การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา

Isolation and Culture of Protoplasts from Cell Suspension Culture of Oil Palm cv. Tenera

สกุลรัตน์ สุวรรณโณ

Sakulrat Suwanno

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา

ผู้เขียน นางสาวสกุลรัตน์ สุวรรณโณ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…….ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…….กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

…….

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน พันธุ์เทเนอรา

ผู้เขียน นางสาวสกุลรัตน์ สุวรรณโณ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน โดยใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่า ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น 2 มิลลิลิตร ให้การเจริญดีที่สุด มีปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า ภายในระยะเวลา 30 วัน ระยะ log phase อยู่ในช่วง12-24 วัน ดังนั้นจึงแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์อายุ 12 วัน หลังการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน โดยใช้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต่อสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์ 10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายในแมนนิทอล ข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 อินคูเบทเป็นเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.94 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงที่สุด 95 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น 5x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog) เติม BA (N6-Benzyladenine) เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์ มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 3.08 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 7 วัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปโปรโตพลาสต์ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส และพืชต้นใหม่ได้

Thesis Title	Isolation and Culture of Protoplasts from Cell Suspension Culture of Oil Palm cv. Tenera
Author	Miss Sakulrat Suwanno
Major Program	Plant Science
Academic Year	2010

Abstract

A study on growth of cells in suspension culture of oil palm using different starting inoculate revealed that starting inoculation at 2 ml gave the best proliferation rate of the cells (2-3 times higher than that of origin) within 30 days. Isolation of protoplasts of oil palm was carried out using 12-day-old cell suspension culture (routinely subcultured at 15 days). Maximum yield of protoplasts at 1.94 x 10^6 protoplast/ml and viability at 95 % of protoplast were obtained from 2% (w/v) cellulase Onozuka R-10, 1% (w/v) macerozyme R-10, and 1.5% (w/v) driselase. Those enzymes were dissolved in 0.4 M manitol and adjust pH to 5.7. The mixture of enzyme and cell suspension was incubated at 28±2 °C under dark condition for 5 hours on reciprocal shaker with an agitation speed at 70 rpm. The culture of protoplasts at initial density of 5x10^5 cells/ml as thin layer in MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA, 1.0 mg/l dicamba, 200 mg/l ascorbic acid, 3% sucrose and 0.4 M mannitol under dark condition gave the highest division at 3.08 % after 7 days of culture. However, callus formation and plantlet regeneration were not obtained.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความเมตตากรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ความเข้าใจ และสอนทักษะในด้านต่าง ๆ ทั้งในด้านการเรียน และการใช้ชีวิตในสังคมปัจจุบัน ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ อบรม สั่งสอน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ บัณฑิตวิทยาลัย สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่รักยิ่ง คุณพ่อห้วน-คุณแม่เคลื่อน สุวรรณโณ คุณจอม สุวรรณโณ พี่ชาย และคุณจุก สุวรรณโณ พี่สาว ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน เป็นกำลังใจ และให้ความรักความเอาใจใส่เสมอมา

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ร่วมทำกิจกรรมกันมา โดยเฉพาะสมาชิกห้องปฏิบัติการชีวภาพของพืชปลูกทุกคน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน เป็นกำลังใจ ให้ความรักความเอาใจใส่เสมอมา ตลอดจนทุกสิ่งทุกอย่างที่ดลบันดาลให้ผู้วิจัยได้ทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สกุลรัตน์ สุวรรณโณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	13
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	14
วัสดุ อุปกรณ์	14
วิธีการวิจัย	16
3 ผล	22
4 วิจารณ์	35
5 สรุป	45
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	53
ประวัติผู้เขียน	56

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน	26
2	ผลของอายุเซลล์ที่ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	28
3	ผลของระยะเวลาในการอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	29
4	ผลของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	30
5	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์ม	31
6	ผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน	32
7	ผลของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS และ Y3	33

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตรMS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่าง 5.7 หลังจากเพาะเลี้ยง 15 วัน	14
2	วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายออสโมติคัมสองขั้น	18
3	การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นที่ปริมาตรเพาะลี้ยงเริ่มต้นต่าง ๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน	23
4	เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน ในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับความเป็นกรดด่าง 5.7	24
5	ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน	27
6	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน	34

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

½ MS	=	Half strength Murashige and Skoog
2, 4-D	=	2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid
2iP	=	Isopentenyl adenine
BA	=	N6-Benzyladenine
FDA	=	Fluorescein diacetate
KN	=	Kinetin
NAA	=	1-Naphthylacetic acid
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
TDZ	=	Thidiazuron
Y3	=	Eeuwens (medium)

บทที่1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน จัดเป็นพืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งในระดับโลก และในระดับประเทศไทย (ธีระ และคณะ, 2548) ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในสกุล *Elaeis* สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด คือ *Elaeis guineensis*, *E. oleifera* และ *E. odora* (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) ชนิดที่ปลูกในปัจจุบัน ได้แก่ *E. guineensis* มี 3 พันธุ์ คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา แต่พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ เทเนอรา ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูรากับพิสิเฟอรา เป็นพันธุ์ที่มีเปลือกผลสำหรับอัดน้ำมันมาก ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีกะลาบาง (0.5-4 มิลลิเมตร) มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 22-25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทะลายสด มีทะลายดกกว่าพันธุ์ดูรา (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541) เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ผลผลิตต่อหน่วยสูงกว่าพืชน้ำมันทุกชนิด และเป็นพืชน้ำมันที่มีการผลิตทั่วโลกเป็นอันดับสองรองจากน้ำมันถั่วเหลือง (ธีระ และคณะ, 2548) น้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวัน เช่น ทำสบู่ เนยเทียม เครื่องสำอาง น้ำมันทอดกรอบ และอุตสาหกรรมฉาบเหล็ก และโลหะต่าง ๆ (พรชัย, 2523) ประกอบกับน้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันพืชที่มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันพืชชนิดอื่น ดังนั้นแนวโน้มในอนาคตคาดว่าการใช้น้ำมันปาล์มยังคงมีความต้องการที่สูง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามการเพิ่มขึ้นของความต้องการบริโภคน้ำมันพืชรวมของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) ในปัจจุบันมีการใช้น้ำมันปาล์มเพื่อการบริโภค และอุตสาหกรรมต่อเนื่องของโลกเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้เป็นพลังงานทั่วไปได้ขยับสูงขึ้นเป็นลำดับ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ทำให้รัฐบาลเล็งเห็นถึงความสำคัญในการผลิตปาล์มน้ำมันเพื่อผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันที่เรียกว่า “ไบโอดีเซล” (กระทรวงพลังงาน, 2549) นอกจากนี้ปาล์มน้ำมันสามารถนำไปแปรรูปเป็นอาหารบริโภค ของใช้ อาหารสัตว์ และปุ๋ยอินทรีย์ได้ อย่างไรก็ตามในการผลิตไบโอดีเซลมีความจำเป็นต้องใช้ปาล์มน้ำมันปริมาณมาก แต่ผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีกลับไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นการปลูกปาล์มน้ำมันด้วยต้นพันธุ์ที่ดี มีความสม่ำเสมอสูง จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้มากขึ้นได้ แต่การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการมาตรฐาน (conventional breeding) ต้องใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งลูกผสมที่ได้อาจไม่ตรงตามพันธุ์ ผลผลิตต่อต้นไม่สม่ำเสมอ

(วิสุทธิ์, 2532) ทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียเวลา และค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันการเพิ่มปริมาณกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมนิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะเทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้มากภายในระยะเวลาอันสั้น ผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปรับปรุงพันธุ์ที่ทนโรค และแมลง ช่วยในการรักษาเชื้อพันธุ์พืช การผลิตยา และสารเคมีจากพืช

นอกจากนี้ยังอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ซึ่งจากผลสำเร็จดังกล่าวทำให้การแยกเซลล์เดี่ยว ๆ จากเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นไปได้สูง เปิดโอกาสให้การปรับปรุงพันธุ์พืชใหม่ ๆ ทำได้ง่ายขึ้น และโปรโตพลาสต์ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ ๆ โดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้กับโปรโตพลาสต์ได้อีกด้วย เช่น การตัดต่อยีน การนำยีนที่ต้องการใส่เข้าไปในโปรโตพลาสต์โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้สารเคมี micro injection ตลอดจนการใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลาง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงเมื่อได้ต้นใหม่ขึ้นมา ต้นที่ได้ก็จะแสดงลักษณะตามที่ต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์โดยใช้สารเคมี เช่น PEG (Polyethylene glycol) หรือใช้กระแสไฟฟ้า (Dixon, 1985) ซึ่งการแยกโปรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนมากนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน เช่น ปัจจัยที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ ได้แก่ ความดันออสโมติก ระยะเวลาในการอินคูเบท ระดับความเป็นกรด-ด่าง ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ แหล่งโปรโตพลาสต์ เป็นต้น (สมปอง, 2536ข) ดังนั้นในการทดลองนี้เป็นการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันปาล์มน้ำมัน เพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไปในอันที่จะเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

การตรวจเอกสาร

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันทำได้เพียงวิธีเดียว คือ ใช้เมล็ด เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตโดยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเท่านั้น ไม่การแตกหน่อหรือกิ่งแขนง จึงไม่สามรถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศโดยทั่วไปได้ เช่น การปักชำ ตอนกิ่ง และติดตา ดังนั้นจึงต้องขยายพันธุ์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณ เพื่อให้ได้พืชตรงตามพันธุ์และช่วยร่นระยะเวลาในการผลิตต้นกล้า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ตายอด ตาข้าง เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต มาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ และในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโต และพัฒนาไปในรูปแบบต่าง ๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอ็มบริโอ หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ เรียกว่า แคลลัส ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้

กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่มี 2 กระบวนการ คือ เอ็มบริโอเจนีซีส และออร์กาโนเจนีซีส ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการนี้พืชต้นใหม่ที่ได้อาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงหรือเกิดขึ้นโดยผ่านการสร้างแคลลัส ต่างกันตรงที่กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส พืชต้นใหม่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอในเมล็ด เริ่มจากเซลล์เริ่มต้นแบ่งเซลล์แบบ ซ้ำ ๆ เกิดเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ จากนั้นจะมีการพัฒนาผ่านรูปกลม (globular) รูปหัวใจ (heart) และรูปทอร์ปิโด (torpedo) ตามลำดับ ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ส่วนกระบวนการออร์กาโนเจนีซีส มีการสร้างยอดหรือรากหรือทั้งยอด และรากพร้อมกัน ซึ่งปาล์มน้ำมันก็มีการพัฒนาได้ทั้ง 2 แบบ มีรายงานการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จ เช่น เจริญ และคณะ (2532) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า สามารถชักนำการงอกของคัพภะได้ 98.5 เปอร์เซ็นต์ Kanchanapoom และ Damyoas (1999) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำแคลลัสได้ภายใน 8 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง Te-chato (1998a) ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากแคลลัสเริ่มแรกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันของต้นกล้าอายุ 195 วัน หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200

มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเสท เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-8 เดือน สมปอง และคณะ (2547) รายงานการชักนำแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ ไดแคมบา หรือ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารที่เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน

ปัจจุบันการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชให้ได้จำนวนมากนั้นนิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นหรืออาจเรียกว่า เซลล์แขวนลอย เป็นการเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวภายใต้การเขย่าเลี้ยงตลอดเวลา เพื่อให้เซลล์มีการกระจายตัวในอาหารเหลว ทำให้เซลล์ได้รับธาตุอาหาร และอากาศเพียงพอสม่ำเสมอ ไม่มีความต่างศักย์ของอาหาร มีการกระจายสารชีวเคมีที่ผลิตโดยเซลล์อย่างสม่ำเสมอ ทำให้เซลล์ทุกเซลล์มีพัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน พัฒนาการไปในทิศทางเดียวกัน วิธีการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นทำได้โดยการนำ friable callus ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว หรืออาจเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เช่น ชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยง หรือใบเลี้ยง เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยตรง จากนั้นนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็วรอบ 50-110 รอบต่อนาทีตลอดเวลา แรงเขย่าจากเครื่องเขย่าทำให้เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือกลุ่มเซลล์ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (3-10 เซลล์) กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (มากกว่า 10 เซลล์) กลายเป็นเซลล์ซัสเพนชั่น (สมปอง, 2539; คำนูณ, 2540) de-Touchet และคณะ (1991) รายงานผลความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันโดยนำ friable callus มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักดัดแปลง MS ของ Rabechault และ Martin (1976) ร่วมกับธาตุอาหารรองของสูตรอาหาร Nitsch (1969) วิตามินของสูตรอาหาร Morel and Wetmore (1951) ร่วมกับผงถ่าน 1.0 กรัมต่อลิตร โดยเริ่มแรกเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ อะดีนีนซัลเฟต เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1.0 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 80 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 90 รอบต่อนาที เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 4-6 สัปดาห์ พบการเกิดเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากย้ายเลี้ยง 2 ครั้ง ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นนั้นน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.05-0.5 กรัม (2,4-D ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า แคลลัสน้ำหนักเริ่มต้น 0.1-0.3 กรัม เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เซลล์ซัสเพนชั่นเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด Teixeira และคณะ (1995) ทำการชักนำแคลลัสจากคัพภะน้ำมันในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 475 ไมโครโมลาร์ (ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือพิคลอแรม เข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ

friable callus ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 เติม 2,4-D เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ภายใน 2 เดือนหลังการวางเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในพืชอื่น ๆ เช่น Fki และคณะ (2003) ชักนำแคลลัสอินทผาลัมจาก ใบอ่อน และ ช่อดอก โดยใบอ่อนเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่อดอกเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 เดือน พบว่า แคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนใช้เวลา 4 เดือน ส่วนช่อดอกใช้เวลา 8 เดือน จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มืดบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ทำการย้ายเลี้ยงทุกสัปดาห์ พบว่า สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ Pradeep และคณะ (2009) นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำมาจากชิ้นส่วนหัวที่หั่นบาง ๆ ของเผือก เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลูตามีน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น มีประโยชน์มากในกรณีที่ต้องการขยายพันธุ์พืชที่ทราบแน่นอนว่ามีแบบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยการสร้างต้นอ่อน เซลล์หนึ่งเซลล์ให้ต้นอ่อนหนึ่งต้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นจะทำให้ได้ต้นพืชจำนวนมากในระยะเวลาสั้น นอกจากนี้ทางด้านเภสัชได้มีการดัดแปลงวิธีการเพาะเลี้ยง เพื่อให้เซลล์มีการสร้างสารชีวเคมีที่ใช้ในการผลิตยาต่าง ๆ หรือสารที่สำคัญทางการเกษตร เพราะไม่ต้องปลูกพืชจำนวนมากก็สามารถสกัดสารตัวยาได้ และสามารถทำได้ตลอดเวลา โดยเฉพาะมีการดัดแปลงการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมักเพื่อให้เซลล์มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ไม่ต้องย้ายเลี้ยง ทำให้การผลิตต้นอ่อน และสารชีวเคมีเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ (สมปอง, 2539) ความก้าวหน้าทางเทคนิคปลอดเชื้อของเซลล์พืชนับเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มาก ปัจจุบันได้นำเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีภาพเข้าช่วยทั้งทางด้านการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์จากโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ หมายถึง เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ หรือเซลล์ที่ผ่านการสกัดผนังเซลล์ออกไป โครงสร้างของผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส การแยกโปรโตพลาสต์มี 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ วิธีกล วิธีนี้ใช้ใบมีดที่มีความคมเฉือนใบให้มีขนาดเล็กมาก (หั่นฝอย) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แยกตัวออกจากผนังเซลล์ส่งผลให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ได้แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากขั้นตอนยุ่งยาก และได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย มีความมีชีวิตต่ำ และมีเศษเซลล์จำนวนมากยาก

ต่อการศึกษาทางสรีรวิทยา และอีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย นั่นคือ การใช้เอนไซม์ วิธีนี้ค้นพบโดย Cocking (1960) (อ้างโดย สมปอง, 2536ก) การใช้เอนไซม์อาจแยกเป็นสองขั้นตอนหรือใช้ขั้นตอนเดียวโดยการผสมเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ซึ่งเอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระ คือ มาเซอร์โรไซม์ เมื่อแต่ละเซลล์ของพืชที่ทำการแยกหลุดออกมาเป็นอิสระแล้วจะทำการย่อยผนังเซลล์ด้วยเซลลูเลส องค์ประกอบของเอนไซม์ที่ใช้ทั้งสองชนิดจะต้องใช้ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมจะสามารถช่วยให้แยกโปรโตพลาสต์ได้เป็นจำนวนมาก (สมปอง, 2536ข) การแยกโปรโตพลาสต์ทำได้โดยนำเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นอยู่กับชนิด และเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ ซึ่งสามารถแยกได้จากทุกส่วนของพืช เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบ ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และผล หรืออาจแยกจากเซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัสก็ได้ เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ในเวลาต่อมา (คำนูณ, 2539) Takebe และคณะ (1986) แยกโปรโตพลาสต์แบบวิธีกล และใช้เอนไซม์ร่วมด้วยทำให้สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากยาสูบได้จำนวนมาก แต่มีปัญหา คือไม่สามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้เจริญเป็นแคลลัสได้ ส่วน Takebe และคณะ (1986) ได้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบยาสูบจนสามารถพัฒนาเป็นต้นได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ซึ่งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ในปัจจุบันประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ เช่น *Kalanchoe blossfeldiana* (Lourdes *et al*., 2009), *Musa acuminata* (Wang *et al*., 2007), *Phalaenopsis* (Shrestha *et al*., 2007), *Gossypium davidsonii* (Yang *et al*., 2007), *Cinnamomum camphora* (Li and Bao, 2005), *Lotus corniculatus* (Raikar *et al*., 2008) และ *Cyclamen persicum* (Traud *et al*., 2006) สำหรับโปรโตพลาสต์ปาล์มน้ำมันยังไม่รายงานถึงความสำเร็จในการชักนำเป็นพืชต้นใหม่ ดังนั้นในขั้นต้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแยก และเพาะเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ทั้งนี้เพราะพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อปัจจัยที่แตกต่างกันดังนี้ คือ

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ มาเซอโรไซม์หรือเพคติเนส ทำหน้าที่ย่อยสารประกอบเปคติน ซึ่งเป็นสารประกอบที่เชื่อมติดกันระหว่างเซลล์พืชทำให้เซลล์ที่เกาะรวมกันแยกหรือหลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ จากนั้นเซลลูเลส ทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ออกจนเหลือแต่เหยื่อหุ้มเซลล์ (สมปอง, 2536ข) ดังนั้นในการเลือกใช้เอนไซม์ต้องคำนึงถึงชนิด และความเข้มข้นที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วย (Hu *et al*.,1998; Teo and Neumann, 1978; สมปอง, 2538; คำนูณ, 2540) สมปอง และคณะ (2548) รายงานว่าการใช้เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนปาล์มน้ำมัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 81.67 เปอร์เซ็นต์ Srisawat และ Kanchanapoom (2005) รายงานว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากคัพภะที่สุกแก่ของปาล์มน้ำมัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.54x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 77.51 เปอร์เซ็นต์ Chabane และคณะ (2007) พบว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเพคติเนส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในการอินคูเบทใบอ่อนของอินทผาลัม ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $6.4x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เอนไซม์ชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ ในพืชอื่น ๆ เช่น ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.49x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 98.78 เปอร์เซ็นต์ (สกุลรัตน์, 2549) ในพืชบางพืชต้องใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มสูงทำให้ได้โปรโตพลาสต์มากขึ้น เช่น ในการศึกษาของ จิตเกษม และสุเม (2547) ได้ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์ แพคติเนส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์เพคโตไลเอส เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.27x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิต 89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เพคโตไลเอส ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นเป็น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อทำการเพิ่มเอนไซม์เพคติเนสในบางการทดลอง พบว่า ส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลงเป็น $8x10^4$ - $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ความดันออสโมติก

ในการแยกโปรโตพลาสต์ ถ้าให้โปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายอาหารมาตรฐานทั่ว ๆ ไปมักแตกเพราะไม่มีผนังเซลล์มากั้น ดังนั้นจะต้องมีแรงอันหนึ่งมาทำหน้าที่แทนแรงดันที่ได้จากผนังเซลล์ คือ แรงดันออสโมติก ซึ่งจะต้องสมดุลกันระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ Ruesink (1978) สังเกตเห็นว่าเมื่อแรงดันออสโมติกสูงขึ้นทำให้เมแทบอลิซึม และการเจริญเสียไป การสร้างผนังเซลล์ใหม่ก็จะลดลง ส่วนความดันออสโมติกที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตก (Evan and Bravo, 1983) การปรับความดันออสโมติกนิยมใช้สารเคมี เรียกว่า สารออสโมติคัม ได้แก่ น้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล และซอร์บิทอล โดยซอร์บิทอลเป็นไอโซเมอร์ของแมนนิทอล หรือใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำตาลที่ไม่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ เช่น กลูโคส และซูโครส โดยการใช้ร่วมกันหรือใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง แมนนิทอลเป็นสารออสโมติคัมที่นิยมใช้มากที่สุดในการใช้แยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากน้ำตาลแมนนิทอลสามารถเข้าสู่เซลล์ของพืชได้ช้ามาก และพืชมีความสามารถในการดูดซึมแมนนิทอลได้น้อยมาก (บุญยืน, 2540) ในการใช้สารละลายออสโมติคัมในการแยกโปรโตพลาสต์จะใช้แมนนิทอลความเข้มข้นในช่วง 0.2-0.90 โมลาร์ (คำนูณ, 2539) ในการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบพืชมีการใช้ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติคัมในช่วง 0.50-0.70 โมลาร์ (สมปอง, 2536) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับแรงดันออสโมติกของชนิด และชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยก (Kao and Michaylux, 1974) ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน ใช้กลูโคสเป็นออสโมติคัมที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.54x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 77.51 เปอร์เซ็นต์ (Alice and William, 1984) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัมที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด 1.54×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 77.51 เปอร์เซ็นต์ (Te-chato *et al*., 2005) และคัพภะของปาล์มน้ำมันใช้ซอร์บิทอลเป็นออสโมติคัมที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.54x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 77.51 เปอร์เซ็นต์ (Srisawat and Kanchanapoom, 2005) ส่วนใบอ่อนของอินทผาลัมใช้ซูโครสเป็นออสโมติคัมที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.54x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 77.51 เปอร์เซ็นต์ (Chabane *et al*., 2007) นอกจากนี้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงบุญฑริกยังรายงานถึงช่วงที่เหมาะสมของออสโมติคัมในการแยกโปรโตพลาสต์อยู่ที่ความเข้นข้น 0.7 โมลาร์ ซึ่งให้ความมีชีวิตองโปรโตพลาสต์สูงสุด ส่วนออสโมติคัม 0.6 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด (จิตเกษม และสุเม, 2547)

แหล่งของชิ้นส่วนพืช

แหล่งของวัสดุพืชโดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 แหล่ง คือ พืชที่ปลูกนอกหลอดทดลอง และวัสดุพืชในหลอดทดลอง ชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มาจากหลายส่วน เช่น ใบ ราก ลำต้น ปลายยอด แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนพืชแต่ละประเภทจะให้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจำเป็นต้องเลือกชิ้นส่วนที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ให้เหมาะสมกับงาน และความต้องการที่จะนำโปรโตพลาสต์ไปใช้ (สมปอง, 2536ข) มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ในการแยกโปรโตพลาสต์ เช่น เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน (Alice and William, 1984) การใช้ชิ้นส่วนจากเนื้อเยื่อคัพภะ แคลลัส และยอดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (Srisawat and Kanchanapoom, 2005) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำมาจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมัน (Te-chato *et al*., 2005) ยอดอ่อนของอินทผาลัม (Chabane *et al*., 2007) และเซลล์ซัสเพนชั่นของฝ้าย (Yang *et al*., 2007) ซึ่งในการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนต่าง ๆ จะใช้ระยะเวลาในการอินคูเบทแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน และขนาดพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วย (พัฐวดี, 2536) นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกส่งผลให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์แตกต่างกันไปด้วย (Koh *et al*., 1988) การเจริญเติบโต อายุของพืช และระยะพัฒนาการของพืชที่นำมาใช้มีผลต่อปริมาณ และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ สำหรับแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถนำมาแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี (Mizuhiro *et al*., 2001) และเซลล์ควรอยู่ในระยะการเจริญแบบ exponential เพราะเซลล์มีผนังเซลล์ที่ค่อนข้างบาง จึงใช้เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสหรือเพคติเนสที่ค่อนข้างสั้น (รังสฤษฎ์, 2541)

ระยะเวลาในการอินคูเบท

ระยะเวลาที่เหมาะสม มีความจำเป็นต่อกระบวนการอินคูเบทชิ้นส่วนพืชร่วมกับเอนไซม์ มีรายงานว่าในสารละลายเอนไซม์มีส่วนประกอบที่เป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ เมื่ออินคูเบทในเอนไซม์เป็นเวลานานอาจมีผลทำให้โปรโตพลาสต์ตายได้ในพืช และชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิดมีการใช้ระยะเวลาในการอินคูเบทที่แตกต่างกัน ในปาล์มน้ำมันนั้นชิ้นส่วนต่างกันใช้ระยะเวลาในการอินคูเบทที่แตกต่างกัน พืชบางชนิดใช้เวลาในการอินคูเบทสั้น เช่น ในเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมัน ใช้เวลาในการอินคูเบท 2 ชั่วโมง ให้จำนวนมากที่สุด $1.0x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 81.67 เปอร์เซ็นต์ (Te-chato *et al*., 2005) และในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ใช้เวลาในการอินคูเบท

2 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.27x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิต 89 เปอร์เซ็นต์ บางพืชใช้เวลาในการอินคูเบทปานกลาง เช่น สกุลรัตน์ (2549) ศึกษาระยะเวลาต่าง ๆ ในการอินคูเบทใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร พบว่า การอินคูเบทเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.49x10^7$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 94.78 เปอร์เซ็นต์ วุฒิชัย (2550) ศึกษาระยะเวลาต่าง ๆ ในการอินคูเบทโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างแดง พบว่า การอินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.05x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 84.32 เปอร์เซ็นต์ และในพืชบางชนิดใช้เวลานาน เช่น Srisawat และ Kanchanapoom (2005) ได้ศึกษาระยะเวลาต่าง ๆ ในการอินคูเบท คือ 24 36 48 และ 72 ชั่วโมง ของแคลลัส และคัภพะของปาล์มน้ำมันที่ตัดแยกจากเมล็ด พบว่า แคลลัสใช้เวลาอินคูเบท 24 ชั่วโมง ส่วนคัภพะที่ตัดแยกจากเมล็ดใช้เวลาอินคูเบทนาน 48 ชั่วโมง ซึ่งให้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มากที่สุด สำหรับใบอ่อนของอินทผาลัมใช้เวลา 48 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.54x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 77.51 เปอร์เซ็นต์ (Chabane *et al*., 2007) และในการแยกโปรโตพลาสต์ของฝ้ายใช้เวลาในการอินคูเบท 18 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้เวลาในการอินคูเบทนานขึ้นปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้ลดลง (Sun *et al*., 2005) ในการแยกโปรโตพลาสต์ของพืชไม่นิยมแยกจากเซลล์ที่มีการเจริญขั้นสอง เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีผนังเซลล์หนาเพราะมี secondary wall ที่ประกอบด้วยสารพวกลิกนิน ซูเบอริน และคิวติน ซึ่งย่อยยาก (ประศาสตร์, 2538) มีผลทำให้เอนไซม์ใช้เวลาในการย่อยผนังเซลล์นานขึ้น

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อต้องการให้สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ จากนั้นเซลล์ที่เกิดใหม่มีการแบ่งเซลล์ทำให้กลายเป็นกลุ่มเซลล์ มีการเจริญพัฒนา และเป็นพืชต้นใหม่ ในพืชบางชนิดมีการพัฒนาได้ง่าย และรวดเร็ว เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพียงครั้งเดียวก็สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้เลย ส่วนในพืชที่มีความซับซ้อนดังเช่น ปาล์มน้ำมัน การเลี้ยงด้วยวิธีการธรรมดาไม่สามารถชักนำการสร้างพืชต้นใหม่ได้ จึงต้องมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงดังนี้ คือ

อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์

สูตรอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยทั่วไป ได้แก่สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) Y3 (Eeuwens,1976) และสูตรอาหารอื่น ๆ ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตส่วนใหญ่มักมีออกซินหนึ่งหรือหลาย ๆ ชนิดร่วมกับไซโตไคนินหนึ่งหรือสองชนิดเพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มักเริ่มด้วยออกซินในความเข้มข้นสูงร่วมกับไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำ แต่เมื่อโปรโตพลาสต์มีการพัฒนาควรเปลี่ยนแปลงสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปนิยมเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวก่อน เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ และแบ่งเซลล์แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง และในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จำเป็นต้องมีการลดออสโมติคัมทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหาร หรือเติมอาหารเพื่อพัฒนาการในระยะต่อไปจนได้แคลลัส และพืชต้นใหม่ตามลำดับ (Nagata and Takebe, 1971; Price and Earle, 1984; Loh and Rao, 1985; Koh *et al*., 1988 อ้างโดย สกุลรัตน์, 2549) สมปอง และคณะ (2548) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ร่วมกับไดแคมบา เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3.0 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นไฟตาเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เริ่มต้นสูงสุด 2.3-4.0 เปอร์เซ็นต์ Srisawat และ Kanchanapoom (2005) รายงาน การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากคัพภะปาล์มน้ำมันในอาหาร Y3 ที่เติมวุ้นอากาโรส 0.3 เปอร์เซ็นต์ พิคลอแรม เข้มข้น 3.8 ไมโครโมลาร์ 2,4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ ไคนีติน เข้มข้น 9.3 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เริ่มต้นสูงสุด 6.91 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของอินทผาลัมในอาหารสูตร KM (Kao and Michayluk, 1975) ที่เติมวุ้นอากาโรส 0.5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2iP เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ (Chabane *et al*., 2007) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของเซลล์ซัสเพนชั่นหญ้าแฝกในอาหารเหลวสูตร N6 เติม 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 5.0 เปอร์เซ็นต์ (Prasertsongskun, 2004)

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงด้วยจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่เหมาะสม เพราะถ้าใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นน้อยจะทำให้โปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนา หากใช้โปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ความหนาแน่นมากทำให้เกิดการเกาะติดกันของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้โปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์จะมีการสร้างสารชีวเคมีออกมาส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถพัฒนาได้ และจะทำให้ตายในที่สุด (Sun *et al*., 2005) ดังนั้นจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องมีอย่างน้อย $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จึงจะเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยง (Kao and Michaylux, 1975; พัฐวดี, 2536) Chabane และคณะ (2007) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบอ่อนอินทผาลัมด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็กสูงสุด ส่วนโปรโตพลาสต์ของคัพภะปาล์มน้ำมันเมื่อเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการสร้างโคโลนีสูงสุด การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เซลล์ซัสเพนชั่นหญ้าแฝกด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด (Prasertsongskun, 2004)

วิธีการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี และข้อเสียในการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นการเพาะเลี้ยงที่นิยมใช้มากที่สุดในระดับหนึ่ง เนื่องจากมีข้อดี คือ สามารถปรับความดันออสโมติคัมได้ง่าย แต่ไม่สามารถตรวจสอบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มาจากเซลล์เดี่ยว ๆ ได้ ส่วนวิธีการเลี้ยงโดยการตรึงเซลล์ให้อยู่กับที่ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว หรืออาหารแข็งสามารถตรวจสอบการพัฒนาการของเซลล์ได้ถูกต้องกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว (คำนูณ, 2539) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีที่อาหารสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงแต่ทำให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอน และเกาะกลุ่มกัน เมื่อมีการเคลื่อนย้ายหรือเอียงจานเพาะเลี้ยงทำให้โปรโตพลาสต์เคลื่อนที่ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โปรโตพลาสต์แตกหรือชะงักการเจริญแต่การฝังเลี้ยงในอาหารแข็งอาจทำให้โมเลกุลของสารอาหารเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ได้ช้า เซลล์ที่ถูกตรึงไว้กับที่จะช่วยป้องกันการตกตะกอน และการเกาะกลุ่มของโปรโตพลาสต์ (สมัชชา และสมปอง, 2544) มีรายงานพืชที่ประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเติมไฟตาเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกได้สูงสุด เช่น

ปาล์มน้ำมัน (Te-chato *et al*., 2005) และส้มแขก (Te-chato *et al*., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะด้วยการฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของอินทผาลัมในอาหารสูตร MS ที่เติมมวุ้นอากาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกได้สูงสุด (Chabane *et al*., 2007) ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 3 วิธี คือ Thin layer, Liquid over agarose และ Agarose bead method พบว่า การเพาะเลี้ยงโดยวิธี Thin layer มีความเหมาะสมที่สุด (จิตเกษม และสุเม, 2547) ปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ การเหี่ยว และการหยุดพัฒนาของโปรโตพลาสต์เมื่อทำการเลี้ยงไประยะหนึ่งซึ่งเกิดในโปรโตพลาสต์ของสะเดาช้าง เมื่อเพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารได้ 1-2 สัปดาห์ (นิจวรรณ, 2545) การย้ายเลี้ยงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการกระตุ้นการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ โดยในช่วงแรกทำการเลี้ยงในอาหารเหลวเมื่อโปรโตพลาสต์ได้สร้างผนังเซลล์แล้วทำการย้ายโปรโตพลาสต์ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ พบในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบมอญ (วุฒิชัย และสมปอง, 2549)

ดังนั้นการศึกษาเทคนิค และวิธีการที่เหมาะสมในการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน เพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไปในอันที่จะเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราต่อจำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ เพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป ในอันที่จะเป็นแนวทางในการขยาย และปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

บทที่ 2

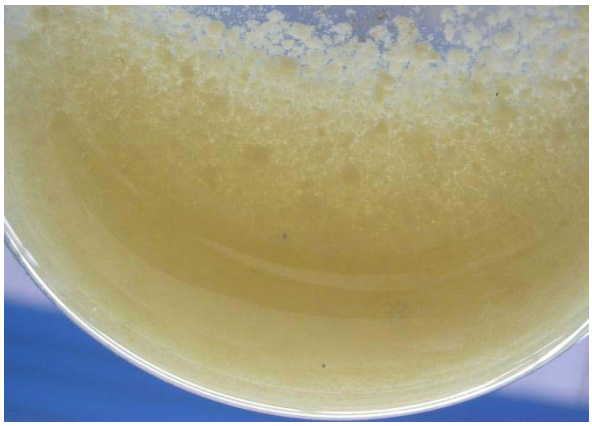
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

1.1.1 เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นที่ทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน (ภาพที่ 1) โดยใช้ตะกอนเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 เลี้ยงในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส



ภาพที่1 ลักษณะเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่าง 5.7 หลังจากเพาะเลี้ยง 15 วัน

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของอาหารสูตร MS

1.2.2 น้ำตาลซูโครส แมนนิทอล และซอร์บิทอล

1.2.3 วุ้นอากาโรส

1.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (N6-benzyladenine) ไคแคมบา และกรดแอสคอร์บิค

1.2.5 เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ คือ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 มาเซอโรไซม์อาร์10 และเอนไซม์ไดซีเลส

1.2.6 สารเคมีตรวจสอบความมีชีวิต คือ fluorescein diacetate (FDA)

2. อุปกรณ์

- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ประกอบด้วย
  - ปิเปต
  - กระบอกตวง
  - ขวดปรับปริมาตร
  - บีกเกอร์
  - จานเพาะเลี้ยงขนาด 6 และ 9 เซนติเมตร
  - ฟลาสก์
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย
  - ตู้ย้ายเลี้ยง
  - ปากคีบ
  - ด้ามมีด
  - ใบมีดผ่าตัด
  - กระดาษทิชชู
  - พาราฟิล์ม
  - แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- อุปกรณ์ในการแยกโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย
  - เครื่องเขย่าแบบไปมา
  - ผ้ากรองมิราคลอทขนาด 77 ไมโครเมตร

พาสเจอร์ปิเปต
ลูกยางสำหรับดูด
หลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร
สไลด์หลุมและกระจกปิดสไลด์
ฮีมาไซโตมิเตอร์
กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด
ฟลูออเรสเซนส์ พร้อมชุดบันทึกภาพ

- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย
  ไมโครปิเปต
  เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
  เครื่องปรับ pH
  หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
  ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ
  ตู้เช่แข็งอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- เครื่องเขย่าเลี้ยง

วิธีการวิจัย

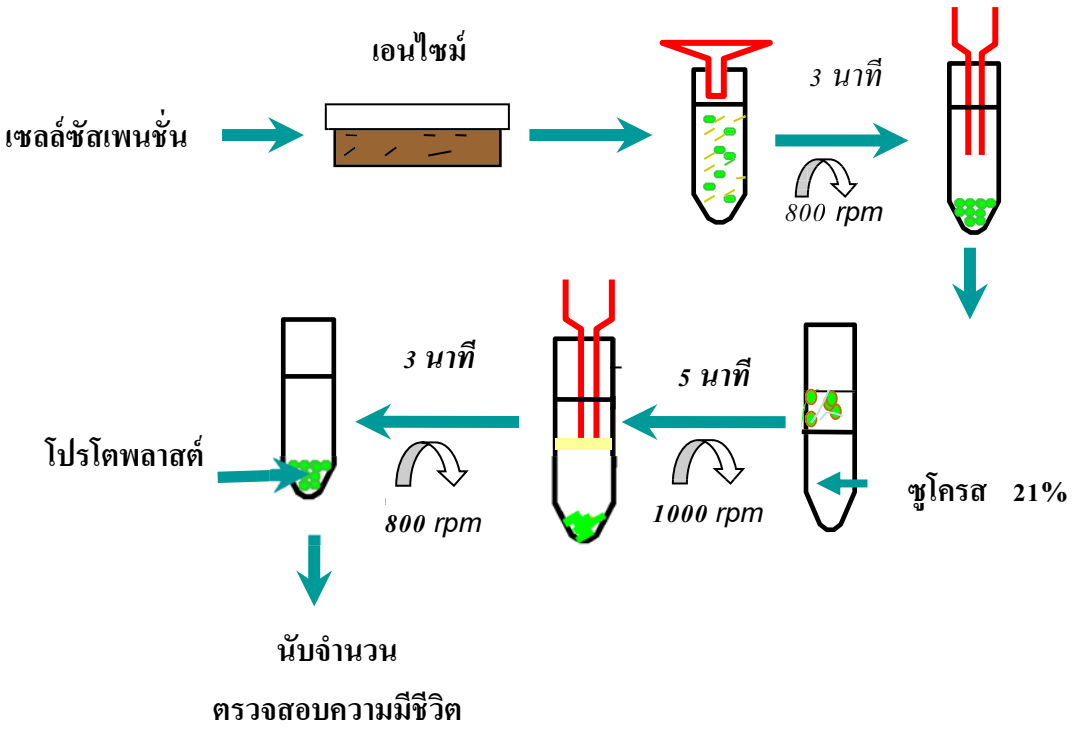
1. ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

นำตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของปาล์มน้ำมัน ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 วางเลี้ยงในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 25 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญของเซลล์ซัสเพนชั่นโดยวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน และบันทึกลักษณะ และสีของตะกอนเซลล์แต่ละปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ฟลาสค์

2. วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

2.1 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันอายุ 12 วัน ที่มาจากการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน นำเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 เข้มข้น 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับสารละลายเอนไซม์มาเซอร์โรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเอนไซม์ไดรซีเลสเข้มข้น 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทชิ้นส่วนในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 เซนติเมตร พันด้วยพาราฟิล์ม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง จึงนำไปกรองด้วยผ้ากรองมิลาครอทนึงฆ่าเชื้อขนาด 77 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ผ่านไปยังหลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์ และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง (ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS เติมแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเป่าให้เข้ากันแล้วนำไปลอยบนสารละลายซูโครส เข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์ ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากสารละลายตอนกลางระหว่างสารละลายล้าง และซูโครส แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2 ครั้ง นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปตรวจนับจำนวน และความมีชีวิตเพื่อปรับความหนาแน่นที่จะเพาะเลี้ยงต่อไป ตามรายละเอียดวิธีการแยกโปรโตพลาสต์แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายออสโมติคัมสองขั้น

ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ โดยหยดเซลล์ซัสเพนชั่นของโปรโตพลาสต์บนฮีมาไซโตมิเตอร์ นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบความมีชีวิตโดยใช้สารละลายล้างโปรโตพลาสต์ 100 ไมโครลิตร ย้อมด้วย FDA เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ดูดเป่าให้เข้ากันในสไลด์หลุม วางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ที่ช่วงความยาวคลื่นของแสงอัลตราไวโอเลต (300-400 นาโนเมตร) ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงที่สีเขียวอมเหลืองต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง} \times 100}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

2.2 การศึกษาผลของอายุเซลล์ซัสเพนชั่นต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันอายุ 10 11 12 13 และ 14 วัน ที่มาจากการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน นำเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ดีที่สุด และภายใต้สภาวะเดียวกับการทดลอง 2.1 จากนั้นนำไปแยก และทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ตรวจนับจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ตามวิธีการข้างต้นเปรียบเทียบกันแต่ละอายุที่ทำการแยกโปรโตพลาสต์

2.3 การศึกษาผลของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันอายุที่ดีที่สุดจากการทดลอง 2.2 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ดีที่สุดจากการทดลอง 2.1 ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 โมลาร์ จากนั้นนำไปแยก และทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ตรวจนับจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ตามวิธีการข้างต้นเปรียบเทียบกันแต่ละความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ทำการแยกโปรโตพลาสต์

2.4 การศึกษาผลของระยะเวลาอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันอายุที่ดีที่สุดจากการทดลอง 2.2 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ดีที่สุดจากการทดลอง 2.1 ซึ่งละลายในแมนนิทอลความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.3 อินคูเบทเป็นระยะเวลา 3 5 7 และ 9 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแยก และทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ตรวจนับจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ตามวิธีการข้างต้นเปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาที่ทำการแยกโปรโตพลาสต์

แต่ละปัจจัยทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 เพลทที่อินคูเบทคิดเป็น 1 ซ้ำ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

3.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นที่อายุที่ดีที่สุดจากการทดลอง 2.1 ทำการปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอลความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.3 และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบา เข้มข้น 0.3 0.5 0.7 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

3.2 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นที่อายุที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.1 ทำการปรับความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยงเป็น 4 ระดับ คือ $5x10^4$ $1x10^5$ $5x10^5$ และ $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอลความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.3 และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ทำการเพาะเลี้ยง

3.3 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นที่อายุที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.1 ทำการปรับความหนาแน่นที่ดีทีสุดจากการศึกษาที่ 3.2 เลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ Y3 เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอลความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.3 และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ เปรียบเทียบกันในอาหารแต่ละสูตรที่ทำการเพาะเลี้ยง

3.4 การศึกษาผลของวิธีการเพาะเลี้ยง และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้แบ่งวิธีการเลี้ยงเป็น 4 วิธีการ ดังนี้

1. เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
2. เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง เติมวุ้นอากาโรส เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์
3. เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เติมวุ้นไฟตาเจล เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์
4. เพาะเลี้ยงแบบอาโรสบีดหรือดิสค์ เติมวุ้นอากาโรส เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์

วางเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ๆ ละ 10 เม็ด แล้วจึงเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (อาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.7) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

นำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นที่อายุที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.1 ทำการปรับความหนาแน่นที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.2 เลี้ยงในอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการศึกษา ที่ 3.3 แมนนิทอลความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.3 และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการทั้ง 4 วิธี ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม แต่ละวิธีการวางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเพาะเลี้ยง

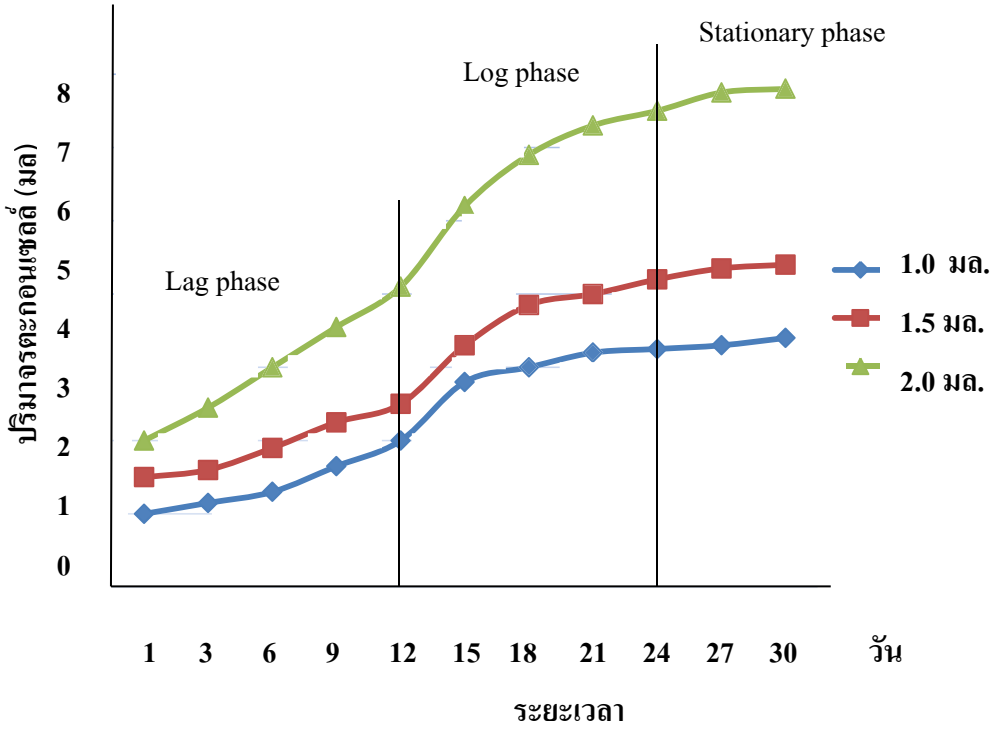
แต่ละปัจจัยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

บทที่ 3

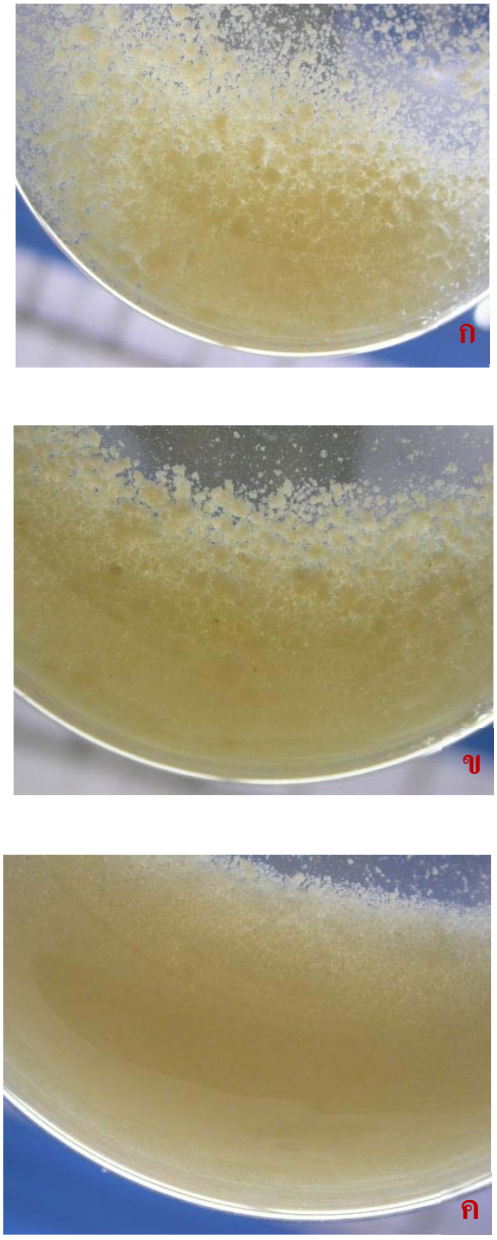
ผล

1. การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

จากการนำปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน โดยใช้ปริมาตรเริ่มต้น 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นด้วยปริมาตรเริ่มต้น 2.0 มิลลิลิตร เซลล์มีการเจริญเติบโตได้เร็ว และดีที่สุด ตะกอนเซลล์จะเพิ่มขึ้นประมาณ 2-3 เท่า ส่วนปริมาตรเริ่มต้น 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร ตะกอนเซลล์จะเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5-2 เท่า ส่วนรูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 3 ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น เป็นแบบ sigmoid curve ลักษณะกราฟเส้นเป็นรูปตัว S โดยมีการเจริญเติบโต 3 ระยะ คือ ระยะ lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วันหลังการเพาะเลี้ยง ระยะ log phase อยู่ในช่วง 12-24 วันหลังการเพาะเลี้ยง และระยะที่ 3 คือ stationary phase หลังจากวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป (ภาพที่ 3) ตะกอนเซลล์ที่ได้จะมีสีเหลืองนวล มีหลายขนาดปะปนกันไปในทุกระยะไม่ว่าจะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็กหรือกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันที่ปริมาตรเซลล์เพาะเลี้ยงเริ่มต้นต่าง ๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน



ภาพที่ 4 เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน ในอาหารเหลวสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับความเป็นกรดด่าง 5.7

(ก) 1.0 มิลลิลิตรปริมาตรตะกอนเซลล์

(ข) 1.5 มิลลิลิตรปริมาตรตะกอนเซลล์

(ค) 2.0 มิลลิลิตรปริมาตรตะกอนเซลล์

2. วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

2.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโตพลาสต์

สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มาเซอร์โรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $9.93x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 90.5 เปอร์เซ็นต์ การเติมเอนไซม์ไดรซีเลสลงไปส่งผลให้โปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีจำนวน และความมีชีวิตมากกว่าการไม่ใช้ไดรซีเลส แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 1) โปรโตพลาสต์ที่ได้จะมีลักษณะกลมเต่ง ขนาด 20-50 ไมโครเมตร สามารถมองเห็นการเรืองแสงของโปรโตพลาสต์ได้โดยการย้อมด้วย FDA แล้วนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตด (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 ผลของชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

เอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)			จำนวนโปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร (x 10^5)	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
CR-10	MR-10	Dri		
1	1	-	3.40b	72.51d
1	2	-	3.20b	78.59c
2	1	-	5.40b	83.33b
2	2	-	5.77b	85.09b
2	1	1	8.33a	87.00ab
2	1	1.5	9.93a	90.50a
3	1	1.5	8.43a	80.00bc
F-test			**	**
C.V. (%)			17.02	17.87

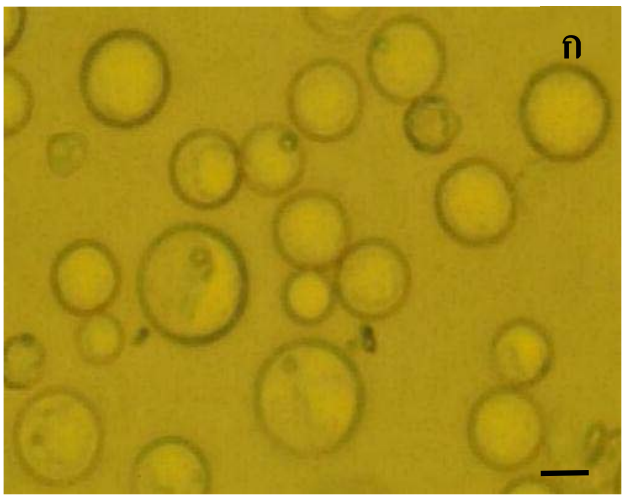
** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

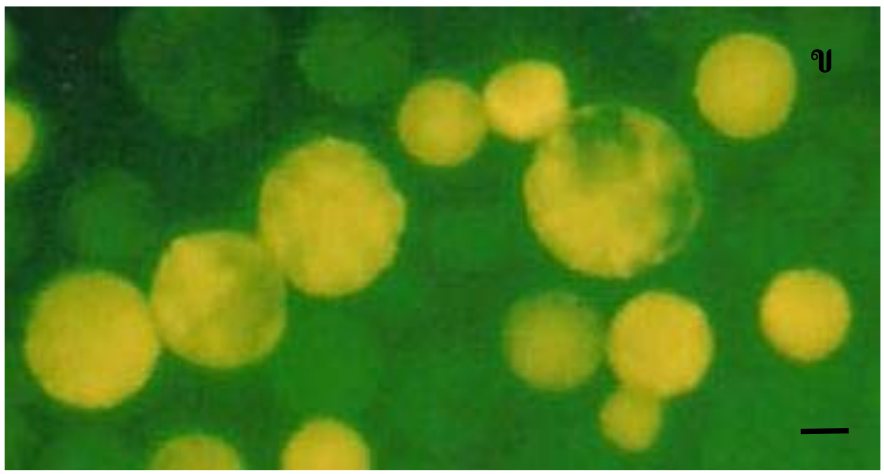
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

CR-10 = Cellulase Onozuka R-10

MR-10 = Macerozme R-10

Dri = Driselase





ภาพที่ 5 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

(ก) โปรโตพลาสต์ที่ไม่ย้อม FDA (บาร์ 20 ไมโครเมตร)

(ข) โปรโตพลาสต์ของเซลล์ซัสเพนชั่นที่ย้อมดูความมีชีวิตด้วย FDA

2.2 ผลของอายุเซลล์ซัสเพนชั่นต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซสเพนชั่นปาล์มน้ำมันอายุ 10 11 12 13 และ 14 วัน พบว่า เซลล์ซัสเพนชั่นอายุ 12 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.94×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เซลล์ซัสเพนชั่นอายุ 13 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.55×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิต 85.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของอายุเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันที่ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 15 วัน ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

อายุเซลล์ซัสเพนชั่น (วัน)	จำนวนโปรโตพลาสต์/ ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ($x10^5$)	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
10	9.63c	75.50b
11	10.10c	77.51b
12	19.40a	95.00a
13	15.50b	85.01b
14	12.40c	82.27b
F-test	**	**
C.V. (%)	7.45	4.55

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

2.3 ผลของระยะเวลาในการอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรตพลาสต์

การอินคูเบทเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น แต่ความมีชีวิตลดลง โดยเฉพาะการอินคูเบทเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ความมีชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $8.73x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับระยะเวลาอินคูเบทที่ 3 7 และ 9 ชั่วโมง ส่วนความมีชีวิต พบว่า การอินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ให้ความมีชีวิตสูงสุด 87.76 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 3) ดังนั้นในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันจึงเลือระยะอินคูเบทที่เวลา 5 ชั่วโมง เพื่อให้ได้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาในการอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ระยะเวลาในการอินคูเบท (ชั่วโมง)	จำนวนโปรโตพลาสต์/ ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ($x 10^5$)	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
3	7.27a	76.00b
5	8.73a	87.76a
7	9.13a	61.55bc
9	9.43a	53.67c
F-test	ns	**
C.V. (%)	11.42	6.76

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

2.4 ผลของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซสเพนชั่นปาล์มน้ำมันอายุ 12 วันหลังการย้ายเลี้ยงทุกๆ 15 วัน อินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ที่ปรับความดันออสโมติคัมด้วยแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.2x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 91.83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ให้จำนวน และความมีชีวิตน้อยที่สุด แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

แมนนิทอล (โมลาร์)	จำนวนโปรโตพลาสต์/ ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร (x 10^5)	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
0.4	12.37a	91.83a
0.5	9.07b	83.13ab
0.6	7.83bc	71.83bc
0.7	6.2c	67.02c
F-test	**	**
C.V. (%)	8.90	6.05

** = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

3. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 3.08±2.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์จนได้ไมโครโคโลนีภายในสัปดาห์ที่ 2 (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นพบว่าโปรโตพลาสต์เหี่ยว และไม่มีพัฒนาการต่อไปอีก

ตารางที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)				การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (เปอร์เซ็นต์) ± SD
BA	Dicamba	NAA	2,4-D	
0.5	-	1.0	0.5	0
1.0	-	1.0	-	0
1.0	0.3	-	-	1.46±0.7
1.0	0.5	-	-	0.24±1.2
1.0	0.7	-	-	0
1.0	1.0	-	-	3.08±2.2
1.0	2.0	-	-	0.93±1.4

±SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน

3.2 ผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซสเพนชั่นปาล์ม ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 2.38±0.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ครั้งต่อไปจึงเลือกเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร)	การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (เปอร์เซ็นต์)
$1x10^4$	0
$5x10^4$	0
$1x10^5$	0.16±1.2
$5x10^5$	2.38±0.5

±SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน

3.3 ผลของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 2.33±0.7 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอาหารสูตร Y3 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ตารางที่ 7)

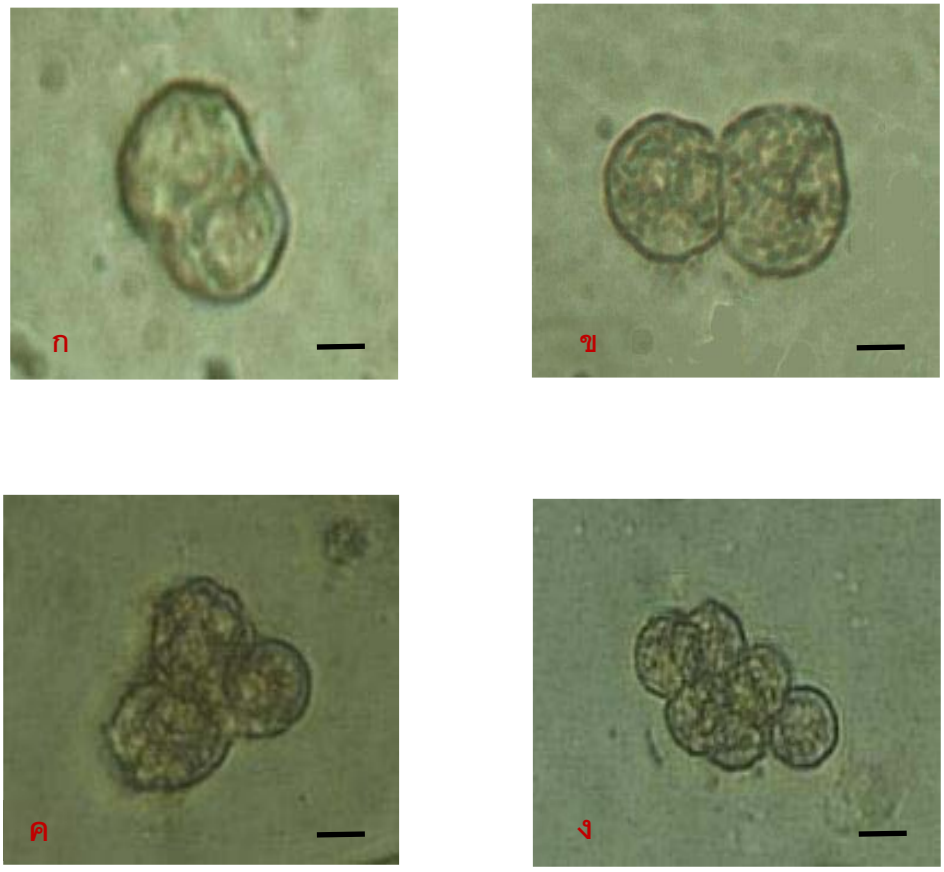
ตารางที่ 7 ผลของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว สูตร MS และ Y3

สูตรอาหาร	การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (เปอร์เซ็นต์)
MS	2.33±0.7
Y3	0

±SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน

3.4 ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3-4 วัน (ภาพที่ 6ก) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์บางส่วนเริ่มตาย ส่วนที่เหลือยังมีการแบ่งเซลล์ต่อไป (ภาพที่ 6ข) มีการสร้างไมโครโคโลนีในสัปดาห์ที่ 1 (ภาพที่ 6ค) และการสร้ามาโครโคโลนีในสัปดาห์ที่ 2 (ภาพที่ 6ง) หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนาต่อ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวนั้นในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์เริ่มแตก และเหี่ยว หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ตายทั้งหมด การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว ไม่มีการแบ่งเซลล์ และตายหมดภายในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ในกรณีของการเลี้ยงแบบอากาโรสบีดหรือดิสต์ร่วมกับการเติม และไม่เติมอาหารเหลว ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ไม่พบพัฒนาการของโปรโตพลาสต์



ภาพที่ 6 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน ที่เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการเพาะลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

(ก) โปรโตพลาสต์ก่อนการเพาะเลี้ยง (บาร์ 20 ไมโครเมตร)

(ข) โปรโตพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 1-2 วัน (บาร์ 20 ไมโครเมตร)

(ค) การแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์ หลังการเพาะเลี้ยง 3-4 วัน (บาร์ 20 ไมโครเมตร)

(ง) การแบ่งเซลล์จนได้โคโลนี หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (บาร์ 20 ไมโครเมตร)

(จ) การแบ่งเซลล์จนได้มาโครโคโลนี หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ (บาร์ 20 ไมโครเมตร)

บทที่ 4

วิจารณ์

การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน

จากการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน พบว่า มีลักษณะการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกับพืชทั่ว ๆ ไป คือ มีลักษณะเป็น sigmoid cave ส่วนการแบ่งเซลล์มีความคล้ายคลึงกับกับการเลี้ยงจุลินทรีย์ต่างกันตรงระยะเวลา โดยทั่วไปวงจรการแบ่งเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นสั้น ทำให้ระยะเวลาที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สั้นเพียง 24 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์พืชต้องใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า (สมปอง, 2539) ซึ่งในเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วันหลังการเพาะเลี้ยง ระยะนี้เซลล์เตรียมดูดน้ำ และธาตุอาหารเพื่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์ ระยะที่ 2 คือ log phase อยู่ในช่วง 12-24 วันหลังการเพาะเลี้ยง ระยะนี้เป็นระยะที่มีการเพิ่มปริมาตรของเซลล์เป็นเส้นตรง และแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว มีการสร้างผนังเซลล์ และสะสมแป้งจากคาร์โบไฮเดรตที่สร้างก่อนหน้านี้ และระยะที่ 3 คือ stationary phase หลังจากวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป เป็นระยะที่การแบ่งเซลล์เริ่มลดลงเพราะมีธาตุอาหารจำกัด และมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีที่ผลิตโดยพืชเองออกมาจำนวนมากจนอาจทำให้เซลล์ตายได้ ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม อาจเนื่องมาจากเซลล์ที่แบ่งไม่มีการกระจายตัว ยังคงเกาะกันแน่น ส่วนเซลล์ใหม่ที่ชักนำได้มีขนาดเล็ก และมีสีเหลืองนวล นอกจากนี้สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตก็เป็นปัจจัยหลักที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นในปาล์มน้ำมันมีรายงานการใช้อาหารสูตร Y3 ซึ่งปราศจากสารเคมีในกลุ่มของอินทรียสารในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน (de Touche *et al*., 1991) ในการศึกษานี้ได้พยายามใช้สูตรดังกล่าวแล้วแต่ไม่สามารถชักนำ และเพิ่มปริมาณได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าอินทรียสารมีความจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ ในขณะที่สูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม ไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดี แต่อัตราการเพิ่มปริมาณช้า ทั้ง

เติบโตของยางพาราในระยะ log phase อยู่ในช่วง 17-24 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับปาล์มน้ำมัน แต่ปาล์มน้ำมันจะมีช่วง log phase ที่เร็วกว่าเล็กน้อยอาจเนื่องมาจากยางพาราเป็นพืชที่มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมามากเกินไป ทำให้ไปยับยั้งหรือหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนปริมาตรเซลล์เริ่มต้นในการชักนำ และเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า เซลล์เริ่มต้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้การเจริญเติบโตได้ดี และเร็วที่สุด อาจเนื่องมาจากการเคลื่อนย้ายของเซลล์ช่วยให้มีการแลกเปลี่ยนแก๊สกับบรรยากาศ และมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีที่เหมาะสมช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์เริ่มต้นที่ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เจริญเติบโตได้ดีกว่าปริมาตรเริ่มต้นอื่น ๆ นอกจากนี้มีรายงานว่าปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้นมีผลอย่างมากต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ในซัสเพนชั่นของขิง (Goh and Zhang, 2005) หากปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเซลล์เริ่มต้น ส่งผลให้การเจริญ และเพิ่มปริมาณช้ามาก หากมากเกินไป (2 เปอร์เซ็นต์) ส่งเสริมให้มีการเจริญเร็วมาก แต่ทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากมีออกซิเจน และธาตุอาหารลดลง นอกจากนี้อาจมีสารชีวเคมีโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลมากขึ้น อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในการศึกษานี้ พบว่า การใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นดังกล่าวไม่ส่งเสริมการเจริญ และเพิ่มปริมาณเท่าที่ควร แต่การใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นในช่วง 6-8 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเซลล์เริ่มต้น (ประมาณ 1.5-2 มิลลิลิตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยง 25 มิลลิลิตร) ให้การเพิ่มปริมาณในเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นไปอย่างรวดเร็ว

การแยกโปรโตพลาสต์

ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกมาจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน ซึ่งชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์อาจมีเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันได้ จารุวัฒน์ (2534) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นโกโก้ได้โดยใช้เอนไซม์ไดรซีเลสเพียงชนิดเดียว ในขณะที่พืชหลายชนิดต้องการเอนไซม์ผสม 2 ชนิดขึ้นไป เช่น ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคคัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์โอโนซูกะอาร์10 (Te-chato *et al*., 2005) โสภา (2542) ใช้เอนไซม์ผสม 3 ชนิด คือ เอนไซม์เพคโตไลเอสวาย 23 เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส และมาเซอร์โรไซม์อาร์10 และไดรซีเลส ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก ส่วนในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ผสม 3 ชนิด คือ เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 มาเซอร์โรไซม์อาร์10 และไดรซีเลส พบว่า การเติมเอนไซม์ไดรซีเลสเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกทำให้ได้โปรโตพลาสต์เพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Srisawat และ Kanchanapoom (2005) ใช้เอนไซม์ผสม 3 ชนิด คือ เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 มาเซอร์โรไซม์อาร์10 และไดรซีเลส ในการแยกโปรโตพลาสต์จากคัพภะที่สุกแก่ของปาล์มน้ำมัน ส่วน Dorion และคณะ (1990) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับไดรซีเลส และมาเซอโรไซม์แยกโปรโตพลาสต์จากใบของมะเขือเทศ (*Lycopersicon cheesmanii*) พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด และ Xiu และคณะ (1995) ใช้ไดรซีเลสร่วมกับเซลลูเลส และมาเซอโรไซม์ พบว่า ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงของโสน (*Sesbania bispinosa*) ทั้งนี้เนื่องจากไดรซีเลสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเพคติเนสอยู่ด้วย เมื่อใช้ร่วมกับเซลลูเลส และมาเซอโรไซม์ในระดับความเข้มข้นต่ำ ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มมากขึ้น เมื่อไม่เติมไดรซีเลส พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อย ทั้งนี้เป็นเพราะเซลล์ของพืชจะมีการสร้างสารเพคตินมาพอกไว้ระหว่างเซลล์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ยากขึ้น ทำให้การย่อยสารเพคตินเพื่อแยกเซลล์ให้หลุดออกจากกันนั้นต้องใช้เวลานาน และทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย

แหล่งโปรโตพลาสต์ที่ดีควรเป็นแหล่งที่ให้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก มีความแข็งแรง ไม่แตกง่าย สามารถเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ดี (พัฐวดี, 2536) ลักษณะของเซลล์พืชที่นำมาทำการแยก และเพาะเลี้ยงต้องเป็นพืชที่มีอายุน้อย เพราะเซลล์ยังมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ไม่ซับซ้อน ทำให้เอนไซม์สามารถย่อย และแยกโปรโตพลาสต์ได้รวดเร็วขึ้น โปรโตพลาสต์ที่ได้ก็จะมีความแข็งแรง มีความมีชีวิตสูงนอกจากนี้ยังพบว่าอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยงด้วย ปกติโปรโตพลาสต์ที่แยกมาจากเนื้อเยื่อที่มีอายุมากหรือมีการเจริญเติบโตในขั้นที่สอง มักให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อย เนื่องจากเซลล์มีผนังเซลล์หนา มีสารพวกลิกนิน ซูเบอร์ลิน และคิวติน ซึ่งทำให้ยากแก่การย่อย และเซลล์ส่วนใหญ่จะไม่มีชีวิต หรือหากมีก็ไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไป (ประศาสตร์, 2538) Yin และคณะ (1993) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นข้าวโดยใช้เซลล์อายุ 3-5 วัน หลังย้ายเลี้ยง พบว่า ให้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด และพัฒนาเป็นแคลลัสได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 40 วัน Assani และคณะ (2002) และ Assani และคณะ (2005) แยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วยโดยใช้เซลล์อายุ 3-5 วัน หลังการย้ายเลี้ยง พบว่า ให้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด และพัฒนาเป็นแคลลัสได้ภายใน 77-84 วัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันต้องใช้เซลล์อายุ 12 วัน หลังย้ายเลี้ยงจึงให้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุดแต่โปรโตพลาสต์ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ อาจเนื่องมาจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ อายุมาก หรือมีการเจริญเติบโตในขั้นที่สอง ทำให้มีผนังเซลล์หนา โครงสร้างซับซ้อนขึ้น และมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีออกมาด้วย นอกจากนี้ระยะเวลาการแบ่งเซลล์ในระยะ G1 มีผลต่อการสูญเสียคุณสมบัติการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงด้วย เพราะระยะนี้จะเกิดสั้นหรือยาวนั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมซึ่งมีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงจำนวนดีเอ็นเอเป็นไปได้สูง (สมปอง, 2539) ดังนั้นต้องใช้วิธีพิเศษในการเพาะเลี้ยงจึงจะทำให้เซลล์สามารถพัฒนาต่อไปได้

ระยะเวลาอินคูเบทก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการแยกโปรโตพลาสต์ Lee และคณะ (1989) รายงานว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในพืชแต่ละชนิด และในแต่ละชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน หากระยะเวลาในการอินคูเบทชิ้นส่วนนานขึ้นทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตลดลง สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่า การอินคูเบทเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงความมีชีวิต พบว่า ระยะเวลาดังกล่าวทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องมาจากระยะเวลาที่นานเกินไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาได้นั้นมีโอกาสถูกย่อยสลายจากเอนไซม์ได้นานขึ้นทำให้โปรโตพลาสต์แตกเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นระยะเวลาการอินคูเบทเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันที่เหมาะสมที่สุด คือ 5 ชั่วโมง ส่วนระยะเวลาการอินคูเบทชิ้นส่วนอื่นของปาล์มน้ำมัน พบว่า Te-chato และคณะ (2005) ใช้เวลา 2 ชั่วโมง ในการอินคูเบทเอ็มบริโอเจนิคคัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน ส่วน Srisawat และ Kanchanapoom (2005) รายงานว่าการใช้แคลลัส และคัพภะแก่ต้องใช้เวลาในการอินคูเบทที่นานขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

ชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์มีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีผนังเซลล์ จึงมีความอ่อนแอต่อระดับออสโมติกที่สูงหรือต่ำเกินไป หากโปรโตพลาสต์อยู่ในสภาพที่มีแรงดันออสโมติกสูงจะทำให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซิสโดยน้ำภายในเซลล์จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกภายนอก ทำให้โปรโตลาสต์เหี่ยว ในทางตรงกันข้ามโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสภาพที่มีระดับแรงดันออสโมติกต่ำเกินไปจะทำให้น้ำภายนอกเซลล์เคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เต่ง และแตกในที่สุด ดังนั้นแรงดันออสโมติกของสารละลายเอนไซม์ที่อยู่รอบโปรโตพลาสต์จะต้องอยู่ในสภาพสมดุล โดยทั่วไปการปรับแรงดันออสโมติกของสารละลายเอนไซม์โดยการเติมสารละลายออสโมติคัมซึ่งนิยมใช้สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอลหรือซอร์บิทอล เนื่องจากไม่มีผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้มีคุณสมบัติคงที่ในระหว่างการเพาะเลี้ยง สำหรับการทดลองนี้ใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัมเพียงอย่างเดียว พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เหมาะสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมัน สอดคล้องกับรายงานของ Te-chato และคณะ (2005) ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิค

คัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมัน และ ชวนพิศ (2544) ในการแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นยางพารา ในขณะที่ Srisawat และ Kanchanapoom (2005) ใช้ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากคัพภะปาล์มน้ำมัน ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์แตกต่างกันย่อมทำให้มีองค์ประกอบ โครงสร้าง และแรงดันออสโมติกภายในเซลล์แตกต่างกันด้วย

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

โดยทั่วไปอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะคล้ายคลึงกับอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อทั่วไป แต่จำเป็นต้องเติมออสโมติคัมลงไปด้วย เพื่อควบคุมความดันออสโมติก ทั้งนี้เพราะโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ ความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับที่เติมลงในสารละลายเอนไซม์ นอกจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแล้ว ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ก็ส่งผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ แม้พืชในสกุลเดียวกันก็ยังต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เนื่องมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีส่วนสำคัญในการชักนำการสร้างผนังเซลล์ และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ซึ่งในพืชต่างชนิดกันจะมีความต้องการธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะอาหารบางชนิดเหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่แต่อาจไม่เหมาะสมต่อพัฒนาการของเซลล์ ในขณะที่อาหารที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์อาจไม่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอาจมีผลต่อการขยายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์จนแตกได้ (Balestri and Cinelli, 2002) การศึกษานี้พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์ มีการแบ่งเซลล์มากที่สุด ในขณะที่ Te-chato และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคคัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมัน ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์มากที่สุด ส่วน Srisawat และ

Kanchanapoom (2005) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากคัพภะปาล์มน้ำมันในอาหาร Y3 ที่เติมวุ้นอากาโรส 0.3 เปอร์เซ็นต์ พิคลอแรม เข้มข้น 3.8 ไมโครโมลาร์ 2,4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ ไคนีติน เข้มข้น 9.3 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เริ่มต้นสูงสุด Prasertsongskun (2004) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากจากเซลล์ซัสเพนชั่นของหญ้าแฝกในอาหารเหลวสูตร N6 ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์มากที่สุด การตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างที่กันอาจเนื่องมาจากชิ้นส่วน และพืชต่างชนิดกัน จึงมีความต้องการธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในการแบ่งเซลล์ และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ นอกจากนี้การลดแรงดันออสโมติกของอาหารอย่างช้า ๆ มีความจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ หากไม่มีการลดส่งผลให้โปรโตพลาสต์ของเซลล์ที่เกิดใหม่จะมีพลาสโมไลซีสขึ้นมาอีก และหดตัวหลุดจากผนังเซลล์ที่เกิดใหม่ การลดแรงดันออสโมติกทำได้โดยเติมอาหารใหม่ที่มีการลดสารออสโมติคัมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Katsirdakis and Roubelakis, 1992) ในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการลดสารออสโมติคัมที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การแบ่งเซลล์หยุดลง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรลดความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง โดยการเติมอาหารที่มีความเข้มข้นของสารออสโมติคัมต่ำเป็นลำดับลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่แน่นอน และย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่เพื่อให้เกิดการสร้างแคลลัส และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป

ความหนาแน่นเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อความสำเร็จต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์ เพราะถ้าใช้ความหนาแน่นเริ่มต้นน้อยจะทำให้โปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนา หากใช้โปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ความหนาแน่นมากทำให้เกิดการเกาะติดกันของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้โปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์จะมีการสร้างสารชีวเคมีออกมา ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถพัฒนาต่อไป และตายในที่สุด (Sun *et al*., 2005) ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อยู่ระหว่าง $1x10^4$ และ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากรายงานพบว่าพืชแต่ละชนิดจะใช้ความหนาแน่นเริ่มต้นของโปรโตพลาสต์ในการเพาะเลี้ยงต่างกัน อาจจะใช้ความหนาแน่นต่ำ ปานกลาง และสูง จึงจะสามารถเจริญ และพัฒนาได้ สำหรับพืชที่ใช้ความหนาแน่นต่ำ

เช่น Julien และคณะ (1998) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สะระแหน่ (Peppermint) ด้วยความหนาแน่น $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาเป็นแคลลัส และเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ Raikar และคณะ (2008) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของถั่วอาหารสัตว์ (*Lotus corniculatus*) ด้วยความหนาแน่น 7-8 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาเป็นแคลลัส และเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ สำหรับปาล์มน้ำมัน และพืชส่วนใหญ่ พบว่าจะเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นปานกลาง (10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับ Te-chato และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของเอ็มบริโอเจนิคคัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Srisawat และ Kanchanapoom (2005) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากคัพภะปาล์มน้ำมันโดยปรับความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงเป็น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด Assani และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วยด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริออยด์ได้ และสอดคล้องกับการศึกษานี้ พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และแบ่งเซลล์สูงสุดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นไม่มีการพัฒนาต่อไปอีก และตายในที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงน้อยเกินไปหรือไม่เหมาะสมทำให้เซลล์มีการปล่อยสารพวกเมเทบอไลท์น้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต และการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ Sajise และ Sagawa (1988) พบว่า การใช้ความหนาแน่นสูงในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสกล้วยไม้ฟาแลนนอปซีสด้วยความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้ความหนาแน่นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อประสิทธิภาพ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

อาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของโปรโตพลาสต์ จากการทดลองนี้ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกมาจากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS และ Y3 ที่เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบาเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุดในอาหาร MS สอดคล้องกับการศึกษาของ Te-chato และคณะ (2005) ที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของเอ็มบริโอเจนิคคัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมให้การแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากอาหารสูตร MS มีองค์ประกอบของไนโตรเจนสูง ซึ่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาของเซลล์ เนื่องจากอาหารสูตร MS มีระดับไนโตรเจนสูงกว่าอาหารสูตร Y3 อาหารสูตร MS จึงส่งเสริมให้เซลล์มีการพัฒนาที่ดีกว่า (Thiruvengadam *et al*., 2006) อย่างไรก็ตาม Srisawat และ Kanchanapoom (2005) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากคัพภะปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร Y3 ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชิ้นส่วนพืช นอกจากนี้วิธีการเพาะลี้ยงเพื่อให้ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากโปรโตพลาสต์มีความบอบบางแตกง่าย ดังนั้นการดูแลรักษาจึงมีความจำเป็นอย่างมากจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโต พลาสต์ทั้ง 4 วิธีนี้ พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ และมีชีวิตรอดได้ประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะไม่มีพัฒนาการต่อไปอีก เนื่องมาจากโมเลกุลของสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ทันที ทำให้เซลล์ไม่ขาดสารอาหร ส่งผลให้สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ สอดคล้องกับ Srisawat และ Kanchanapoom (2005) ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากคัพภะปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 6.91 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะไม่มีพัฒนาการต่อไปอีก แม้ว่าในพืชจำนวนมากประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากการใช้วิธีการตรึงในอาหารแข็ง (วุฒิชัย, 2550) อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Te-chato *et al*., 2005) และแบบอากาโรสบีด (นิจวรรณ, 2545) แต่จากการศึกษานี้ไม่ประสบผลสำเร็จ เพราะโปรโตพลาสต์แตกเป็นส่วนใหญ่ ไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ และตายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เนื่องจากโมเลกุลของสารอาหารแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ยากทำให้ขาดอาหาร และตายในที่สุด อย่างไรก็ตาม

Te-chato และคณะ (2005) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคคัลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 2.3-4 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวช่วยยับยั้งการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของโปรโตพลาสต์โดยไม่ทำให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอนเซลล์จึงได้รับสารอาหารอย่างเพียงพอส่งผลโปรโตพลาสต์ให้เกิดการแบ่งเซลล์ และพัฒนาต่อไปได้

สำหรับโปรโตพลาสต์ของปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยง ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ อาจเนื่องมาจากชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ยังไม่เหมาะสมต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรปรับชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และลดความเข้มข้นของออสโมติคัมโดยเติมอาหารที่ลดออสโมติคัมลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยตามความเหมาะสมของระยะเวลาที่เลี้ยง ร่วมกับการย้ายไปยังอาหารใหม่เพื่อให้เกิดการสร้างแคลลัส และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป

บทที่ 5

สรุป

เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันที่ปริมาตรเริ่มต้น 2 มิลลิลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด 2-3 เท่า มีลักษณะเป็น sigmoid curve ซึ่งระยะ lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วันหลังการเพาะเลี้ยง ระยะ log phase อยู่ในช่วง 12-24 วันหลังการเพาะเลี้ยง และระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป

สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มาเซอร์โรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $9.93x10^5$ โปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 90.5 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันที่มีอายุ 12 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.94×10^6 โปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์

การอินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 8.73×10^5 โปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 87.76เปอร์เซ็นต์

แมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.2x10^5$ โปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร และความมีชีวิตสูงสุด 91.83 เปอร์เซ็นต์

อาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไดแคมบา เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 3.08±2.2 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์/ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 2.38±0.5 เปอร์เซ็นต์

อาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 2.33±0.7 เปอร์เซ็นต์แต่โปรโตพลาสต์ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส และพืชต้นใหม่ได้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. 2549. “ไบโอดีเซล” จากพืชสวนสู่พลังงานชาติ. หนังสือพิมพ์ข่าวสด. 15: 33.

คำนูณ กาญจณภูมิ. 2539. เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คำนูณ กาญจณภูมิ. 2541. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยเทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น. สงขลา: รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์.

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์. 2534. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิตเกษม เที่ยงจิตต์ และ สุเม อรัญนารถ. 2547. การชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงบุณฑริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35: 19-23.

ชวนพิศ นิยะกิจ. 2544. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) และการปลูกถ่ายยีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ชัยรัตน์ นิลนนท์ ธีระพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

นิจวรรณ สนิทงาม. 2545. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง [*Azadirachta excels* (Jack) Jaccobs]. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3. ณ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. หน้า 25-26.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประภา ศรีพิจิตต์ และเสาวรี ดังสกุล. 2543. การสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ105. วารสารวิชาการเกษตร 18: 266-279.

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

พัฐวดี ทองสีดำ. 2536. การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. คัมภีร์ปาล์มน้ำมันพืชเศรษฐกิจเพื่อบริโภคและอุปโภค. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และ สมปอง เตชะโต. 2542. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น การแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21: 169-177.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และ สมปองเตชะโต. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22: 411-420.

วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน. 2532. การเกิดเอ็มบริออยด์และต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

วุฒิชัย ไข่มุกต์. 2550. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ช้างแดง (*Rhynchostylis gigantea*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล วินาภรณ์ กุฎีรัตน์ และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ. 2541. ปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2549. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทรบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมัชชา นาคสมบัติ และ สมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย (Hoya spp.) และการปลูกถ่ายยีน. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 23: 193-201.

สมปอง เตชะโต. 2536ก. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2536ข. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ หลักการ และพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต อาสลัน หิเล และลัดลาวัลย์ มูสิกะปาละ. 2548. การสร้างโคโลนีขนาดเล็กจากโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27: 277-284.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2540. แนวทางการพัฒนาปาล์มน้ำมันในแผนฯ 8 (2540-2544) ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร.

Alice, B. and William, H. 1984. Conditions for isolation and regeneration of viable protoplasts of oil palm (*Elaeis guineensis*). Plant Cell Reports 3: 169-171.

Aida, A. R., Awatef, M. B. E. and Ahmed, A. N. 2007. Protoplast Isolation, salt stress and callus formation of two date palm genotypes. Journal of Applied Sciences Research 3: 1186-1194.

Ai-Ping, D., Hong-Fan, W. and Yu-Fen, C. 1995. Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplast of apple (Mulus x domestic acv. Starkrimson). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 145-149.

Balestri, E. and Cinelli, F. 2001. Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from *Posidonia oceanic* and *Cymodocea nodosa*. Aquatic Botany 129: 56-67.

Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R. and Ducreux, G. 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. Comptes Rendus Biologies 330: 392-401.

Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles. Nature 187: 962-963.

Deo, P. C., Taylor, M., Harding, R. M., Tyagi, A. P. and Becker, D. K. 2009. Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100: 283-291.

Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palm (*Cocos nucifera*) and culture *in vitro*. Plant Physiology 36: 23-28.

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

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. and Rival, A. 2003. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenis dactylifera* L., cv Deglet Nour. Plant Cell Reports 21: 517-524.

Goh, Y. and Zhang, Z. 2005. Establishment and plant regeneration of somatic embryogenic cell suspension cultures of the *Zingiber officinale* Rosc. Scientia Horticulturae 107: 90-96.

Hu, W. W., Wong, S. W. Loh, C. S. and Goh, C. J. 1998. Synergism in replication of Cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) RNA in orchid protoplasts. Archives of Virology 143: 1265-1275.

Jullien, F., Florence, D., Monique, C. and Olivier, F. 1998. An optimising protocol for protoplast regeneration of three peppermint cultivars (*Mentha* x *piperita*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 153-159.

Kao, K. N. and Michaylux, M. R. 1974. Nutritionnal requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid medium. Planta 126: 105-110.

Koh, M. C., Goh, C. J. and Loh, C. S. 1988. Protoplast isolation and culture of *Aranda* hybrids. Malayan Orchid Review 22: 70-78.

Li, D. and Bao, M. 2005. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultured cells of *Cinnamomum camphora* L. Plant Cell Reports 24: 462-467.

Lee, L., Schroll, R. E., Grimes, H. D. and Hodges, T. K. 1989. Plant regeneration from indica rice (*Oryza sativa* L.) protoplast. Biologia Plantarum 178: 325-333.

Lourdes, C., Begon, G. S., Benito P. and Vicente, M. 2009. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100: 107-112.

Megia, R., Haicour, R., Rossignol, L. and Sihachakr, D.1992. Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.) Plant Science 85: 91-98.

Mizuhiro, M., Kenichi, Y., Ito, K., Kadowaki, S., Ohashi, H. and Mii, M. 2001. Plant regeneration from cell suspension- derived protoplast of *Primula molacoides* and *Primula obcanica*. Plant Science 160: 1221-1228.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Prasertsongskun, S. 2004. Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver. Songklanakarin Journal of Science and Technology 26: 411-416.

Rabechault, H., Martin J. P. and Gas, S. 1972. Researches sur la culture des rissue de plumier a huile. (*Elaeis guineensis* Jacq.) Oleagineux 27: 531-534.

Raikar, S. V., Braun, R. H., Bryant, C., Conner, A. J. and Christey, M. C. 2008. Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* Protoplasts. Plant Biotechnology Reports 2: 171–177.

Shrestha, B. R., Tokuhara, K. and Mii, M. 2007 .Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis.* Plant Cell Reports 26: 719–725.

Srisawat, T. and Kanchanapoom,K. 2005. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) ScienceAsia 31: 23-28.

Sun, Y., Zing, X., Huang, C. Nie, Y. and Guo, X. 2005. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker 201 (*Gossypium hirsutum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 309-314.

TakebeI, L. G. and Melchers, G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 318-320.

Te-chato, S., Asalan, H. and Luddawan, M. 2005. Microcolony formation from embryogenic callus-derived protoplasts of oil palm. Songklanakarin Journal of Science and Technology 27: 685-691.

Teixeira, J. B., Sondahl, M. R., Nakamura, T. and Kirby, E. G. 1995. Establishment of oil palm cell suepension culture and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 105-111.

Teo, C.K.H. and Neuman, K.H. 1978. The culture of protoplasts isolated from *Renantanda* Rosalind Cheok. The Orchid Review 86: 156-158.

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

Touchet (de), B., Duval, Y. and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Plant Cell Reports 10: 529-532.

Traud, W., Janine, S. and Margrethe. S. 2006. Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 337–347.

Yang, X., Guo, X., Zhang, X., Nie, Y. and Jin, S. 2007. Plant regeneration from *Gossypium davidsonii* protoplasts *via* somatic embryogenesis. Biologia Plantarum 51: 533-537.

Yin, Y., Li, S., Chen, Y., Guo, H., Tian, W., Chen, Y. and Li, L. 1933. Fertile plant regenerated from suspension culture-derived protoplasts of an indica type rice (*Oryza sativa* L.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 61-68.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
$MnSO_4 1H_2O$	16.90
$ZnSO_4 7H_2O$	10.60
$CuSO_4 5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25
$CoCl_2 6H_2O$	0.025
$CaCl_2 2H_2O$	440.00
$MgSO_4 7H_2O$	370.00
$FeSO_4 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCl(B6)	0.50
ThiamineHCl(B1)	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000
pH 5.7	

ภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Y3

องค์ประกอบ	ปริมาตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
KNO_3	2,020.00
KH_2PO_4	170.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	8.30
NH_4Cl	535.00
KCl	1,492.00
$NaH_2PO_2H_2O$	312.00
$MnSO_41H_2O$	11.20
$ZnSO_47H_2O$	0.025
$CuSO_45H_2O$	0.16
$Na_2MoO_42H_2O$	0.24
$CoCl_26H_2O$	0.24
$CaCl_22H_2O$	294.00
$MgSO_47H_2O$	247.00
$FeSO_47H_2O$	2.78
Na_2EDTA	3.73
Sucrose	30,000
pH 5.7	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสกุลรัตน์ สุวรรณโณ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620028

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรม การการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ