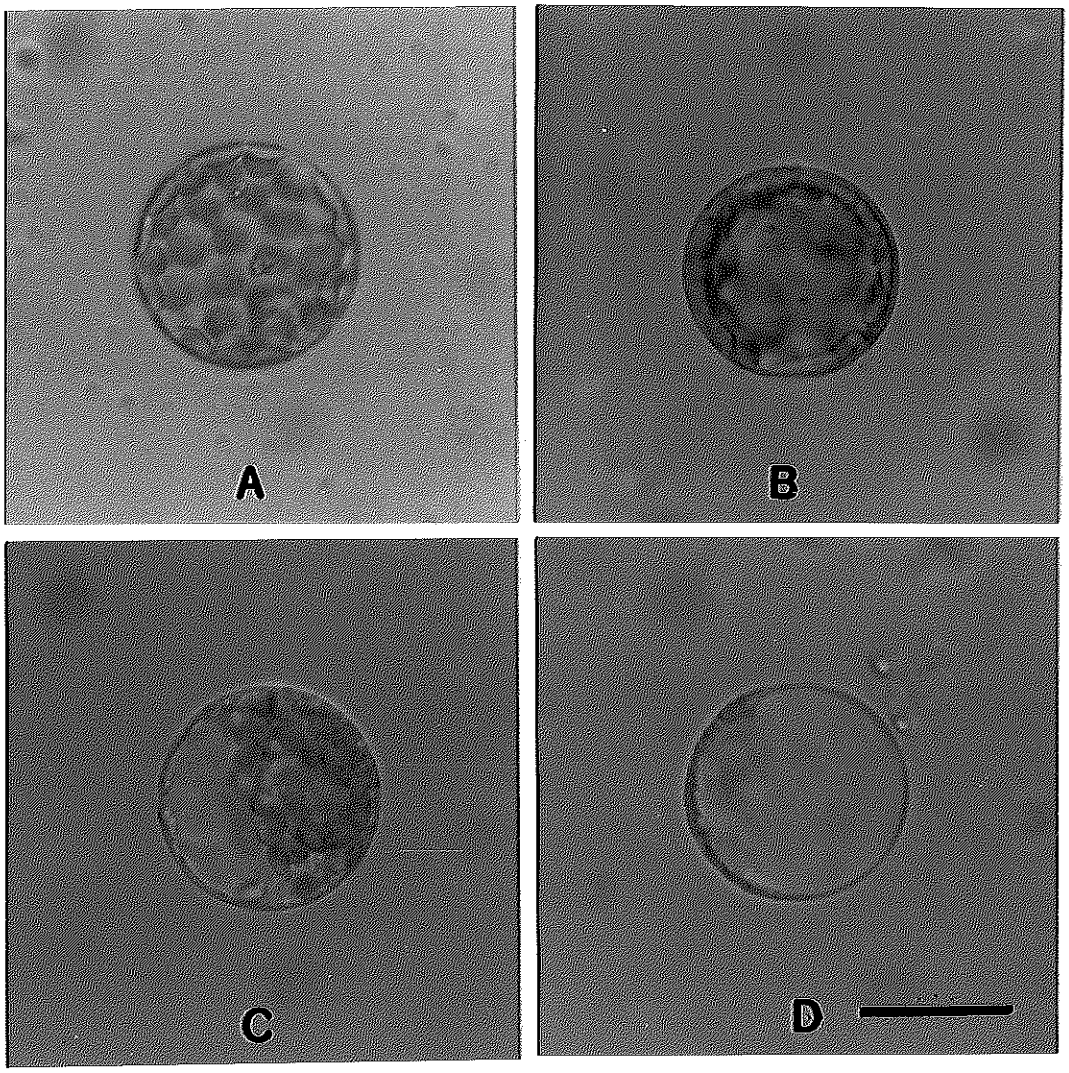
2.1.3 การเก็บใบไว้ในที่มืด

จากการทดลองแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้ใบที่เก็บในไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์เปรียบเทียบกับใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด โดยใช้เวลาในการบ่มที่ 3 ชั่วโมง ในเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับ ไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และมาเซอไรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% เอนไซม์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักใบ 0.40 กรัม พบว่าใบที่เก็บไว้ในที่มืดก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์จะให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากกว่าใบที่ไม่ได้เก็บไว้ในที่มืดคือ 1.52×10^5 และ 1.40×10^5 ตามลำดับ แต่เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว พบว่าข้อมูลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) และลักษณะโพรโทพลาสต์ที่แยกได้มีลักษณะกลม ภายในโพรโทพลาสต์มีทั้งคลอโรพลาสต์ที่เต็มเซลล์ เรียงชิดเยื่อหุ้มเซลล์ คลอโรพลาสต์ที่เรียงชิดด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์และโพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์น้อย (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 8 ผลของการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้ใบที่เก็บในที่มืดและไม่ได้เก็บในที่มืด ในเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% ที่เวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้น้ำหนักใบ 0.4 กรัมน้ำหนักสด

สภาวะ	โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x 10^5$)
ใบที่เก็บในที่มืด	1.52
ใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด	1.40
T-Test	NS

NS ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 10 ลักษณะโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส 0.5% และ มาเซอโรไซม์ 0.5% ที่เวลา 3 ชั่วโมง ใช้น้ำหนักใบ 0.4 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 5.0 มิลลิลิตร ได้แก่ โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เต็มเซลล์ (A) โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (B) โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เรียงชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง (C) และโพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์น้อย (D) (bar = 20 μm)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากเอนไซม์เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส 0.5% และมาเซอโรไซม์ 0.5% ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมงโดยใช้สีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด พบว่าโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเขียวเหลือง (ภาพที่ 11A) และที่เวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์สูงที่สุด คือ 87.8% ส่วนที่เวลา 4 และ 5 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 61.5 และ 50.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) จะเห็นว่า ถ้าใช้เวลาในการแยกโพรโทพลาสต์นานทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำ

ตารางที่ 9 ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซี เลส เข้มข้น 0.5% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ (%)
3	87.8a[1]
4	61.5b
5	50.0c
F-test	**
C.V. (%)	3.5

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

จากการทดลองนำโพรโทพลาสต์จำนวน $1x10^5$ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าโพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ส่วนโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะไม่เกิดการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งในการทดลองพบว่าโพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง

2.3 สูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โดยใช้อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวในอาหาร 3 สูตรคือ สูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต อาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 2% และอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อาหารทุกสูตรส่งเสริมการสร้างผนังเซลล์ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์ที่เกิดการสร้างผนังเซลล์ใกล้เคียงกันคือ 29, 33.3 และ 25 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) โดยสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 2% สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ดีที่สุดคือ 33.3% และพบว่าโพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์จะเรืองแสงสีขาวที่บริเวณผนังเซลล์เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอร์ไวท์ (ภาพที่ 11B)

ตารางที่ 10 ผลของสูตรอาหารต่างๆ ในการสร้างผนังเซลล์ของเบญจมาศ

สูตรอาหาร	การสร้างผนังเซลล์ (%)
MS (no growth regulator)	29.0b
MS + 1 mgl^{-1}NAA + 0.1 mgl^{-1}2,4-D + 0.6 mgl^{-1}BA + 2 % CW	33.3a
MS + 1 mgl^{-1}2,4-D + 0.2 mgl^{-1}BA	25.0b
F-Test	*
C.V. (%)	9.7

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีDMRT

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 10) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 2% และใช้แมนนิทอล 0.6 M เป็นสารละลายออสโมติคัม ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงนำสูตรอาหารนี้มาดัดแปลงเพื่อหาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมในการทำให้โพรโทพลาสต์แบ่งเซลล์ โดยนำมาเพิ่มซูโครส ลดความเข้มข้นของสารละลายออสโมติคัม และเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีหรือไม่มี 2,4-D และน้ำมะพร้าว พบว่า สูตรอาหารที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 2% ที่ลดความเข้มข้นของสารละลายออสโมติคัมลงทีละ 0.1 M ทุกวัน จนกระทั่งถึง 0.3 M ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงที่สุด คือ 25.18 (ภาพที่ 11C) รองลงมาคือสูตรอาหารที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 2% และใช้แมนนิทอล 0.6 M ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ให้การสร้างผนังเซลล์มากที่สุด และสูตรอาหาร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 2% และแมนนิทอล 0.6 M ให้การแบ่งเซลล์ 14.88%

จากผลการทดลองจะเห็นว่า สูตรอาหาร MS ที่มีการเติมน้ำมะพร้าวส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำมะพร้าวเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นเท่ากัน สำหรับสูตรอาหาร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 2% ที่มีการเปลี่ยนสารละลายปรับแรงดันออสโมติกจากน้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M เป็นน้ำตาลซูโครส 0.6 M ไม่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมซูโครส 3% ก็พบว่าไม่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการแตกหน่ออีกด้วย (ภาพที่ 11D) ส่วนอาหารสูตรที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติม 2,4-D และมีหรือไม่มีน้ำมะพร้าวให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์น้อยที่สุด (ตารางที่ 11) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่า โพรโทพลาสต์ยังไม่มีการพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนี

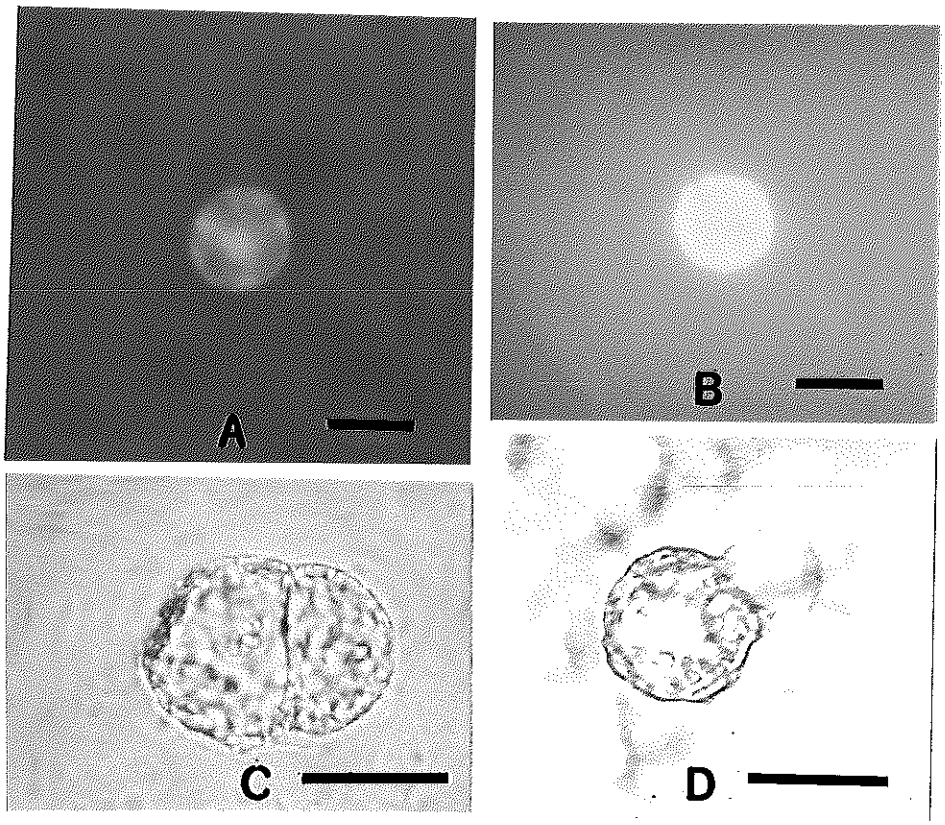
ตารางที่ 11 สูตรอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแบ่งเซลล์

สูตรอาหาร MS						การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ
NAA	BA	2,4-D	C W 2%	Sucrose	Mannitol 0.6 M	(%)	(%)
1	0.6	0.1	+	-	+	15.26b[1]	-
1	0.6	0.1	+	-	ลดโมลาร์[2]	25.18a	-
1	0.6	0.1	+	3%	+	11.43d	2.62
1	0.6	0.1	+	0.6 M	-	11.72d	-
1	0.5	-	-	-	+	11.99d	-
1	0.5	-	+	-	+	14.88b	-
1	1.0	-	-	-	+	11.50d	-
1	1.0	-	+	-	+	13.01c	-
1	1.5	-	-	-	+	7.02e	-
1	1.5	-	+	-	+	7.77e	-
F-Test						**	
C.V. (%)						3.9	

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

[1]ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

[2]ลดโมลาร์ทำได้โดย ลดสารละลายปรับแรงดันออสโมติกลงทีละ 0.1 M ทุกวัน จากแมนนิทอล 0.6 M จนกระทั่งเป็น 0.3 M



ภาพที่ 11 (A) โพรโทพลาสต์ที่ตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด

(B) โพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟอร์ไวท์

(C) โพรโทพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์

(D) โพรโทพลาสต์ที่มีการแตกหน่อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี ซูโครส 3%

(bar = 20 μm)

บทที่ 4

วิจารณ์

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ

1.1 การเตรียมต้นกล้าที่ปลอดเชื้อ

จากการนำเมล็ดเบญจมาศมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% นาน 2 นาที เพื่อช่วยทำความสะอาดเมล็ดก่อนที่จะนำไปฟอกฆ่าเชื้อโดยคลอรอกซ์เข้มข้น 20% หยดทวีน 20 จำนวน 1-2 หยด นาน 20 นาที การหยดทวีน 20 เพื่อช่วยให้คลอรอกซ์เข้าไปสัมผัสกับผิวของเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น ซึ่งระดับของคลอรอกซ์จะมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและการปลอดเชื้อ โดยถ้าใช้คลอรอกซ์ความเข้มข้นต่ำ ๆ จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อต่ำ แต่อัตรารอดชีวิตสูง ในทางตรงกันข้าม ถ้าใช้ระดับความเข้มข้นของคลอรอกซ์สูง ๆ จะทำให้ปลอดเชื้อสูงแต่อาจมีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อด้วย ดังนั้นจึงควรใช้ระดับความเข้มข้นของคลอรอกซ์ที่ทำให้ความปลอดเชื้อและอัตรารอดชีวิตสมดุลกันซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าที่ระดับคลอรอกซ์ 20% ฟอกฆ่าเชื้อนาน 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 98% ในการฟอกฆ่าเชื้อ

1.2 การชักนำยอดจากชิ้นส่วนของใบ ข้อ และปลายยอด

จากการทดลองชักนำต้นโดยใช้ชิ้นส่วนของใบ ข้อ และปลายยอด โดยใช้ชิ้นส่วนของใบคู่ที่ 2 และ 3 เพราะว่าชิ้นส่วนดังกล่าวเป็นชิ้นส่วนที่อ่อน ซึ่งใบอ่อนจะมีศักยภาพในการเจริญได้ดีกว่าใบแก่ แต่จากผลการทดลอง พบว่าชิ้นส่วนใบไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงมีสีน้ำตาลอาจเป็นเพราะว่าเกิดจากสารควบคุมการเจริญที่ใช้เข้มข้นมากเกินไปไม่เหมาะสมกับการชักนำให้เกิดยอดหรือไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์ และอาหารเพาะเลี้ยงมีสีคล้ำเนื่องจากเกิดการออกซิเดชั่นของสารประกอบพวกฟีโนลิก (phenolic compound) ที่ปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของเนื้อเยื่อที่ถูกตัดทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและเป็นพิษ ซึ่งวิธีการแก้ไขสามารถทำได้โดย ย้ายเลี้ยง (subculture) ให้บ่อยครั้ง หรือวางชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่ให้แผลสัมผัสกับอาหารโดยตรงหรือใช้อาหารเหลวจึงจะช่วยขจัดผลของสาร

ฟีโนลิกและสารยับยั้งการเจริญเติบโตอื่น ๆ ได้ (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540) ส่วนชิ้นส่วนของข้อ (ซึ่งมีตาข้าง) และปลายยอดจากผลการทดลอง พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เหมือนกัน เนื่องจากทั้งปลายยอดและข้อมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญของพืชดอกจะมีศักยภาพในการเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอนินทรีย์ จะเห็นว่าปลายยอดสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าข้อ เพราะว่าข้อมีเฉพาะตาข้างแต่ปลายยอดจะมีทั้งตาข้างและตายอดจึงชักนำยอดได้มากกว่า ได้มีงานวิจัยหลายเรื่องที่นิยมใช้ปลายยอดในการขยายพันธุ์ เช่น Kushal และคณะ (1994) ได้นำยอดเบญจมาศสายพันธุ์ Riot เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ภายใน 12 สัปดาห์ Sangwan และคณะ (1987) ได้ใช้ปลายยอดของเบญจมาศ ลิ้นมังกร และมันฝรั่ง ในการชักนำยอด เช่นกัน นอกจากนี้พืชในวงศ์เดียวกับเบญจมาศเช่น เยอบีร่า จากการรายงานของ Murashige และคณะ (1974) ใช้ปลายยอด เยอบีร่า (*Gerbera jamesonii*) มาชักนำยอดรวมในอาหารสูตร MS ที่มี KN ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0, 10.0 และ20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าสูตร MS ที่มี KN 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้มากที่สุด

1.3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมในการชักนำยอดรวม

เมื่อนำชิ้นส่วนปลายยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในทุกความเข้มข้นสามารถชักนำยอดรวมได้ ทั้งนี้เพราะว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีผลในการชักนำยอดรวมได้ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้มากที่สุดถึง 8.32 ยอดต่อชิ้นส่วนปลายยอด 1 ชิ้นส่วน แต่ที่ความเข้มข้นของ BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ 6.55 ยอด ซึ่งสามารถชักนำยอดรวมได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าที่ความเข้มข้นของ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดเบญจมาศในสายพันธุ์นี้ ในขณะที่ความเข้มข้นของ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดรวมในเบญจมาศสายพันธุ์ Riot (Kushal *et al*., 1994) แสดงว่าสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อปริมาณของ BA ต่างกัน นอกจากนี้ Barbosa และคณะ (1993) ได้เพิ่มจำนวนยอดของเยอบีร่า (*Gerbera jamesonii*) ในอาหารสูตร MS ที่มี BA 3.0, 6.0 และ9.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดจำนวนยอดรวมได้ 2 ต้น ส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดได้ 3 ยอด แต่ที่ 9.0 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำยอดได้เพียง 1 ยอด แสดงว่าระดับของ BA

ที่ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำยอดเยอบีร่าในสายพันธุ์นี้ ทำนองเดียวกันกับ Hosoki และคณะ (1995) พบว่า ที่ความเข้มข้นของ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำยอดรวมของทานตะวัน (*Helianthus decapetalus* L.) ได้มากที่สุด ซึ่งระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของพืช

อิทธิพลของ BA ที่มีต่อการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเบญจมาศนั้นสอดคล้องกับการทดลองในพืชไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิดเช่น Takayama และ Misawa (1982) รายงานถึงการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนก้านใบของต้นบีโกเนียในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ BA 0.3-1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ได้ดี นอกจากนี้ Norton และ Boe (1982) เพาะเลี้ยงปลายยอดของพืชในสกุลกุหลาบบนอาหารสูตร LS (Linsmaier และ Skoog, 1965) ร่วมกับ BA 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดได้มากที่สุด

1.4 การชักนำรากจากยอดที่ได้

จากการทดลองนำยอดมาชักนำรากในอาหารสูตร MS, half MS และ MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ เช่น NAA, IBA และ IAA พบว่า ในอาหารสูตร half MS สามารถชักนำรากได้มากที่สุด ซึ่ง Bhattacharya และคณะ (1990) ชักนำรากเบญจมาศ (*Chrysanthmum morifolium*) โดยใช้สูตร half MS ส่วน Fuji และ Shimizu (1990) ก็พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำรากเบญจมาศ (*Chrysanthemum coccineum*) ได้ต้นที่สมบูรณ์เช่นกัน จากผลการทดลองนี้พบว่า สูตร half MS และ MS สามารถชักนำรากได้มากก็จริง แต่เมื่อดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากแล้วพบว่ารากมีลักษณะยาว และผอม ซึ่งเป็นรากที่ไม่เหมาะในการดูดสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อเปรียบเทียบกับรากที่ชักนำได้ในสูตรอาหาร MS ที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้รากที่สมบูรณ์แข็งแรงกว่า นอกจากจะดูดสารอาหารไปใช้ได้ดีแล้วยังช่วยพยุงต้นได้อีกด้วย ส่วน IBA และ IAA สามารถชักนำให้เกิดรากและแคลลัส แต่ก็มีงานวิจัยบางเรื่องที่มีการชักนำรากโดยใช้ IBA และ IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งจากรายงานของ Kushal และคณะ (1994) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากของเบญจมาศสายพันธุ์ Riot คือ สูตร MS ที่มี IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Lazar และ Cachita (1983) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากของเบญจมาศสายพันธุ์ super yellow คือ MS ที่มี IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จากผลการทดลองนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำ

รากคือ NAA ซึ่งทั้ง IBA และ IAA ไม่เหมาะสมกับการชักนำรากเบญจมาศในสายพันธุ์นี้ แต่อาจจะเหมาะกับการชักนำรากในเบญจมาศสายพันธุ์อื่น เช่น สายพันธุ์ Riot และ super yellow ตามลำดับ แสดงว่าสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมือนกัน

1.5 การอนุบาลต้นเบญจมาศในดิน

ก่อนที่จะนำต้นเบญจมาศไปปลูกลงดินในช่วงแรกจะต้องมีการดูแลในเรื่องความชื้นเป็นอย่างดี Selvapandiyan และคณะ (1988) รายงานว่าปากใบของพืชที่อยู่ในหลอดทดลองแตกต่างจากปากใบพืชในธรรมชาติ คือปากใบของพืชในหลอดทดลองจะเปิดอยู่ตลอดเวลา เพราะในหลอดทดลองมีความชื้นสูงกว่าสภาพแวดล้อมภายนอก หากนำพืชในหลอดทดลองออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติระบบการทำงานของปากใบจะเปิดปิดไม่ดีทำให้มีการสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็ว ฉะนั้นในการนำต้นเบญจมาศไปปรับสภาพในเวอร์มิคูไลต์ ในช่วงแรกจะต้องรดน้ำและปิดฝาขวดไว้ก่อน จากนั้นจึง ค่อย ๆ เปิดฝาในเวลาต่อมา เมื่อต้นเบญจมาศแข็งแรงดีแล้วจากนั้นจึงย้ายไปปลูกในดิน ปิยรัตน์ บุษบงก์ไพฑูรย์ (2542) ได้ปรับสภาพต้นกล้าดาวเรืองก่อนที่จะปลูกลงดิน โดยปลูกในกระบะโฟมและรองกระบะโฟมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ให้ความชื้นแก่ต้นดาวเรืองโดยการพ่นน้ำด้วยกระบอกฉีดน้ำ ให้วันละ 4 ครั้ง เฉพาะช่วงเวลากลางวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายต้นกล้าไปปลูกในกระถาง พบว่าต้นดาวเรืองที่มีลักษณะปกติจะรอดชีวิตทั้งหมด ส่วน Selvapandiyan และคณะ (1988) ได้ย้ายต้นกล้ายาสูบและต้นมันฝรั่ง ออกปลูกโดยใช้วิธีเคลือบผิวใบทั้ง 2 ด้าน ด้วยสารป้องกันการระเหยของน้ำ ได้แก่ กลีเซอรอล พาราฟิน และน้ำมัน (grease) ปรากฏว่าต้นกล้ารอดตายทั้งหมด อย่างไรก็ตามการปรับสภาพต้นกล้าก่อนปลูกในสภาพธรรมชาตินั้นวิธีการต่าง ๆ จะมีความเหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดเท่านั้น

ตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์

2.1.1 ชนิดของเอนไซม์และเวลา

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยผนังเซลล์แล้วได้จำนวนโพรโทพลาสต์ของเอนไซม์ 4 ชุด คือ เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% (E1) เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% (E2) เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น

2.5% ร่วมกับ ไดรซีเลส เข้มข้น 0.25% และมาเซอไรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.25% (E3) และเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และมาเซอ-ไรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% (E4) พบว่าเอนไซม์ชุด E4 สามารถย่อยผนังเซลล์แล้วให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด คือ 1.89×10^5 ส่วนเอนไซม์ผสม 2 ชนิด คือ E1 และ E2 จะเห็นว่าชุดเอนไซม์ที่มีไดรซีเลสสามารถแยกโพรโทพลาสต์ออกมาได้มากกว่า แสดงว่าใบเบญจมาศมีผนังเซลล์ที่หนาจึงต้องใช้เอนไซม์ไดรซีเลสมาร่วมกันในการย่อยผนังเซลล์ เพราะไดรซีเลสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสจึงย่อยผนังเซลล์ได้ดี และชุดเอนไซม์ที่มีมาเซโรไซม์จะแยกโพรโทพลาสต์ออกมาได้น้อยที่สุดเพราะเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์กลุ่มเพคทิเนสซึ่งจะใช้ในการแยกแต่ละเซลล์ให้ออกจากกัน เพราะฉะนั้นการใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันเพื่อแยกและย่อยผนังเซลล์ในเวลาเดียวกันจะทำให้ประหยัดเวลา แต่จากผลการทดลอง พบว่า E3 ซึ่งเป็นชุดเอนไซม์ที่มีเอนไซม์ 3 ชนิดทำงานร่วมกันสามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้น้อยกว่า E1 ที่มีเอนไซม์ผสม 2 ชนิด เพราะว่าเอนไซม์ชุด E3 มีความเข้มข้นของไดรซีเลสน้อยกว่าเอนไซม์ชุด E1 คือ ในเอนไซม์ชุด E3 ใช้ไดรซีเลส ที่ความเข้มข้น 0.25% ส่วนเอนไซม์ชุด E1 ใช้ไดรซีเลส 0.5% แต่ในเอนไซม์ชุด E1 ให้โพรโทพลาสต์สูงสุดที่ 4 ชั่วโมง ซึ่งการใช้เวลานานอาจจะมีผลต่อความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ และเมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์และเวลาของ E4 ที่ใช้ในการบ่ม พบว่า เวลานานไม่ได้ทำให้ได้โพรโทพลาสต์จำนวนมากเสมอไป แต่กลับทำให้ได้จำนวนโพรโทพลาสต์ลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าโพรโทพลาสต์ถูกย่อยจนแตกเสียหาย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา (2537) ที่รายงานว่า เมื่อเพิ่มระยะการบ่มนานขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์มะเขือเทศสีดาก็เริ่มลดลง และจากการทดลองพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้โพรโทพลาสต์จำนวนมาก คือที่เวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจะมีผลดีเพราะถ้าโพรโทพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลานานจะมีผลต่อความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์นั้นขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเป็นแหล่งโพรโทพลาสต์ เช่น Benmoussa และคณะ (1997) แยกโพรโทพลาสต์จากแคลลัสหน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้เอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเซลลูไลซิน (Cellulysin) 1% โรไซม์ (Rhozyme) 0.8% และมาเซอโรไซม์ 1% Witjaksono และคณะ (1998) ได้ใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์ 10 เข้มข้น 1% ร่วมกับมาเซอโรไซม์ 1% และเพคโตไลเอส วาย 23 (Pectolyase Y 23) เข้มข้น 0.2% ในการแยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของอะโวกาโด ส่วน Nan Zhao และคณะ (1995) ใช้เอนไซม์ที่ประกอบด้วย

เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์ 10 เข้มข้น 1% เพคโตไลเอส วาย 23 เข้มข้น 0.1% และเฮมิเซลลูเลส 0.1% ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบเลี้ยงของผักกาดก้านขาว ผักกาดกวางตุ้ง และผักกะหล่ำดอก สำหรับการทดลองนี้พบว่า เอนไซม์ผสม 3 ชนิดสามารถแยกโพรโทพลาสต์จากใบเบญจมาศ (*Chrysanthemum indicum*) ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lenee และ Chupeau (1986) ได้ใช้ชนิดของเอนไซม์เหมือนกับการทดลองนี้ กล่าวคือ ใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 0.1% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.05% และมาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น0.02% ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับเบญจมาศ นอกจากนี้ยังพบในไม้ดอก เช่น กล้วยไม้อะแรนด้า (*Aranda* Noorah Alsagoff) ที่มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 1%ร่วมกับ ไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.2% ในการแยกโพรโทพลาสต์ (Loh and Rao, 1985) ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสม 3 ชนิดในจำนวนนี้เป็นเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 2 ชนิด และเป็นเอนไซม์ที่แยกเซลล์อีก 1 ชนิด

2.1.2 น้ำหนักใบ

จากผลการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักใบสดกับความสามารถในการแยกโพรโทพลาสต์ของเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส เข้มข้น 0.5% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5% พบว่า น้ำหนักใบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเอนไซม์ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร คือน้ำหนักใบ 0.40 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งทำให้ได้โพรโทพลาสต์มากที่สุด จำนวนโพรโทพลาสต์หรือผลผลิตจากปฏิกิริยานี้มีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกัน 2 ปัจจัย คือ ปริมาณซับสเตรทกับปริมาณของเอนไซม์ ซึ่งจะต้องสมดุลกัน กล่าวคือ ซับสเตรทต้องไม่มากกว่าเอนไซม์ และเอนไซม์ต้องไม่มากกว่าซับสเตรทเพราะหากเอนไซม์มีมากกว่าซับสเตรท จะทำให้ซับสเตรทถูกย่อยอย่างรวดเร็ว และย่อยจนหมดเป็นเศษเซลล์แทนที่จะได้โพรโทพลาสต์และหากซับสเตรทมีมากกว่าเอนไซม์ ทำให้ต้องใช้เวลานานในการแยกโพรโทพลาสต์น้ำหนักใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ ขึ้นกับชนิดของพืชและปริมาตรของเอนไซม์ Loh และ Rao (1985) ใช้เอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า จำนวน 0.5 กรัมน้ำหนักสด ส่วน Vessabutr และ Grant (1995)ได้แยกโพรโทพลาสต์จากพืชในสกุลถั่ว (birdsfoot trefoil)โดยใช้ใบ 1.0 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 15 มิลลิลิตร และ Webb และคณะ (1994) ได้เอนไซม์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในการแยกโพรโทพลาสต์ผักกาดหอมจำนวน 3.0 กรัมน้ำหนักสด สำหรับน้ำหนัก

ใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ในการวิจัยครั้งนี้คือ 0.40 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 5.0 มิลลิลิตร

2.1.3 การเก็บใบไว้ในที่มืด

จากการทดลองใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.5% ร่วมกับไดรซีเลสเข้มข้น 0.5% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5%บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใช้ใบที่เก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์ เปรียบเทียบกับใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืดจำนวน 0.4 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 5.0 มิลลิลิตร พบว่าใบที่เก็บไว้ในที่มืดก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์สามารถให้โพรโทพลาสต์จำนวนมากกว่าใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสภาพที่มีแสง พืชมีการสังเคราะห์ และในการสังเคราะห์แสงพืชจะสร้างพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาล แป้ง เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ทำให้พืชสามารถสร้างผนังเซลล์ที่แข็งแรงได้เรื่อย ๆ เพราะฉะนั้นจึงต้องใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงและใช้ระยะเวลานานกว่าจะแยกโพรโทพลาสต์ออกมาได้ แต่ถ้าหากเก็บใบไว้ในที่มืดก่อนทำให้การสังเคราะห์แสงของพืชไม่เกิดขึ้น พืชไม่มีการสร้างผนังเซลล์เพิ่มขึ้น และในทางตรงกันข้ามผนังเซลล์กลับอ่อนแอลง เพราะพืชจำเป็นต้องใช้น้ำตาลในกระบวนการหายใจ แต่ในการทดลองนี้จำนวนโพรโทพลาสต์ที่ได้จากการแยกโพรโทพลาสต์ของใบที่เก็บในที่มืดก่อนการแยกหรือใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืดให้ผลการทดลอง ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าเมแทบอลิซึมของเบญจมาศในที่มืดและที่สว่างไม่ต่างกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) ซึ่งทำการแยกโพรโทพลาสต์จากใบองุ่นโดยนำใบไปเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์เปรียบเทียบกับใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด พบว่าจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่เก็บไว้ในที่มืดก่อนการแยกและใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

การตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ทำได้โดยการนำโพรโทพลาสต์ไปย้อมด้วยสี ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด โมเลกุลของสีจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในโพรโทพลาสต์ หากเป็นโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด ทำให้เกิดสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) เกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียวเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบ ฟลูออเรสเซนต์ (Power and Davey, 1990) เมื่อโพรโทพลาสต์ที่แยกได้

มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงโอกาสที่โพรโทพลาสต์จะเจริญแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัสย่อมมีสูงเพิ่มขึ้นและจากผลการตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์เบญจมาศ พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์เป็น 87.8% ซึ่งมากกว่าที่เวลา 4 และ 5 ชั่วโมง คือ 61.5 และ 50.0% ตามลำดับ ซึ่งในชั่วโมงที่ 3 โพรโทพลาสต์ที่แยกออกมาใช้เวลาอยู่ในสารละลายเอนไซม์น้อย จึงทำให้ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์สูง และในชั่วโมงที่ 5 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตน้อยที่สุด เพราะโพรโทพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์นาน จึงทำให้โพรโทพลาสต์สูญเสียความมีชีวิต

2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

นำโพรโทพลาสต์จำนวน $1x10^5$ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต จำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโพรโทพลาสต์ เนื่องจากโพรโทพลาสต์แต่ละโพรโทพลาสต์มีการแพร่สารเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่สร้างลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสารเหล่านี้จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของโพรโทพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao and Michayluk, 1975) โดยทั่วไปความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง $1x10^4$-$1x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสรีรวิทยาของพืชที่นำมาใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์ในขณะนั้น (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) จากการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โดยใช้สูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ใช้สารละลายแมนนิทอล 0.6 M เป็นสารออสโมติคัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว กึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง พบว่า โพรโทพลาสต์สร้างผนังเซลล์ได้ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวทำได้โดยใส่โพรโทพลาสต์ซัสเพนชั่นลงในจานเพาะเลี้ยงแล้วใส่อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวลงไป ทำให้โพรโทพลาสต์อยู่ในอาหารซึ่งช่วยรองรับ และวุ้นที่ใช้เป็นอะกาโรส ซึ่งพบว่าจะให้ผลดีในแง่ของความมีชีวิต และการสร้างสารพวก secondary metabolite นอกจากนี้ยังเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงได้ดีกว่า เนื่องจากมีสารปนเปื้อนที่เป็นพิษน้อยกว่า (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีสีน้ำตาลและตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงและเซลล์หดอาจเนื่องมาจากสารออสโมติคัมที่ใช้ (0.6 M แมนนิทอล) ไม่เหมาะกับโพรโทพลาสต์ทั้งนี้คงเป็นระดับของออสโมติคัมที่ค่อนข้างสูงจึงทำให้ปริมาณน้ำในโพรโทพลาสต์แพร่ออกมาทำให้เซลล์เหี่ยวและไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ และจากการทดลองโพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ภาย

ใน 24 ชั่วโมงซึ่ง Lindsay และ Ledger (1993) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของเบญจมาศ (*Dendranthema zawaskii* X *D. grandiflora*) พบว่าโพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ภายในเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โดยนำไปบ่มไว้ในที่มืดทุกวิธีการเพาะเลี้ยงซึ่งมยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) รายงานว่าโพรโทพลาสต์กล๊อกซีเนียเจริญได้ดีในที่มืด อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงในที่สว่างจะมีหยดน้ำจำนวนมากมาจับที่ฝาด้านในของจานเพาะเลี้ยง หยดน้ำที่จับอยู่นี้มาจากการระเหยของน้ำในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เมื่อมีการระเหยของน้ำในอาหารมาก ทำให้ระดับออสโมลาริตี้เปลี่ยนไป จึงทำให้โพรโทพลาสต์เจริญได้ไม่ดีต่างจากเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด การระเหยของน้ำในอาหารเกิดขึ้นน้อยมาก ทำให้น้ำในโพรโทพลาสต์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โพรโทพลาสต์จึงเจริญได้ดีกว่า ซึ่ง Webb และคณะ (1994) เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ใบผักกาดหอม ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับเบญจมาศ โดยบ่มไว้ในที่มืด พบว่า โพรโทพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เช่นเดียวกันกับ Loh และRoa (1985); Koh และคณะ (1988) ที่เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์กล้วยไม้อะแรนด้าในที่มืด

2.4 สูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

จากการทดลองใช้อาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์สูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต สูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรและ น้ำมะพร้าว 2% และสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารทีมี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรและ น้ำมะพร้าว 2% สามารถให้เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์มากที่สุด เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ส่วนใหญ่มักมีออกซินหนึ่งหรือหลายชนิดร่วมกับไซโทไคนินหนึ่งหรือสองชนิดเพื่อกระตุ้นการสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์และการเจริญของโพรโทพลาสต์ และโดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงมักเริ่มต้นด้วยออกซินในปริมาณที่สูง เช่น NAA หรือ 2,4-D ในปริมาณ 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโทไคนินในปริมาณต่ำ เช่น ที่ความเข้มข้น BA 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง จะเห็นว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของ BA ปริมาณสูง ๆ จะยับยั้งการแบ่งเซลล์ เช่นในสูตรอาหารที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์น้อยที่สุด และในสูตรอาหารที่ใช้มีการเติมน้ำมะพร้าว เนื่องจากอาหารที่มีน้ำมะพร้าวสามารถชดเชยการสูญเสียเกลือแร่และ

เมแทบอไลต์บางอย่างไปในระหว่างการแยกโพรโทพลาสต์ (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) นอกจากนี้น้ำมะพร้าวยังส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดี เพราะจากผลการทดลองในสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวทุกสูตรสามารถจะแบ่งเซลล์ได้มากกว่าสูตรที่ไม่มีน้ำมะพร้าว

ส่วนการเติมซูโครส 3% หรือ เปลี่ยนสารละลายปรับแรงดันออสโมติกจากแมนนิทอล 0.6 M เป็นซูโครส 0.6 M พบว่าไม่ส่งเสริมให้เกิดการแบ่งเซลล์ แต่จะมีการแบ่งเซลล์มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 2% และ น้ำตาลแมนนิทอล 0.6 M ที่มีการลดแรงดันออสโมติกลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ เกวลิน คุณาศักดากุล และ ประสาทพร สมิตะมาน (2543) ที่ได้เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการลดแรงดันออสโมติกของอาหารลง พบว่าโพรโทพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ได้ ซึ่งการลดแรงดันออสโมติกอย่างช้า ๆ ของอาหารมีความจำเป็นต่อการรักษาอัตราการแบ่งเซลล์ ไม่อย่างนั้นโพรโทพลาสต์ของเซลล์ที่เกิดใหม่จะเกิดพลาสโมไลซีส (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าโพรโทพลาสต์มีสีน้ำตาล ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Mill และ Hammerschlag (1994) ที่เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของใบท้อ (*Prunus persica*) เป็นระยะเวลา 2-3 สัปดาห์ พบว่า โพรโทพลาสต์มีสีน้ำตาลและไม่เจริญเติบโต ซึ่ง ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และ สมปอง เตชะโต (2543) รายงานว่าการที่โพรโทพลาสต์มีสีน้ำตาลนั้น อาจเนื่องมาจากการทับถมของโพรโทพลาสต์บริเวณจานเพาะเลี้ยง และคาดว่ามีการปลดปล่อยของเสีย ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทำให้โพรโทพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

บทที่ 5

สรุป

1. ชิ้นส่วนปลายยอดเบญจมาศสามารถชักนำยอดรวมได้มากกว่าชิ้นส่วนใบและข้อ
2. สูตรอาหารที่สามารถชักนำยอดรวมได้มากที่สุดคือ สูตร MS ที่มี BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. จำนวนยอดรวมที่ชักนำได้สูงสุดคือ 8.32 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช
4. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก คือ สูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
5. จำนวนรากที่ชักนำได้มากที่สุด คือ 5.68 รากต่อยอด และรากที่ได้มีลักษณะอวบและสมบูรณ์
6. เมื่อนำต้นสมบูรณ์ไปปลูกในดิน พบว่ามีชีวิตรอด 100 %
7. เอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโพรโทลาสต์ คือ เซลลูเลส 2.5% ร่วมกับไดรซีเลส 0.5% และ มาเซอโรไซม์ 0.5%
8. เวลาที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ คือ 3 ชั่วโมง
9. น้ำหนักใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ คือ 0.40 กรัมน้ำหนักสดต่อปริมาตรเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร
10. การเก็บใบไว้ในที่มืดก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์หรือไม่ได้เก็บในที่มืดไม่มีผลต่อการแยกโพรโทพลาสต์
11. จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้มากที่สุดในสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสม คือ $2.32x10^5$
12. ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ คือ 87.8%
13. โพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ภายใน 24 ชั่วโมง
14. โพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 2% และแมนนิทอล 0.6 M มีเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์สูงที่สุด คือ 33.3%
15. โพรโทพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 2% ที่มีการลดความดันออสโมติก และมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดคือ 25.18%

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน คุณาศักดากุล และ ประสาทพร สมิตะมาน. 2543. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของกล้วยไม้สกุลหวาย. รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 ณ. ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ 18-20 ตุลาคม 2543.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2539. เทคโนโลยีโพรโทพลาสต์ของพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 124 หน้า.

ปิยรัตน์ บุษบงก์ไพฑูรย์. 2542. การเพาะเลี้ยงดาวเรืองอเมริกัน (*Tegetes erecta* L.) ในหลอดแก้ว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปัจฉิมา สมิตะมาน, ประสาทพร สมิตะมาน และปัญญาศรี ธนศานติ. 2532. การผลิตพันธุ์เบญจมาศปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ. ว. เกษตร. 2 : 123-135.

ไพฑูรย์ กิจเกาสงฆ์. 2527. การผลิตเบญจมาศเพื่อการค้า. ว. แก่นเกษตร. 12 : 257-258.

มยุรี วุฒิสิทธิ์. 2539. การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์กล๊อกซีเนีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และ สมปอง เตชะโต. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและโปรโต-พลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.). ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 : 411-420.

วัลลภ พรหมทอง. 2541. ไม้ดอกยอดฮิต ตระกูลคอมโพซิเต้. สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพฯ.

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา. 2537. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มะเขือเทศ. ว. แก่นเกษตร. 22 : 133-138.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2534. ไม้ดอกกระถาง. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 241 หน้า.

สุเม อรัญนารถ. 2533. เบญจมาศพันธุ์ใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. กสิกร. 63 (5) : 420-425.

อำนวย คำตื้อ และเซอิบิ โอกะ.2537. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของผักสลัด. ว. แก่นเกษตร. 22 (1) 20-25.

Barbosa, M. H. P., Pinto, C. A. B. P., Pinto, J. E. B. P. and Innnecco, R. 1993. Effect of cytokinin and auxins on *in vitro* establishment of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem from young capitula. Ciencia Rural. 23 (3) :297-300.

Benmoussa, M., Mukhopadhy, S. and Desjardins, Y. 1997. Factors influencing regeneration from protoplasts of *Asparagus densiflorus* cv. Sprengeri. Plant Cell Reports 17 (2) : 123-128.

Bhattacharya, P., Day, S., Das, N. and Bhattacharyya, B. C. 1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. Plant Cell Reports 9 : 439-442.

Chen, Y. Z., He, X. D., Jiang, P. Y. and Wang, C. M. 1985. *In vitro* propagation of Chrysanthemum leaves. J. Jinagsu Agricultural College 6 : 33-36.

Cuenca, S., Amo-Macro, J. B. and Parra, R. 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). Plant Cell Reports 18 : 674-679.

Blackhall, N. W., Davey, M. R. and Power, J. B. 1994. Isolation, culture and regeneration of protoplasts. *In* Plant Cell Culture A Practical Approach. R. A. Dixon and R. A. Gonzales (Eds.) p. 27-39. Oxford University Press Inc., New york. 27-29.

Fuji, Y. and Shimizu, K. 1990. Regeneration of plants from achenes and petals of *Chrysanthemum coccineum*. Plant Cell Reports 8 : 625-627.

George, E. F., Puttock, D. J. M. and George, H. J. 1987. Plant Culture Media : Formulations and Uses. Vol. I. The Eastern Press Ltd., Reading Berks. England.

Henn, H.J., Wingender, R. and Schnabl, H. 1998. Regeneration of fertile plants from *Helianthus nuttallii* T&G and *Helianthus giganteus* L. mesophyll protoplasts. Plant Cell Reports 18: 288-291.

Hosoki, T., Ohta, K., Harisaki, M., Ohkawa, K., Vonk-Noordegraaf, C. and Hentig, W. V. 1995. *In vitro* propagation of thin-leaf sunflower (*Helianthus decapetalus* L.). Acta Horticulturae 397 : 125-128.

Ihsanul, H., Jehangir, K., Mukhtar, A. and Khattak, M. S. 1998. *In vitro* culture of Chrysanthemum. Sarhad J. Agri. 14 : 211-213.

Jaacov, J. B. and Langhans, R. W. 1972. Rapid multiplication of Chrysanthemum plants by stem-tip proliferation. HortScience 7 : 289-290.

Kanchanapoom, K. and Wuttisit, M. 1996. Regeneration from mesophyll protoplasts of Gloxinia. J. ISSAAS. 2 : 1-11

Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126 : 105-110.

Kim, J. C. and Lee, E. A. 1996. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus*. Plant Cell Reports 16 : 18-21.

Koh, M. C. Goh, C. J. and Loh, C. S. 1988. Protoplast isolation and culture of *Aranda hybrids*. Malayan Orchid Review 2 : 70-78.

Kothari, S. L. and Chandra, N. 1984. *In vitro* propagation of African-Marigold. HortScience 19 : 703-705.

Kushal, S., Arora, J.S. and Singh, K. 1994. *In vitro* multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Riot. J. Orn. Hort. 2 : 63-68.

Lazar, M. and Cachita, C. D. 1982. Micropropagation of Chrysanthemum II *In vitro* culture of shoot meristems. Productia Vegetala Horticultura 31 : 32-35.

Le, C. L., Julmi, C., Thomas, D. and Tschuy, F. 1999. *In vitro* regeneration and multiplication of *Gerbera jamesonii* Bolus. Revue Suisse de Viticulture 31 : 207-211.

Lee, T., Huang, M. E. E. and Pua, E. C. 1997. High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland Chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) *In vitro*. Plant Science 126 : 219-226.

Lenee, P. and Chupeau, Y. 1986. Isolation and culture of sunflower protoplasts (*Helianthus Annuus* L.) : Factors influencing the viability of cell colonies derived from protoplasts. Plant Science 43 : 69-75.

Lindsay, G.C. and Ledger, S.E.1993. A protoplast to plant system for the Chrysanthemum *Dendrantihema zawadskii* X.*D. grandiflora.* Plant Cell Reports 12 : 278-280.

Loh, C. S. and Rao, A. N. 1985. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Aranda* Noorah Alsagoff. Malayan Orchid Review 19 : 34-37.

Lu, C.Y., Nugent, G. and Wardley, T. 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). Plant Cell Reports 8 : 733-736.

May, R.A. and Trigiano, R.N. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 : 366-371.

Mill, D. and Hammerschlag, F. A. 1994. Isolation of cell and protoplast leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36 : 99-105.

Murashige, T., Serpa, M. and Jones, J. B. 1974. Clonal multiplication of Gerbera through tissue culture. HortScince 9 :175-180.

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

Nan Zhao, K., Bittisnich, D. J., Halloran, G. M. and Whitecross, M. I. 1995. Studies of cotyledon protoplast cultures from *Brassica napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. I : Cell wall regeneration and cell division. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 40 : 59-72.

Norton, M. E. and Boe, A. A. 1982. *In vitro* propagation of ornamental rosaceous plants. HortScience 17 : 190-191.

Oka, S., Muraoka, O., Abe, T. and Nakajima, S. 1999. Adventitious bud and embryoid formation in garland Chrysanthemum leaf culture. J. Japanese Society for Horticultural Science 68 : 70-72.

Okamura, M., Hayashi, T. and Miyazaki, S. 1984. Inhibiting effect of ammonium ion in protoplast culture of some Asteraceae plants. Plant Cell Physiol. 25 : 281-286.

Parthasarathy, V. A. and Nagaraju, V. 1995. Morphogenetic response of Gerbera shoot to benzylaminopurine. Annals of Plant Physiology 9 : 10-12.

Polgar, Z. and Krasnyanski, S. 1992. Plant regeneration from cell suspension and mesophyll protoplasts of *Helianthus maximiliani* (Schrad). Plant Science 87 : 191-197.

Power, J. B. and Davey, M. R. 1990. Protoplast of higher and lower plants : Isolation, culture and fusion. *In* Methods in Molecular Biology. Vol. 6, pp. 237-259. New Jersey. Humana Press.

Prasad, R. N. and Chaturvedi, H. C. 1988. Effect of season of collection of explants on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. Biologia Plantarum 30 : 20-24.

Rambaud, C., Dubois, J. and Vesseur, J. 1990. Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdeburg). Agronomie 10 : 767-772.

Sangwan, R. S., Detrez, C. and Sangwan-Norreel, B. S. 1987. *In vitro* culture of shoot tip meristems in some higher plants. Acta Horticulturae 2 : 661-666.

Selvapandiyan, A., Subramani, S., Bhatt, P. N. and Mehta, A. R. 1988. A simple method for direct transplantation of cultured plants to the field. Plant Science 56 : 81-83.

Street, H.E. 1977. Plant Tissue and Cell Culture. Great Britain : Black Well Scientific Publication.

Takayama, S. and Misawa, M. 1982. Factors affecting differentiation *in vitro* and a mass-prepagation scheme for *Begonia x hiemalis*. Scientia Horticulturae 16 : 65-75.

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

Vessabutr, S. and Grant, W. F. 1995. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from birdsfoot tritoil (*Lotus coniculatus*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41 : 9-15.

Webb, C.L., Davey, M.R., Lucas, J.A. and Power, J.B. 1994. Plant regeneration from mesophyll protoplast of *Lactuca perennis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38: 77-79.

Wildi, E., Schaffner, W. and Berger, B. K. 1998. *In vitro* propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. Plant Cell Reports 18 : 336-340.

Wingender, R., Henn, H. J., Barth, S., Voeste, D., Machlab, H. and Schnabl, H. 1996. A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts. Plant Cell Reports 15 : 742-745.

Witjaksono, A., Litz, R. E. and Grosser, J. W. 1998. Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill) protoplasts. Plant Cell Reports 18 : 235-242.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก	มิลลิกรัมต่อลิตร
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
เหล็ก	
Na_2EDTA	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100
วิตามิน	
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Glycine	2.0
Sucrose	30,000

ภาคผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลาย CPW

CPW salt ประกอบด้วย

KH_2PO_4	27.2	มิลลิกรัมต่อลิตร
KNO_3	101.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,480.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
KI	0.16	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาคผนวกที่ 3 วิธีตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

1. เตรียมสารละลายสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตดให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยชั่งฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด 0.25 กรัม ละลายในอะซิโตนปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตดลงในสารละลายแมนนิทอล 0.6 M (ในการทดลองนี้)ทีละหยดจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่นและมีความขุ่นคงที่
2. หยดสารละลายสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด จากข้อ 1 จำนวน 1 หยดลงบนตัวอย่างโพรโทพลาสต์ที่อยู่บนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
3. หลังจากทิ้งไว้ 5 นาที นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ โพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว สุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

ภาคผนวกที่ 4 วิธีตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์

1. เตรียมสารละลายสีแคลคอฟลอไวท์ตามความเข้มข้น 0.1% ในสารละลายแมนนิทอล0.6 M โดยชั่งแคลคอฟอร์ไวท์ 0.02 กรัม ละลายในสารละลายแมนนิทอล 20 มิลลิลิตร
2. หยดสารละลายสีแคลลอฟลอไวท์ จำนวน 1 หยด ลงบนตัวอย่างโพรโทพลาสต์อยู่บนแผ่นสไลด์ แล้วปิดกระจกปิดสไลด์
3. นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนต์ โพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์จะเรืองแสง

ภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการชักนำให้เกิดจำนวน ยอดรวมต่อชิ้นส่วนพืชในเวลา 4 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (BA)	3	42.7764	14.2588	20.68**
Error	16	11.0300	0.6894	
Total	19	53.8064		

C.V. = 13.5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากต่อต้น เมื่อเพาะเลี้ยงในชนิดของอาหารและออกซินต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (media)	4	17.6062	4.4016	5.76**
Error	15	11.4531	0.7635	
Total	19	29.0594		

C.V. = 17.4%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเกิดจำนวนรากต่อต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในชนิดของอาหารและออกซินต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (media)	3	1938.61687	646.2563	72.36**
Error	12	107.1675	8.9306	
Total	15	2045.7844		

C.V. = 4.0%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนรากต่อต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (NAA)	2	9.8750	4.9375	18.59**
Error	9	2.3906	0.2656	
Total	11	12.2656		

C.V. = 11.6%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเกิดจำนวนรากต่อต้นเมื่อเพาะเลี้ยงอาหารที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (NAA)	2	2027.3267	1013.6634	51.12**
Error	9	178.4700	19.8300	
Total	11	2205.7967		

C.V. = 6.4%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชนิดเอนไซม์และเวลาในการอินคูเบทต่อจำนวนแยกโพรโทพลาสต์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment	11	821.7142	74.7013	180.12**
Enzyme (E)	3	657.7097	219.2366	528.63**
Hour (H)	2	74.9450	37.4725	90.36**
ExH	6	89.0595	14.8432	35.79**
Error	24	9.9534	0.4147	
Total	35	831.6675		

C.V. = 7.8%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักใบที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (leaf weight)	2	321.6867	160.8434	98.34**
Error	6	9.8134	1.6356	
Total	8	331.5000		

C.V. = 7.5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ (%)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (viability)	2	3016.5417	1508.2708	284.65**
Error	9	47.6875	5.2986	
Total	11	3064.2292		

C.V. = 3.5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสร้างผนังเซลล์(%)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (cell wall)	2	603.3800	51.6900	6.51*
Error	6	47.6400	7.9400	
Total	8	151.0200		

C.V. = 9.7%

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการแบ่งเซลล์ (%)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean of square	F-value
Treatment (cell division)	9	682.6667	75.8519	293.27**
Error	20	5.1729	0.2586	
Total	29	687.8395		

C.V. = 3.9%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสุชดา คงทน
วัน เดือน ปี เกิด	7 กุมภาพันธ์ 2518

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี	2539