บทที่ 3

ผล

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโป๊ยเซียน

1.1 การชักนำแคลลัส

1.1.1 การชักนำแคลลัสจากลำต้นโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetinในระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อนำลำต้นโป๊ยเซียนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรวางไว้ในที่มีแสง หลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน สังเกตเห็นแคลลัสเริ่มเกิดขึ้นตรงบริเวณรอบๆรอยตัดของลำต้น ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่นหรือที่เรียกว่า คอมแพคแคลลัส (compact callus) จากนั้นอีก 60 วัน แคลลัสเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 3) จึงนับจำนวนลำต้นที่เกิดแคลลัสและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส พบว่าในทุกความเข้มข้นของการทดลองที่มี 2,4-D สามารถชักนำให้ลำต้นสร้างแคลลัสได้ และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสอยู่ระหว่าง 0.74 ถึง 1.87 เซนติเมตร (ตารางที่ 3) โดยการใช้ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลำต้นสร้างแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (1.87 เซนติเมตร) รองลงมาได้แก่ 2, 4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.18 เซนติเมตร) 2, 4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.90 เซนติเมตร) และ 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.74 เซนติเมตร) ตามลำดับ

สรุปผลจากการทดลองชักนำแคลลัสจากลำต้นในอาหารสูตรที่มี 2,4-D พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลำต้นเกิดแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.87 เซนติเมตร ส่วนในอาหารที่ไม่มี 2,4-D ลำต้นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

หลังจากนำชิ้นส่วนของลำต้นโป๊ยเซียนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารทุกสูตรที่มี 2iP สามารถชักนำให้ลำต้นของโป๊ยเซียนเกิดเป็นแคลลัสได้หมด เมื่อเพาะเลี้ยงประมาณ 15วัน พบว่าจะเริ่มเกิดแคลลัสบริเวณรอบๆรอยตัด จากนั้นอีกประมาณ 45 วัน จะเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีเขียวอ่อน เซลล์เกาะตัวกันแน่น โดยพบว่าอาหารที่มี 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลำต้นสร้างแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (1.53 เซนติเมตร) รองลงมาได้แก่ 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.03

เซนติเมตร) 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.96 เซนติเมตร) และ 2iP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.45 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และ ตารางที่ 4) สรุปผลจากการทดลองชักนำแคลลัสจากลำต้นในอาหารสูตรที่มี 2iP พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ลำต้นเกิดแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.53 เซนติเมตร ส่วนในอาหารที่ไม่มี 2iP พบว่าลำต้นไม่เกิดแคลลัส เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

ส่วนในอาหารที่มี และไม่มี Kinetin ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากลำต้นได้ โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไปประมาณ 15 วัน เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และปล่อยสารสีน้ำตาลลงในอาหาร หลังจากนั้นประมาณ 30 วัน เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และตายในที่สุด

ภาพที่ 3 การเกิดแคลลัสจากลำต้นโป๊ยเซียนบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน

Figure 3 Callus formation from stem of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium supplemented with 0.5 1.0 1.5 and 2.0 mg/l 2,4-D (from left to right) for 60 days.

ตารางที่ 3 การเกิดแคลลัสจากลำต้นของโป๊ยเซียนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MSที่เติม 2, 4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 วัน

Table 3 Callus formation from stem of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium containing 2,4-D at various levels for 60 days.

2,4-D concentrations (mg/l)	Size of callus (cm)
0.0	0.00 ± 0.00d
0.5	0.74 ± 0.50c
1.0	1.87 ± 1.18a
1.5	1.18 ± 0.78b
2.0	0.90 ± 0.78c
F-test	**
C.V. (%)	24.0

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note **Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

ภาพที่ 4 การเกิดแคลลัสจากลำต้นโป๊ยเซียนบนอาหารสูตร MS ที่มี 2iP ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน

Figure 4 Callus formation from stem of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium supplemented with 0.5 1.0 1.5 and 2.0 mg/l 2iP (from left to right) for 60 days.

ตารางที่ 4 การเกิดแคลลัสจากลำต้นของโป๊ยเซียนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MS ที่เติม 2iP ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 วัน

Table 4 Callus formation from stem of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium containing 2iP at various levels for 60 days.

2iP concentrations (mg/l)	Size of callus (cm)
0.0	0.00 ± 0.00d
0.5	0.45 ± 0.38c
1.0	1.53 ± 0.48a
1.5	1.03 ± 0.51b
2.0	0.96 ± 0.48b
F-test	**
C.V. (%)	14.1

หมายเหตุ ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note ** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

1.1.2 การชักนำแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

การชักนำแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียน พบว่าในอาหารทุกสูตรที่มี 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยหลังจากการเพาะเลี้ยง 15 วัน สังเกตเห็นการบวมและแคลลัสเกิดรอบๆรอยตัดของข้อ หลังจากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 60 วัน แคลลัสเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะของแคลลัสเป็นก้อนแข็ง เซลล์เกาะตัวกันแน่น สีเขียว และบริเวณรอบๆแคลลัสเกิดปุยสีเขียวอ่อนที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม (ภาพที่ 5) โดยที่ความเข้มข้น 2,4 –D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.95 เซนติเมตร รองลงมาคือ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.30 เซนติเมตร) 2, 4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.10 เซนติเมตร) และ 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.50 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วนในอาหารที่ไม่มี 2, 4-D พบว่า ข้อไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดเช่นเดียวกับลำต้น สรุปผลจากการทดลองชักนำ

แคลลัสจากข้อในอาหารสูตรที่มี 2,4-D พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ข้อเกิดแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.95 เซนติเมตร

ภาพที่ 5 การเกิดแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียนบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4 -D ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน

Figure 5 Callus formation from node of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium supplemented with 0.5 1.0 1.5 and 2.0 mg/l 2,4-D (from left to right) for 60 days.

ตารางที่ 5 การเกิดแคลลัสจากข้อของโป๊ยเซียนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 วัน

Table 5 Callus formation from node of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium containing 2,4-D at various levels for 60 days.

2,4-D concentrations (mg/l)	Size of callus (cm)
0.0	0.00 ± 0.00d
0.5	1.30 ± 0.71b
1.0	1.95 ± 0.56a
1.5	1.10 ± 0.86b
2.0	0.50 ± 0.49c
F-test	**
C.V. (%)	30.0

หมายเหตุ ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note ** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

การชักนำแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียนบนอาหารสูตร MS ที่มี 2iP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตรที่มี 2iP โดยที่ความเข้มข้น 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีสีเขียวเข้มและมีขนาดใหญ่ที่สุด (1.51 เซนติเมตร) รองลงมาได้แก่ 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.00 เซนติเมตร) 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.85 เซนติเมตร) และ 2iP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.56 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่าบนก้อนแคลลัสจะเกิดเป็นตุ่มสีแดงๆ และเกิดยอดเดี่ยวๆประมาณ 1- 2 ยอด ตรงบริเวณรอยตัดของข้อ (ภาพที่ 6) ส่วนในอาหารที่ไม่มี 2iP พบว่า ข้อไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด สรุปผลจากการทดลองชักนำแคลลัสจากข้อในอาหารสูตรที่มี 2iP พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ข้อเกิดแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.51 เซนติเมตร

ตารางที่ 6 การเกิดแคลลัสจากข้อของโป๊ยเซียนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรMS ที่เติม 2iP ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 วัน

Table 6 Callus formation from node of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium containing 2iP at various levels for 60 days.

2iP concentrations (mg/l)	Size of callus (cm)
0.0	0.00 ± 0.00d
0.5	0.56 ± 1.09c
1.0	1.00 ± 1.47b
1.5	1.51 ± 1.06a
2.0	0.85 ± 0.74b
F-test	**
C.V. (%)	10.4

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note **Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

ภาพที่ 6 การเกิดแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียนบนอาหารสูตร MS ที่มี 2iP ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน

Figure 6 Callus formation from node of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium supplemented with 0.5 1.0 1.5 and 2.0 mg/l 2iP (from left to right) for 60 days.

การชักนำแคลลัสจากข้อบนอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตร ที่มี Kinetin โดยหลังจากการเพาะเลี้ยง 15 วัน สังเกตเห็นบริเวณรอยตัดของข้อเกิดการบวมและเห็นแคลลัสเริ่มเกิดขึ้นที่ผิวของเนื้อเยื่อตรงรอยตัด เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 60 วัน แคลลัสเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะของแคลลัสเป็นก้อนแข็งสีเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น และบริเวณรอบๆแคลลัสเกิดตุ่มสีแดง (ภาพที่ 7) โดยที่ความเข้มข้น Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 1.81 เซนติเมตร รองลงมาคือ Kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.26 เซนติเมตร) และ Kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.26 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ส่วนในอาหารที่ไม่มี Kinetin พบว่า ข้อไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายเช่นเดียวกับในอาหารสูตรที่ไม่มี 2,4-D และ 2iP

สรุปผลจากการทดลองชักนำแคลลัสจากข้อในอาหารสูตรที่มี Kinetin พบว่าที่ระดับความเข้มข้น Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ข้อเกิดแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.81 เซนติเมตร

ภาพที่ 7 การเกิดแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียนบนอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน

Figure 7 Callus formation from node of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium supplemented with 0.5 1.0 1.5 and 2.0 mg/l Kinetin (from left to right) for 60 days.

ตารางที่ 7 การเกิดแคลลัสจากข้อของโป๊ยเซียนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MS ที่เติม Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 วัน

Table 7 Callus formation from node of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium containing Kinetin at various levels for 60 days.

Kinetin concentrations (mg/l)	Size of callus (mg/l)
0.0	0.00 ± 0.00d
0.5	1.26 ± 0.48c
1.0	1.26 ± 0.53c
1.5	1.30 ± 0.70b
2.0	1.81 ± 0.64a
F-test	**
C.V. (%)	11.8

หมายเหตุ ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note ** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

1.1.3 การชักนำแคลลัสจากใบโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

การชักนำแคลลัสจากใบ พบว่าในอาหารทุกสูตรที่มี และไม่มี 2, 4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงไป ประมาณ 30 วัน ชิ้นส่วนของใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด

การชักนำแคลลัสจากใบในอาหารสูตร MS ที่มี 2iP พบว่าสามารถเกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในอาหารที่มี 2iP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.16 เซนติเมตร) รองลงมาได้แก่ 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.81 เซนติเมตร) 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.48 เซนติเมตร) และ 2iP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.36 เซนติเมตร) ตามลำดับซึ่งพบว่าส่วนโคนใบจะเกิดการบวมและมีแคลลัสเกิดขึ้นก่อนส่วนอื่นๆ (ภาพที่ 8 และตารางที่ 8) ส่วนในอาหารที่มี Kinetin ใบไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไปประมาณ 15 วัน เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และปล่อยสารสีน้ำตาลลงในอาหาร หลังจากนั้นประมาณ 30 วัน เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และตายในที่สุด สรุปผลจากการทดลองชักนำแคลลัสจากใบในอาหารสูตรที่มี 2,4-D Kinetin และ 2iP พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ใบเกิดแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 1.16 เซนติเมตร ส่วนในอาหารที่ไม่มี 2iP พบว่าไม่สามารถชักนำให้ลำต้นเกิดแคลลัสได้เช่นเดียวกับในอาหารที่มีและไม่มี 2,4-D และ Kinetin โดยเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด

ภาพที่ 8 การเกิดแคลลัสจากใบโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2iP ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน

Figure 8 Callus formation from leaf of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium supplemented with 0.5 1.0 1.5 and 2.0 mg/l 2iP (from left to right) for 60 days.

ตารางที่ 8 การเกิดแคลลัสจากใบของโป๊ยเซียนเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MS ที่เติม 2iP ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 60 วัน

Table 8 Callus formation from leaf of *E. milii* Desmoulin cultured on MS medium containing 2iP at various levels for 60 days.

2iP concentrations (mg/l)	Size of callus (cm)
0.0	0.00 ± 0.00d
0.5	0.36 ± 0.45c
1.0	0.48 ± 0.94c
1.5	0.81 ± 0.78b
2.0	1.16 ± 0.80a
F-test	**
C.V. (%)	16.2

หมายเหตุ ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note ** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

1.2 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอด

เมื่อนำแคลลัสที่มีลักษณะแบบคอมแพค ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยง ลำต้น ข้อ และใบ บนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ซึ่งให้แคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุดจากตอนที่ 1.1.1 1.1.2 และ 1.1.3 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารทุกสูตรที่มี BA สามารถชักนำให้แคลลัสของโป๊ยเซียนเกิดเป็นยอดรวมได้ลักษณะที่คล้ายๆกัน เช่น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าแคลลัสบางก้อนมีจุดสีเขียวเข้มเกิดขึ้นที่บริเวณผิวแคลลัส (ภาพที่ 9) หลังจากนั้นประมาณ 20 วัน จุดสีเขียวจะพัฒนาไปเป็นยอดให้เห็นชัดเจน (ภาพที่ 10) และเมื่อเพาะเลี้ยงไปอีกประมาณ 90 วัน พบว่าจะได้ยอดที่มีลักษณะยอดเป็นยอดเดี่ยวๆ ที่เกิดอยู่เป็นกระจุก แต่สามารถแยกเป็นยอดเดี่ยวๆได้ง่าย ใบมีสีเขียวสด ลำต้นสีเขียวเข้ม ปนแดง และมีหนามสีแดงอ่อนๆ ยอดที่เกิดค่อนข้างสมบูรณ์ ส่วนในอาหารที่ไม่มี BA พบว่าแคลลัสจะไม่พัฒนาไปเป็นยอดหรือจุด

สีเขียวแต่มีการขยายขนาดโตขึ้น เซลล์เกาะกันแน่นสีเขียวอมขาว บางก้อนก็เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด (ภาพที่ 11)

ภาพที่ 9 ลักษณะของแคลลัสที่มีจุดสีเขียวเข้มเกิดขึ้นรอบๆ ผิวแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

Figure 9 Callus with green nodule occurred on the surface when cultured on MS medium containing 3 mg/l BA for 30 days.

ภาพที่ 10 แคลลัสที่เจริญเป็นยอดให้เห็นชัดเจนหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 50 วัน

Figure 10 Clearly visible shoots derived from callus when cultured on MS medium containing 3.0 mg/l BA for 50 days.

ภาพที่ 11 ลักษณะของแคลลัสที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

Figure 11 Dark brown callus when cultured on MS-free growth regulator medium.

1.2.1 การชักนำยอดจากแคลลัสที่มาจากลำต้น และ ข้อ ในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การชักนำยอดรวมจากแคลลัสที่มาจากลำต้นในอาหารสูตรที่มี 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดรวมได้ โดยที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดรวมมากที่สุด คือ 10.90 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 9) ลักษณะยอดจะเป็นยอดที่มีขนาดใหญ่ ไม่สูง ใบมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดใหญ่ (ภาพที่12) รองลงมาคือ แคลลัสที่มาจากข้อสามารถเกิดยอดรวมได้ โดยที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 6.56 ยอดต่อแคลลัส ลักษณะยอดจะเป็นยอดที่มีขนาดใหญ่ ไม่สูง ใบมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 9 การเจริญของแคลลัสจากลำต้น ข้อ และ ใบในอาหารสูตรต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดยอดสูตร MS ที่เติม BA ในระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 90 วัน

Table 9 Growth of shoots from callus derived from stem, node and leaf cultured on MS shoot induction medium supplemented with BA at various concentrations for 90 days.

Source of callus	Number shoot /callus					F-test	CV (%)
	BA concentration (mg/l)						
	0.0	1.0	3.0	5.0	7.0		
1. node (2.0 mg/l Kinetin)	0.00±0.00d	4.50±0.45c	12.10±1.00a	6.63±1.37b	6.03±1.34b	**	7.0
2. node (1.0 mg/l 2,4-D)	0.00±0.00d	4.10±0.53c	6.56±0.67a	5.10±0.78b	4.16±0.66c	**	7.7
3. node (1.5 mg/l 2iP)	0.00±0.00d	4.46±0.60c	6.33±0.87a	5.03±0.53b	4.16±0.48c	**	9.6
4. stem (1.0 mg/l 2,4-D)	0.00±0.00d	3.86±0.80c	10.90±0.65a	6.63±0.87b	4.30±0.70c	**	21.7
5. stem (1.0 mg/l 2iP)	0.00±0.00d	2.33±1.09c	5.93±0.53a	4.20±0.90b	2.06±0.40c	**	4.1
6. leaf (2.0 mg/l 2iP)	0.00±0.00d	1.10±0.30c	5.30±0.91a	3.13±1.00b	1.66±0.87c	**	8.2

หมายเหตุ ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note ** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in row are significantly different by DMRT.

ภาพที่ 12 การเกิดยอดรวมของแคลลัสที่มาจากลำต้นในอาหารสูตร ที่มี 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 9 0 วัน

Figure 12 Multiple shoot formation from stem-derived callus induced from medium containing 1.0 mg/l 2,4-D when cultured on MS medium supplemented with 1.0 3.0 5.0 and 7.0 mg/l BA (from left to right) for 90 days.

ภาพที่ 13 การเกิดยอดรวมของแคลลัสที่มาจากข้อในอาหารสูตร ที่มี 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 9 0 วัน

Figure 13 Multiple shoot formation from node-derived callus induced from medium containing 1.0 mg/l 2,4-D when cultured on MS medium supplemented with 1.0 3.0 5.0 and 7.0 mg/l BA (from left to right) for 90 days.

1.2.2 การชักนำยอดจากแคลลัสที่มาจากข้อในอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

แคลลัสที่มาจากข้อในอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด โดยพบว่าที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด เท่ากับ 12.10 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 9) ลักษณะยอดจะเป็นยอดเล็กๆ ไม่สูง ใบมีสีเขียวเข้มและมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 14) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ BA 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 120 วัน ยอดที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นแผง ลำต้นเชื่อมต่อกันเป็นทางยาวคล้ายต้นกำแพงเมืองจีน และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 150 วัน พบว่าจะเห็นลักษณะยอดที่ยืดยาวชัดเจนมากขึ้น และลำต้นสูงขึ้น (ภาพที่ 15 A และ B)

ภาพที่ 14 การเกิดยอดรวมของแคลลัสที่มาจากข้อ ในอาหารสูตรที่มี Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 90 วัน

Figure 14 Multiple shoot formation from node-derived callus induced from medium containing 2.0 mg/l Kinetin when cultured on MS medium supplemented with 1.0 3.0 5.0 and 7.0 mg/l BA (from left to right) for 90 days.

(A) (B)

ภาพที่ 15 การเกิดยอดรวมเป็นแผงต่อกันเป็นทางยาวคล้ายต้นกำแพงเมืองจีน หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 120วัน (A) และ 150 วัน (B)

Figure 15 Multiple shoot formation from node-derived callus induced from medium containing 2.0 mg/l Kinetin when culture on MS medium supplemented with 7.0 mg/l BA for 120 days (A) and 150 days (B).

1.2.3 การชักนำยอดจากแคลลัสที่มาจาก ลำต้น ข้อ และใบ ในอาหารสูตร MS ที่มี 2iP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

แคลลัสที่มาจากข้อในอาหารสูตรที่มี 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้โดยที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงสุดเท่ากับ 6.33 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 9) ลักษณะยอดจะเป็นยอดที่มีขนาดใหญ่ไม่สูง ใบมีสีเขียวเข้มและมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 16) รองลงมาคือแคลลัสที่มาจากลำต้นในอาหารสูตรที่มี 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงสุดเท่ากับ 5.93 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 9) ลักษณะยอดจะเป็นยอดที่มีขนาดใหญ่ ไม่สูง ใบมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 17) ส่วนแคลลัสที่มาจากใบในอาหารสูตรที่มี 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้โดยที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงสุดเท่ากับ 5.30 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 9) ลักษณะยอดจะเป็นยอดที่มีขนาดเล็ก ไม่สูง ใบมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 18)

ภาพที่ 16 การเกิดยอดรวมของแคลลัสที่มาจากข้อในอาหารสูตร ที่มี 2iP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 9 0 วัน

Figure 16 Multiple shoot formation from node-derived callus induced from medium containing 1.0 mg/l 2iP when cultured on MS medium supplemented with 1.0 3.0 5.0 and 7.0 mg/l BA (from left to right) for 90 days.

ภาพที่ 17 การเกิดยอดรวมของแคลลัสที่มาจากลำต้นในอาหารสูตร ที่มี 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 9 0 วัน

Figure 17 Multiple shoot formation from stem-derived callus induced from medium containing 1.0 mg/l 2iP when cultured on MS medium supplemented with 1.0 3.0 5.0 and 7.0 mg/l BA (from left to right) for 90 days.

ภาพที่ 18 การเกิดยอดรวมของแคลลัสที่มาจากใบในอาหารสูตร ที่มี 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 9 0 วัน

Figure 18 Multiple shoot formation from leaf-derived callus induced in medium containing 1.0 mg/l 2iP when cultured on MS medium supplemented with 1.0 3.0 5.0 and 7.0 mg/l BA (from left to right) for 90 days.

สรุปผลจากการทดลองชักนำยอดรวมทั้งหมดในอาหารสูตร MS ที่มี BA ระดับความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกแคลลัสที่มาจากลำต้น ข้อ และใบในอาหารสูตรที่มี 2, 4-D 2iP และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่เหมาะสมจากตอนที่ 1.1 สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ โดยที่ระดับความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำยอดรวมมากที่สุดและแคลลัสที่มาจากข้อที่เลี้ยงในอาหารที่มี Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้มากที่สุด คือ 12.10 ยอดต่อแคลลัส

1.3 การชักนำราก

หลังจากนำยอดโป๊ยเซียนมาชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มี IAA IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าในอาหารสูตรที่เติม IAA IBA และ NAA ยอดจะเกิดรากมากกว่า และแข็งแรงกว่าอาหารที่ไม่มีออกซิน โดยอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากได้สูงสุด คือ 15.80 รากต่อยอด (ภาพที่ 19 และ ตารางที่ 10)

ในอาหารที่มี IAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากได้สูงสุด คือ 10.10 รากต่อยอด ลักษณะของรากมีสีน้ำตาล มีขนาดยาว แตกแขนง และแข็งแรง (ภาพที่ 20 และ ตารางที่ 11)

ในอาหารที่มี IBA รากที่ได้มีสีน้ำตาล อวบใหญ่ มีขนาดยาว แตกแขนง และแข็งแรง โดยที่ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากได้สูงสุด คือ 7.93 รากต่อยอด (ภาพที่ 21 และ ตารางที่ 12)

ส่วนในอาหารที่ไม่เติม IAA IBA และ NAA รากที่ได้จะมีลักษณะสีน้ำตาล สั้น เปราะ และไม่แข็งแรง เกิดรากเฉลี่ย 2.66 -3.11 รากต่อยอด (ตารางที่ 10 11 และ 12)

ภาพที่ 19 การเกิดรากจากยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 3 0 วัน

Figure 19 Root induction from isolated shoot where cultured on MS medium supplemented with 0.0 1.0 3.0 and 5.0 mg/l NAA (from left to right) for 30 days.

ตารางที่ 10 การเจริญของราก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำรากสูตร MS ที่เติม NAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

Table 10 Root growth where cultured on MS root induction medium containing NAA at various levels for 30 days.

NAA concentrations (mg/l)	Number of roots/shoot	Root characteristics
0.0	2.66 ± 0.47d	brown short fragile
1.0	8.10 ± 0.99b	brown long branch healthy
3.0	15.80 ± 0.83a	brown long branch healthy
5.0	3.83 ± 0.68c	brown long healthy
F-test	**	
C.V. (%)	9.8	

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note **Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

ภาพที่ 20 การเกิดรากจากยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IAA ความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 3 0 วัน

Figure 20 Root induction from isolated shoot where cultured on MS medium supplemented with 0.0 1.0 3.0 and 5.0 mg/l IAA (from left to right) for 30 days.

ตารางที่ 11 การเจริญของราก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดรากสูตร MS ที่เติม IAAในระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

Table 11 Root growth where cultured on MS root induction medium containing IAA at various levels for 30 days.

IAA concentrations (mg/l)	Number of roots/shoot	Root characteristics
0.0	3.11 ± 0.40c	brown short fragile
1.0	3.66 ± 0.70c	brown long branch healthy
3.0	10.10 ± 0.44a	brown long branch healthy
5.0	5.20 ± 0.67b	brown long branch healthy
F-test	**	
C.V. (%)	13.4	

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note **Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

ภาพที่ 21 การเกิดรากจากยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียงจากซ้ายไปขวา ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วัน

Figure 21 Root induction from isolated shoot where cultured on MS medium supplemented with 0.0 1.0 3.0 and 5.0 mg/l IBA (from left to right) for 30 days.

ตารางที่ 12 การเจริญของราก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดรากสูตร MS ที่เติม IBA ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

Table 12 Root growth where cultured on MS root induction medium containing IBA at various levels for 30 days.

IBA concentrations (mg/l)	Number of roots/shoot	Root characteristics
0.0	3.10 ± 0.40c	brown short fragile
1.0	7.93 ± 0.45a	brown long healthy
3.0	5.20 ± 0.45b	brown long branch healthy
5.0	5.25 ± 0.48b	brown long branch healthy
F-test	**	
C.V. (%)	5.2	

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note **Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

1.4 การอนุบาลต้นโป๊ยเซียนหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยง

หลังจากนำต้นโป๊ยเซียนที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงมาล้างวุ้นออกให้หมดด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้น แช่รากไว้ในน้ำนาน 10 นาที แล้วนำต้นที่ได้ไปอนุบาลในเวอร์มิคูไลต์เป็นเวลา 30 วัน โดยรดน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง (ภาพที่ 22) หลังจากนั้นนำต้นโป๊ยเซียนออกจากเวอร์มิคูไลต์ไปปลูกในดินที่เตรียมไว้แล้วในกระถาง หลังจากปลูกแล้วนำไปพักไว้ในที่ร่ม เพื่อให้ต้นโป๊ยเซียนปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอก รดน้ำวันเว้นวันหลังจากนั้นประมาณ 30 วัน ต้นโป๊ยเซียนเริ่มแตกกิ่งก้านสาขา ยอดอ่อนและใบอ่อนขึ้นมา ในระยะนี้ต้องเริ่มให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 โดยนำมาโรยรอบๆโคนต้น จะทำให้ใบมีขนาดใหญ่และต้นเจริญดี เมื่ออนุบาลจนครบ 60 วัน พบว่าต้นโป๊ยเซียนมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะลำต้นที่ได้สมบูรณ์แข็งแรงและมีดอกเกิดขึ้น (ภาพที่ 23 และ ตารางที่ 13)

ภาพที่ 22 การอนุบาลต้นโป๊ยเซียนในเวอร์มิคูไลต์ เป็นเวลา 30 วัน

Figure 22 Acclimatization of *Euphorbia* in vermiculite for 30 days.

ภาพที่ 23 ลักษณะต้นโป๊ยเซียนที่มีลำต้นสมบูรณ์ แข็งแรง และมีดอกเกิดขึ้น เมื่อย้ายลงดิน 60 วัน

Figure 23 Complete and healthy plantlets of *Euphorbia* with flowers in potted soil for 60 days.

ตารางที่ 13 การอนุบาลต้นโป๊ยเซียนหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Table 13 Acclimatization of *Euphorbia* plantlet after transfer from vermiculite for 30 days

Days	Number of plant	Survival (%)	Plant characteristics
10	22	100	Normal , healthy
20	22	100	Normal , healthy
30	22	100	Healthy , branching leaves and shoot tips
40	22	100	Healthy , branching leaves and shoot tips
50	22	100	Tall stem with young flowers
60	22	100	Healthy plant with flowers

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.1.1 ระดับออสโมลาริตี้

เมื่อนำใบโป๊ยเซียนพันธุ์สร้อยรัชนีที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อน้ำหนัก 1 กรัม มาแยกโพรโทพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยมาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีแมนนิทอลเป็นออสโมติคัม โดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 โมลาร์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง เริ่มมีโพรโทพลาสต์หลุดออกมาตรงบริเวณรอยตัดของใบโป๊ยเซียน แต่โพรโทพลาสต์ที่ได้ส่วนมากผนังเซลล์ยังถูกย่อยไม่สมบูรณ์เพราะมีโพรโทพลาสต์ที่ไม่กลมอยู่ด้วย และมีจำนวนน้อยมากจนนับไม่ได้ แต่จะเริ่มพบเห็นโพรโทพลาสต์กลมเมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 2 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไปครบ 4 ชั่วโมง พบว่า ที่ระดับออสโมลาริตี้ต่างกันให้ผลการแยกโพรโทพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยสังเกตลักษณะและนับจำนวนโพรโท-พลาสต์ (ตารางที่ 14) ซึ่งปรากฏว่าที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.7 โมลาร์ ได้โพรโทพลาสต์จำนวนน้อยที่สุดคือ 3.82×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด โพรโทพลาสต์ที่ได้มีลักษณะ หด ไม่กลม เนื่องจาก

ตารางที่ 14 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบโป๊ยเซียน โดยใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัมที่ระดับออสโมลาริตี้ต่างๆเมื่อวางบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 ชั่วโมง[1]

Table 14 Yield of protoplasts when isolated from leavesand influence various concentration of mannitol for osmotic pressure was incubate at $30 \pm 1\ ^{0}C$ under dark condition for 4 hours on a gyratory shaker with an agitation speed of 50 rpm[1].

Mannitol concentrations	Protoplast yield ($x10^5$ per g.f.wt) / Time (h)		
(Molar)	2	3	4
0.4	3.11 ± 2.91a	4.71 ± 1.57a	6.72 ± 1.66a
0.5	2.64 ± 1.32b	4.32 ± 1.84b	5.43 ± 2.52b
0.6	2.27 ± 2.18c	3.70 ± 1.85c	4.45 ± 1.35c
0.7	1.73 ± 1.06d	2.47 ± 1.42d	3.82 ± 1.60d
F-test		**	
C.V. (%)		6.4	

หมายเหตุ [1] สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT.

Note [1] 1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 ,0.5 % (w/v) Driselase and 0.5 % (w/v) Macerozyme R-10

** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

ความเข้มข้นของสารปรับระดับออสโมลาริตี้สูงเกินไปทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ สังเกตได้จากโพรโทพลาสต์มีรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่กลม ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ ได้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด คือ 6.72×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด โพรโทพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง และมีจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แตกน้อย ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.5 โมลาร์ โพรโทพลาสต์ส่วนใหญ่ยังมีลักษณะกลม เต่ง แต่เริ่มมีการหดตัวของโพรโทพลาสต์ สังเกตได้จากบางโพรโทพลาสต์มีรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่กลม ส่วนที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.6 โมลาร์ โพรโทพลาสต์มีการหดตัวเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ในสารละลาย ออสโมติคัม 0.7 โมลาร์ จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโทพลาสต์จากใบ

โป๊ยเซียนพันธุ์สร้อยรัชนี คือ 0.4 โมลาร์ ดังนั้นในการศึกษาสภาวะอื่นๆที่เหมะสมสำหรับการแยกโพรโทพลาสต์ จึงเลือกใช้แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม

โพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบโป๊ยเซียนนั้นมีขนาดแตกต่างกัน ลักษณะกลม เต่งส่วนใหญ่มีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวอยู่ภายใน มีการกระจายของเม็ดคลอโรพลาสต์หลายแบบ เช่น คลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วเซลล์หรือรวมตัวเป็นกลุ่มอยู่กลางเซลล์ (ภาพที่ 24 A B C และ D) คลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ บางโพรโทพลาสต์กลมใสไม่มีคลอโรพลาสต์ นอกจากนี้ภายในโพรโทพลาสต์บางอันจะเห็นเป็นสีชมพู ซึ่งเป็นผลมาจากการที่มีรงควัตถุอยู่นั่นเอง

ภาพที่ 24 โพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบโป๊ยเซียน (A)โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่กลางเซลล์ (B)โพรโทพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (C)โพรโทพลาสต์ที่มีลักษณะกลม ใส ไม่มีคลอโรพลาสต์ (D)โพรโทพลาสต์ที่มีรงควัตถุอยู่ภายใน

Figure 24 Protoplasts isolated from old leaves of *E. milii* Desmoulin. Protoplast aggregated chloroplasts at the center (A). Protoplast aggregated chloroplasts at one side (B).Translucent protoplast without chloroplasts (C). Protoplast with pink pigment (D).

2.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

เมื่อนำใบโป๊ยเซียนมาทำการแยกโพรโทพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ 4 ชนิด คือ

E1= เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์

E2= เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ + มาเซอโรไซม์อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์

E3= เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ + ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์

E4= เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ + มาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ + ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์

สารละลายเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมีน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัมวางบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เมื่อทำการบ่มครบ 4 ชั่วโมง (ตารางที่ 15) ซึ่งปรากฏว่าแยกโพรโทพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ E4 ได้โพรโทพลาสต์จำนวนมากกว่าสารละลายเอนไซม์ E1 E2 และ E3 โดยสารละลายเอนไซม์ E4 แยกโพรโทพลาสต์ได้ 6.58×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ที่เวลา 4 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์ E1 ให้จำนวนโพรโทพลาสต์น้อยที่สุด คือ 2.71×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือสารละลายเอนไซม์ E2 และ E3 ซึ่งให้จำนวนโพรโทพลาสต์ 2.75×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 4.19×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และจากผลการทดลองยังพบว่าสารละลายเอนไซม์ E3 ทำงานได้ดีกว่าสารละลายเอนไซม์ E2 แสดงว่าไดรซีเลสทำงานดีกว่ามาเซอโรไซม์ ทำให้ผลรวมของทั้งไดรซีเลส และมาเซอโรไซม์ ส่งผลในสารละลายเอนไซม์ E4 ด้วย เมื่อพิจารณาลักษณะของโพรโทพลาสต์ พบว่าโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากสารละลายเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันโดยโพรโทพลาสต์ที่แยกได้โดยสารละลายเอนไซม์ E4 มีขนาดใหญ่ มีคลอโรพลาสต์ และ ไซโทพลาสซึมหนาแน่นกว่าโพรโทพลาสต์ที่แยกได้โดยสารละลายเอนไซม์ E1 E2 และ E3 ซึ่งส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็ก มีคลอโรพลาสต์ และไซโทพลาสซึมไม่หนาแน่น จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าโดยสารละลายเอนไซม์ E4 เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบโป๊ยเซียนเพราะได้โพรโทพลาสต์จำนวนมาก และโพรโทพลาสต์มีลักษณะดี

ตารางที่ 15 จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้เมื่อใช้เอนไซม์และความเข้มข้นชนิดต่างๆ โดยวางบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Table 15 Yield of protoplasts from various concentration of enzyme solution was incubate at 30 ±1 ^{0}C under dark condition for 4 hours on a gyratory shaker with an agitation speed of 50 rpm.

Type and enzyme concentration	Protoplast yield (x10^5 per g.f.wt.)/ Time (h)		
	2	3	4
E1	1.32 ± 0.41c	1.76 ± 0.56d	2.71 ± 0.46c
E2	1.42 ± 0.36c	1.93 ± 1.03c	2.75 ± 1.52c
E3	2.52 ± 1.18b	3.22 ± 1.12b	4.19 ± 1.89b
E4	3.31 ± 1.08a	4.84 ± 1.63a	6.58 ± 1.74a
F-test		**	
C.V. (%)		5.9	

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

*ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note **Highly significant different at the 99% confidence level.

* Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

2.1.3 การเก็บใบไว้ในที่มืดก่อนย่อย

เมื่อนำใบโป๊ยเซียนที่ผ่านการเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปทำการแยกโพรโทพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อยู่ในสารละลายแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าใบที่เก็บไว้ในที่มืดจะให้โพรโทพลาสต์จำนวนมากกว่าใบที่เก็บไว้ในที่สว่าง โดยใบที่เก็บในที่มืดให้จำนวนโพรโทพลาสต์สูงสุด คือ 6.69 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนใบที่เก็บไว้ในที่สว่าง ให้จำนวนโพรโทพลาสต์สูงสุด คือ 6.24 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ที่เวลา 4 ชั่วโมง (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบจำนวนโพรโทพลาสต์ที่ได้จากใบที่เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงกับใบที่เก็บไว้ในที่สว่าง[1]

Table 16 Effect of dark pretreatment of in vitro *Euphorbia* on yield of protoplasts from leaf tissue.

Incubation time	Protoplasts yield ($x10^5$ per g.f.wt.)		T-test	C.V.
(h)	Dark condition	Light condition		(%)
2	3.27 ± 1.82a	2.99 ± 0.80b	**	4.1
3	4.77 ± 1.79a	4.34 ± 2.32b	**	5.9
4	6.69 ± 2.02a	6.24 ± 2.25b	**	8.0

หมายเหตุ [1] สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note [1] Solution of enzyme was 1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 ,0.5 % (w/v) Driselase and 0.5 % (w/v) Macerozyme R-10.

** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in row are significantly different by DMRT.

2.1.4 ระยะเวลาการอินคิวเบทต่อความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยมาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ แยกโพรโทพลาสต์ของใบโป๊ยเซียน สังเกตที่เวลา 2 3 และ 4 ชั่วโมง โดยบันทึกจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ และตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์โดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต ถ้าเป็นโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงเป็นสีเขียวเหลือง (ภาพที่ 25) ส่วนโพรโทพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่เรืองแสง

จากการทดลองพบว่าช่วงเวลาต่างๆ ให้ผลการแยกโพรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 17) การใช้เวลา 4 ชั่วโมง ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากสุด คือ 6.51×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความมีชีวิต พบว่าการอินคิวเบทที่เวลาดังกล่าวให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุด คือ 71.73 เปอร์เซ็นต์

(A) (B)

ภาพที่ 25 โพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต (A) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (B) เมื่อย้อมด้วยสีฟลู-ออเรสซีนไดอะซีเตตแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงสีเขียวเหลือง

Figure 25 Viability of protoplasts (A) viewed with light microscope , (B) FDA staining as viewed by fluorescence optic.

ตารางที่ 17 ผลของระยะเวลาการอินคิวเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตโพรโทพลาสต์ [1]

Table 17 Effect of incubation time on yield of protoplasts and viability[1].

Incubation time (h)	Protoplast yield ($x10^5$ per g.f.wt.)	Viability (%)
2	3.11 ± 0.01b	75.09 ± 2.22b
3	4.62 ± 0.04b	84.14 ± 1.48a
4	6.51 ± 0.02a	71.73 ± 2.25c
F-test	**	**
C.V. (%)	0.30	2.80

หมายเหตุ [1] สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note [1] 1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 ,0.5 % (w/v) Driselase and 0.5 % (w/v) Macerozyme R-10.

** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

เวลาอินคิวเบท 3 ชั่วโมง จำนวนโพรโทพลาสต์มากรองลงมา คือ 4.62 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้ความมีชีวิตสูงสุด คือ 84.14 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอินคิวเบทใบโป๊ยเซียนร่วมกับสารละลายเอนไซม์ข้างต้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโทพลาสต์ต่ำสุด คือ 3.11 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดและความมีชีวิต 75.09 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบโป๊ยเซียนจึงเลือกใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโทพลาสต์ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เพราะที่เวลาดังกล่าวสามารถให้ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์สูงสุด

จากการศึกษาเรื่องสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบโป๊ยเซียนนั้นสรุปได้ว่า การเก็บใบไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการแยกจะให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากกว่าการเก็บใบในที่สว่าง และการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีแมนนิทอลที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม โดยวางบ่มในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดเพราะให้ความมีชีวิตสูงสุดคือ 84.14 เปอร์เซ็นต์ และให้โพรโทพลาสต์ที่มีลักษณะดี และมีจำนวนมากพอที่จะนำไปศึกษาในเรื่องการเพาะเลี้ยงต่อไป

2.2 การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

นำโพรโทพลาสต์จำนวนเริ่มต้น 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล 0.4 โมลาร์โดยวิธีต่างๆวางเลี้ยงในที่มืดให้ผลดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารเหลว หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โพรโทพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงหรือลอยเดี่ยวในอาหาร เม็ดคลอโรพลาสต์มีสีเขียว ไซโทพลาสซึมเข้มข้น เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 5 วัน โพรโทพลาสต์แตก เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงในปริมาณมาก โพรโทพลาสต์ไม่มีการแบ่งเซลล์ ความมีชีวิต ลดลงและตายหมดในที่สุดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์บนอาหารแข็ง พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โพรโทพลาสต์มีลักษณะเหมือนวิธีที่ 1 เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โพรโทพลาสต์ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์เหลืออยู่เลย เป็นโพรโทพลาสต์ที่แตกทั้งหมด เห็นเม็ดคลอโรพลาสต์กระจายเต็มอาหารวุ้นและไม่พบการแบ่งเซลล์ใดๆ

3. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โดยวิธี Nurse culture หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1วัน โพรโทพลาสต์ยังคงมีลักษณะกลม เต่ง เหมือนการเพาะเลี้ยงในวิธีที่ 1 แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โพรโทพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่เช่นกัน

4. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยใช้วุ้นอะกาโรสเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ โพรโทพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง ไซโทพลาสซึมเข้มข้น เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวเต็มเซลล์ โดยบางเซลล์เริ่มมีลักษณะรี เมื่อนำไปตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์พบว่าจะมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ขึ้นมา

จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเป็นวิธีที่ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาเรื่องความหนาแน่นในการเลี้ยงและชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสมจึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

2.2.2 ความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง

เมื่อนำโพรโทพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่มีอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว 2 มิลลิลิตร โดยใช้จำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ 5×10^4 1×10^5 และ 5×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 1 วัน นำมาสังเกตลักษณะของโพรโทพลาสต์ทั้ง 3 ความหนาแน่น ซึ่งก็พบว่า โพรโทพลาสต์ยังมีชีวิตและยังมีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ โพรโทพลาสต์ที่มีจำนวนเริ่มต้น 5×10^4 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เริ่มแตก ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ เม็ดคลอโรพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจสอบความมีชีวิตปรากฏว่ามีโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต 68.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 18)

การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่ใช้จำนวนเริ่มต้น 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น พบว่า 7 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงลักษณะที่สังเกตเห็นคือ โพรโทพลาสต์ยังคงกลม มี

ตารางที่ 18 ผลของจำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 7 วัน

Table 18 Effect of cell density on protoplast culture in semisolid MS medium with 1.0 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA after culture for 7 days.

Density (protoplast/ml)	Viability (%)
5 x 10^4	68.50 ± 1.62c
1 x 10^5	87.42 ± 1.04a
5 x 10^5	76.64 ± 1.38b
F-test	**
C.V. (%)	3.4

หมายเหตุ **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบโดย DMRT

Note ** Highly significant different at the 99% confidence level.

Means followed by different letters in column are significantly different by DMRT.

เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวและมีชีวิต เพราะเมื่อนำไปตรวจสอบความมีชีวิตปรากฏว่ามีโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต 87.42 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าบางโพรโทพลาสต์เริ่มมีลักษณะรี เมื่อนำไปตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ขึ้นมา

ส่วนการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่ใช้จำนวนเริ่มต้น 5 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นมากเกาะติดกันเป็นกลุ่มใหญ่ๆ เห็นเป็นแถบสีเขียว 1 สัปดาห์ต่อมาพบว่าโพรโทพลาสต์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มเห็นเป็นแถบสีเขียวนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำมาตรวจสอบความมีชีวิตพบว่ามี โพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต 76.64 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการศึกษาสภาวะต่างๆในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์เรื่องต่อๆไปจึงได้เลือกจำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

2.2.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

จากการนำโพรโทพลาสต์จำนวน 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ (ตารางที่ 19) พบว่าโพรโทพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ภายใน 5-6 วัน เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ จะเห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 26 A B) โพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร ที่ 6 (MS เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์) สามารถสร้างผนังเซลล์ได้สูงสุดคือ 58.30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตรที่ 1 (MS เติม 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและแมนนิทอล 0.4 โมลาร์) สร้างผนังเซลล์ได้น้อยที่สุด คือ 1.30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารสูตรที่ 4 (MS เติม 2, 4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและแมนนิทอล 0.4 โมลาร์) โพรโทพลาสต์ไม่มีการสร้างผนังเซลล์เลย

โพรโทพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน โดยจะสังเกตเห็นรอยคอดเว้าคล้ายเลขแปด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (ภาพที่ 27 A) แต่เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์จะสังเกตเห็นการเรืองแสงของเซลล์เพลท (cell plate) ที่กั้นระหว่างเซลล์ 2 เซลล์อย่างชัดเจน (ภาพที่ 27 B) ซึ่งโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 6 สามารถเจริญแบ่งเซลล์ได้สูงสุดคือ 42.85 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารสูตรที่ 7 9 10 และ 8 สามารถแบ่งเซลล์ได้คือ 28.64 12.50 9.09 และ 8.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรอื่นๆ พบว่าไม่มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นเลยเพราะหลังจากที่โพรโทพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่แล้ว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 7 วัน โพรโทพลาสต์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตกตะกอนอยู่ที่ก้นจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เมื่อตรวจสอบความมีชีวิต โดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต ไม่พบการเรืองแสงแสดงว่าเป็นโพรโทพลาสต์ที่ไม่มีชีวิต ส่วนโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 6 – 10 สามารถเจริญแบ่งเซลล์ได้เป็น 2 เซลล์เท่านั้น ไม่พบการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นแต่โพรโทพลาสต์สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 15 วัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปโพรโทพลาสต์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเซลล์เมมเบรนเกิดการขยายตัวจนแตกทำให้แทงออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งสังเกตได้จากโพร-โทพลาสต์จะมีเส้นสายรอบๆเซลล์ นอกจากนี้พบว่าโพรโทพลาสต์จะตายหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 20 วัน

ตารางที่ 19 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาของโพรโทพลาสต์หลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS เป็นระยะเวลา 7 วัน

Table 19 Effect of some growth regulators on the development of protoplasts in semisolid MS medium for 7 days.

Growth regulators	Development of protoplasts (%)	
	Cell wall formation	Cell division
1. 0.5D[1]+0.5B[2]	1.30	-
2. 1.0D+1.0B	17.30	-
3. 1.5D+1.5B	11.60	-
4. 2.0D+2.0B	-	-
5. 0.5N[3]+0.5B	33.00	-
6. 1.0N+1.0B	58.30	42.58
7. 1.5N+1.5B	33.30	28.64
8. 2.0N+2.0B	12.50	8.37
9. 1.0N+2.0B	25.00	12.50
10. 1.0N+3.0B	25.00	9.09
11. 1.0N+4.0B	11.11	-
12. 1.0N+5.0B	2.40	-
13. 1.0N+1.0B+0.5D	7.10	-
14. 1.0N+1.0B+1.0D	13.50	-
15. 1.0N+1.0B+1.5D	5.30	-
16. 1.0N+1.0B+2.0D	2.90	-

หมายเหตุ [1]D = 2, 4-D หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร

[2]B = BA หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร

[3]N = NAA หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร

Note [1]D = NAA (mg/l)

[2]B = BA (mg/l)

[3]N = NAA (mg/l)

(A) (B)

ภาพที่ 26 โพรโทพลาสต์โป๊ยเซียนที่สร้างผนังเซลล์ (A) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (B) เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบเยื่อหุ้มเซลล์

Figure 26 Cell wall formation (A) viewed with light microscope , (B) CFW staining as viewed by fluorescence optic.

(A) (B)

ภาพที่ 27 โพรโทพลาสต์โป๊ยเซียนที่แบ่งเซลล์ จาก 1 เป็น 2 เซลล์ (A) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (B) เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์จะสังเกตเห็นการเรืองแสงของเซลล์แบ่งเป็น 2 เซลล์

Figure 27 First cell division of cultured protoplasts (A) viewed with light microscope , (B) CFW staining as viewed by fluorescence optic.