การขยายพันธุ์นมตำเลีย (*Hoya* spp.) และการปรับปรุงพันธุ์โดยการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium tumefaciens*

Clonal Propagation of Waxplant (*Hoya* spp.) and Its Improvement by Gene Transformation through *Agrobacterium tumefaciens*

สมัชชา นาคสมบัติ

Samatchar Naksombut

ก
เลขหมู่ QH442.2 ส62 2543 ว.2
Bib Key 204764
1 3 ธ.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์นมตำเลีย (*Hoya* spp.) และการปรับปรุงพันธุ์โดยการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium tumefaciens*

ผู้เขียน นายสมัชชา นาคสมบัติ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

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

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

คณะกรรมการสอบ

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

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

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

ขอมอบคุณหนังสือ ธรรมกระวีสุนทร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับมอบ
บัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 3 ธ.ค. 2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์นมตำเลีย (*Hoya* spp.) และการปรับปรุงพันธุ์โดยการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium tumefaciens*

ผู้เขียน นายสมัชชา นาคสมบัติ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

ศึกษาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของนมตำเลีย (*Hoya* spp.) บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog medium) เติม BA (6-benzyladenine) ร่วมกับ NAA (α-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำยอด แคลลัส และนำแคลลัสมาชักนำเซลล์ซัสเพนชัน จากนั้นนำใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อ อายุ 40-50 วัน ใบจากการเพาะเลี้ยงต้นนมตำเลียนอกหลอดทดลอง และเซลล์ซัสเพนชัน อายุหลังย้ายเลี้ยง 7 วัน มาแยกโปรโตพลาสต์โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาในการอินคิวเบท การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการและความหนาแน่นต่างๆ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ศึกษาผลของคานามัยซินและไบอะลาฟอสที่ยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์ และศึกษาการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายเชื้อต่างๆ ตรวจผลการปลูกถ่ายยีนจากกิจกรรมของ GUS (β-glucuronidase) และการต้านทานต่อสารดังกล่าว

จากการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน การย้ายเลี้ยงยอดบนไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรืออาหารสูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เกิดรากและยอดมีความแข็งแรงใกล้เคียงกัน การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น ก้านใบ และใบพบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยชิ้นส่วนลำต้นให้น้ำหนักแคลลัสสูงสุด 0.34 กรัมต่อชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการชักนำเซลล์ซัสเพนชัน พบว่าการย้ายเลี้ยงแคลลัสที่พัฒนาจากใบในอาหารเหลวเติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเจริญของเซลล์สูงสุดหลังย้ายเลี้ยง 14 วัน และเซลล์มีลักษณะจับตัวเป็นกลุ่มหลวมๆ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ส่งเสริมให้เกิดยอด 56.3 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.8 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ชิ้นส่วนแคลลัสที่พัฒนาจากใบไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์

จากแหล่งต่างๆ พบว่า ใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 2.22×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 93.72 เปอร์เซ็นต์ การอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 1.64×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 91.91 เปอร์เซ็นต์ การฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความหนาแน่น 1×10^{5} โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 10.34 เปอร์เซ็นต์ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยง 3-5 วัน แล้วเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (4-10 เซลล์) หลังการเพาะเลี้ยง 10-14 วัน และพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าหลังการเพาะเลี้ยง 60 วัน สำหรับการศึกษาเบื้องต้นถึงการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคานามัยซินและสารไบอะลาฟอสนั้นพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์ คือ 90 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเลี้ยงชิ้นส่วนใบร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ แล้วตรวจสอบกิจกรรมของ GUS พบว่า อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด 94.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สายเชื้อ EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pIG121 และสายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน 77.8 และ 9.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมาคัดเลือกในอาหารเติมสารข้างต้นไม่พบชิ้นส่วนที่ต้านทานต่อสารดังกล่าว

Thesis Title	Clonal propagation of waxplant (*Hoya* spp.) and its improvement by gene transformation through *Agrobacterium tumefaciens*
Author	Mr. Samatchar Naksombut
Major Program	Plant Science
Academic Year	2000

Abstract

Various explants of waxplant (*Hoya* spp.) were cultured on MS (Murashige and Skoog medium) supplemented with various concentration of BA (6-benzyladenine) and NAA (α-naphthaleneacetic acid) in order to induce shoot, callus and cell suspension cultures. Leaves derived from nodal culture *in vitro* at 40-50 days, *ex vitro* plants and suspension cells at 7 days of culture were subjected to various kinds and concentrations of enzymes for isolation of protoplasts. Incubation time was varied. Isolated protoplasts were cultured at various densities in MS supplemented with BA and NAA at various concentrations. In order to study gene transformation, the effect of kanamycin and bialaphos on inhibition of callus growth was determined. Gene transformation by various strains of *Agrobacterium tumefaciens* was conducted and transformed tissues were examined by GUS (β-glucuronidase) activity and resistance to kanamycin and bialaphos.

From the above studies it was found that nodal culture on MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA provided an average of 2.2 shoots/explant. Transfer of shoots to culture on 1% Hyponex or MS-free medium or MS medium with 1% Hyponex promoted healthy growth of shoots and roots. Callus formation could be induced 100% from stem, petiole and leaf explants. Among those explants, the stem-derived callus had the highest fresh weight of 0.34 g/explant in MS medium containing 7 mg/l BA and 4 mg/l NAA. For cell suspension induction, callus derived from leaves gave the highest growth rate in liquid medium supplemented with 2.5 mg/l BA and 3 mg/l NAA after culture for 14 days. Cells in the suspension were friable. A 56.3% success rate of shoot regeneration was obtained from leaves on the medium supplemented with 4 mg/l BA with average number of 0.8 shoot/explant. However, callus derived from leaves could not be regenerated. In the case of protoplasts isolation, optimal cell wall

digestion was achieved with a combination of 2% cellulase Onozuka R-10 and 1% macerozyme R-10. These enzymes gave the highest yield (2.22×10^6 protoplasts/g fresh weight) and viability (93.72%) from *in vitro* leaves. Incubating the leaf tissues with the above enzyme solution for 3 hours gave the highest yield and viability of protoplasts at 1.64×10^6 protoplasts/g fresh weight and 91.91%, respectively. Culturing of the protoplasts by embedding in MS medium supplemented with 1 mg/l BA, 5 mg/l NAA and 0.2% phytagel at density of 1×10^5 protoplasts/ml gave the best result in division of protoplasts (10.34%). Cell division was first observed within 3-5 days after culture, then developed to microcolonies within 10-14 days and microcallus which could be seen within 60 days after culture. Preliminary study of kanamycin and bialaphos on inhibition of callus, kanamycin at a concentration of 90 mg/l and bialaphos at 6 mg/l could inhibit growth of callus completely. Co-culture of leaf segments with various strains of *A. tumefaciens*, LBA4404, containing pTok233 gave the best transformation efficiency (94.4%) followed by EHA101 (containing pIG121) and LBA4404 (containing pBI121). However the callus could not survive on medium supplement with kanamycin or bialaphos.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากคณาจารย์หลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำคำปรึกษาตลอดการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี กรรมการที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี และรองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะและตรวจทานแก้ไข ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสายัณ และนางน้อย นาคสมบัติ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การอุปการะทุนในการศึกษามาโดยตลอด

ข้าพเจ้าขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และการนำเสนอผลงานวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ ที่ถ่ายทอดความรู้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอบคุณ คุณศศิธร บัวเกตุ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

สมัชชา นาคสมบัติ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	25
2. วิธีการวิจัย	26
วัสดุอุปกรณ์	26
วิธีการ	28
3. ผล	37
4. วิจารณ์	65
5. สรุป	78
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก	89
ประวัติผู้เขียน	91

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์	34
2	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของนมตำเลียบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 40 วัน	37
3	การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และลำต้น บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน	41
4	การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS เติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน	44
5	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลีย และพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	47
6	ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลีย และพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	48
7	ผลของแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อจำนวน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์นมตำเลียหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	53
8	ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลียหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	54
9	ผลของความหนาแน่นต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลียหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	55
10	ผลของสารปฏิชีวนะคานามันซินความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของแคลลัสนมตำเลีย	62
11	ผลของสารไบอะลาฟอสความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของแคลลัสนมตำเลีย	63

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะดอกและฝักของนมตำเลีย	27
2	ลักษณะของยอดนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ หลังเพาะเลี้ยง 40 วัน	39
3	อัตราการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันของนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	42
4	การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของนมตำเลีย	45
5	โปรโตพลาสต์จากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อของนมตำเลีย โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	49
6	ผลของระยะเวลาการอินคิวเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของนมตำเลีย	50
7	โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแหล่งชิ้นส่วนต่างๆ ของนมตำเลีย ที่แยกด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ และอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง	52
8	ผลของ BA และ NAA ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 14 วัน	57
9	การแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	58
10	การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	59

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	โคโลนีขนาดเล็กที่พัฒนาจากโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในอาหารในอาหาร กึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน	60
12	แคลลัสขนาดเล็กที่พัฒนาจากโปรโตพลาสต์นมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน	61
13	การตรวจสอบเนื้อเยื่อเคมีจากกิจกรรมของ GUS (blue spot) ของชิ้นส่วนใบที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนและด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ	64

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2i-P	=	isopentenyl adenine
BA	=	6-benzyladenine
CaMV35S	=	cauliflower mosaic virus 35S promotor
CRD	=	completely randomized range test
DMRT	=	Duncan's multiple range test
GUS	=	β-glucuronidase
hpt	=	hygromycin phosphotransferase
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	3-indolebutyric acid
KN	=	kinetin
LB	=	Lauria broth
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
*npt*II	=	neomycin phosphotransferase II
T-DNA	=	transferred DNA
TDZ	=	thidiazuron
X-Gluc	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid
YEB	=	yeast extract broth
ZEA	=	zeatin

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

นมตำเลีย (*Hoya* spp.) เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศไทย และเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่กำลังได้รับความนิยม เนื่องจากดอกสวยงาม มีกลิ่นหอม และสีสันที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ใบมีสีเขียวหรือด่างขาวสวยงาม สามารถปลูกเป็นไม้ประดับในอาคารได้เป็นอย่างดี นมตำเลียเป็นไม้เถาเลื้อยที่ชอบร่มเงา เช่น บริเวณโคนต้นไม้ใหญ่ ปัจจุบันในประเทศไทยพบนมตำเลียมีจำนวนลดลง เพราะมีการตัดไม้ทำลายพืชอาศัย และมีการนำนมตำเลียออกจากป่าเพื่อนำมาทำเป็นไม้ดอกไม้ประดับกันมาก ดังนั้นหากไม่มีการปลูกทดแทนหรือการอนุรักษ์พันธุ์อาจทำให้นมตำเลียพื้นเมืองสูญพันธุ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการขยายพันธุ์ การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม การผลิตพืชสายพันธุ์แท้ การคัดเลือกสายพันธุ์ การศึกษาทางชีวเคมี การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) การผลิตพืชปลอดไวรัส และการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช (อารีย์ วรัญญวัฒก์, 2541) เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์และการพัฒนาของพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์เป็นเทคนิคที่สำคัญในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ เช่น การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เพื่อสร้างพืชลูกผสม พบว่าการรวมโปรโตพลาสต์ประสบความสำเร็จในหลายพืช เช่น มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* กับ *L. peruvianum* หรือ *L. chilense*) (Chen and Adachi, 1998) ข้าว (*Oryza sativa* L.) กับข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) (Kisaka *et al.*, 1998) มะเขือเทศสายพันธุ์ป่า (*Lycopersicon pennellii*) กับมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Sherraf *et al.*, 1994) การปลูกถ่ายยีนโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม การปลูกถ่ายยีนโดยการใช้กระแสไฟฟ้าหรือการใช้สารเคมี เช่น ข้าวบาร์เลย์ (Zhang *et al.*, 1995) ถั่ว pea (*Pisum sativum* L.) (Nicolaisen and Poulsen, 1993) ข้าว (Datta *et al.*, 1992) และมันฝรั่ง (Feher *et al.*, 1991) เป็นต้น การปลูกถ่ายยีนเป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน ยีนที่สำคัญและได้รับความสนใจในการปลูกถ่าย เช่น ยีนต้านทานหรือทนทานต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เช่น ปลูกถ่ายยีนเพื่อให้ข้าวต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชบาสต้า (Datta *et al.*, 1992) และยีนต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชเป็นต้น

ปัจจุบันพบว่า การศึกษาด้านเทคโนโลยีชีวภาพของนมตำเลียยังมีไม่มาก ในประเทศไทยยังไม่ปรากฏรายงานที่ทำการศึกษามาก่อน ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้น

ส่วนข้อ การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ การชักนำเซลล์ซัสเพนชัน การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ การปลูกถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมให้กับชิ้นส่วนใบ และการชักนำพืชต้นใหม่ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปใช้ในการขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และเก็บเชื้อพันธุ์เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในอนาคต

ตรวจเอกสาร

นมตำเลีย มีชื่อสามัญว่า waxplant เป็นพืชอวบน้ำ (succulent plant) อยู่ในตระกูล Asclepiadaceae มีโครโมโซม 2n = 2x = 22 และพบว่า ใน *Hoya carnosa* var. variegata มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด (tetraploid: 2n = 4x = 44) (Nakamura, 1991) นมตำเลียมีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศจีนตอนใต้ และมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย ลำต้นเป็นเถาเลื้อย มีน้ำยางสีขาวหรือใส ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้าม หลายรูปทรง เช่น กลม หัวใจ หรือรี แผ่นใบหนา อวบน้ำ มีทั้งใบสีเขียวและใบด่างขาวหรือขาวปนชมพู ดอกออกเป็นช่อแบบซี่ร่ม (umbel) ดอกบานเป็นรูปดาว กลางดอกมีส่วนที่คล้ายมงกุฎเป็นมันวาว 5 แฉก เส้นผ่าศูนย์กลางช่อดอกประมาณ 3-10 เซนติเมตร สีขาว เหลือง หรือชมพู หรือ สองสีในดอกเดียวกัน บางชนิดมีกลิ่นหอม มักออกดอกในฤดูร้อน ผลเป็นฝักยาว เมื่อแก่ผลแห้งแตกให้เมล็ดหลุดออกมา เมล็ดมีขนปกคลุม โดยทั่วไปขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและการปักชำ (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2543; อฤชร พงษ์ไสว, 2541; Crockett, 1978) พืชในสกุล *Hoya* เป็นพืชที่ให้น้ำยางที่ประกอบด้วยกรด cinnamic และกรด acetic เป็นส่วนใหญ่ และกรด phenylpropionic ปริมาณเล็กน้อย อย่างไรก็ตามชนิดของกรดมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น ใน *Hoya bella* มีกรด isovaleric เป็นส่วนใหญ่ (Warnaar, 1984) ในประเทศไทยมักพบขึ้นบริเวณป่าแทบทุกชนิด

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ ตาข้างและการชักนำราก

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและตาข้างในอาหารสังเคราะห์เป็นการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้พืชจำนวนมาก กระบวนการดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเพื่อการค้า เช่น กล้วยไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผล ยอดใหม่ที่เกิดโดยตรงจากข้อหรือตาข้างมีโอกาสกลายพันธุ์น้อยกว่าการชักนำผ่านแคลลัสหรือเซลล์ซัสเพนชัน การพัฒนาของยอดของพืชถูกชักนำจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ไซโตไคนิน เช่น BA (6-benzyladenine), KN (kinetin), TDZ (thidiazuron), ZEA (zeatin) และ 2i-P (isopentenyl adenine) หรืออาจใช้ร่วมกับออกซินในสัดส่วนที่เหมาะสม เช่น NAA (α-naphthaleneacetic acid), IAA (indole-3-acetic acid), IBA (3-indolebutyric acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ส่วนการชักนำรากขึ้นกับสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน พืชส่วนใหญ่มักพบว่าต้องการออกซินในรูป NAA หรือ IBA เข้มข้นในช่วง 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาจไม่จำเป็นในบางพืช พืชหลายๆ ชนิดต้องการอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่ำในการชักนำราก เช่น อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ลดความเข้มข้นลงเป็น ½ หรือ ¼ เท่า (Bhojwani and Razdan, 1983) หรือชักนำรากนอกหลอดทดลองก็ได้

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงนมตำเลียในสภาพปลอดเชื้อ แต่จากการทดลองของ Patnaik และ Debata (1996) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *Hemidesmus indicus* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกับนมตำเลีย บนอาหารสูตร MS เติม KN 1.15 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.054 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดรวมได้สูงสุด 8.2 ± 0.4 ยอดต่อชิ้นส่วน การชักนำรากในอาหารเติม KN 1.15 ไมโครโมลาร์ และ IBA 7.35 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดี หลังจากย้ายต้นกล้าที่สมบูรณ์ลงดินปลูกพบว่ามีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูง 70 เปอร์เซ็นต์ Mohamed และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของ *Stapelia semota* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกับนมตำเลียบนอาหารสูตร MS เติม BA 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.8 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำยอดรวมจากตาข้างได้ และจำนวนยอดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้น ในขณะที่ความยาวยอดมีแนวโน้มลดลง Benmoussa และคณะ (1996) ชักนำยอดรวมของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus densiflorus*) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS เติม BA สามารถส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดได้ดีกว่าการเติม KN และพบว่าการเติม BA ร่วมกับ pCPA (p-chloropheoxyacetic acid) ส่งเสริมการสร้างยอดได้เพิ่มขึ้น Sharma และ Chandel (1992) ศึกษาผลของกรดแอสคอบิคต่อการชักนำยอด *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกับนมตำเลีย โดยเพาะเลี้ยงตาข้างบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอบิค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเติมกรดแอสคอบิคมีผลชักนำการแตกหน่อจากตาข้างได้ 5.38 ยอดและมีจำนวนข้อต่อยอด 4.60 ข้อต่อยอด Al-Juboory และคณะ (1991) ชักนำยอดของไอวี่ (Algerian ivy, *Hedera canariensis* L.) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม BA 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 2.5 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมให้เกิดยอดจากตาข้างได้ หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงยอดในอาหารเติม TDZ 0.1 หรือ 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 40 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมให้ยอดเพิ่มจำนวนและสร้างรากด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การย้ายเลี้ยงลำต้นที่ตัดส่วนยอดออกบนอาหารเติม GA_3 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 20 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการแตกตาข้างได้ 3.7 ยอด ในขณะที่ต้นที่ไม่ตัดยอดไม่สามารถแตกตาข้างได้ หลังจากนั้นชักนำรากโดยย้ายเลี้ยงยอดในวัสดุปลูกที่ผสม พีท : เพอร์ไรท์ : ดิน อัตราส่วน 1:1:1 เป็นเวลา 3 เดือน Phillips และ Hubstenberger (1985) ชักนำยอดของพริก (*Capsicum* spp.) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (ปลายยอด และข้อของใบเลี้ยง) ส่งเสริมพืชต้นใหม่ได้มากกว่า 2-10 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ไม่มีเนื้อเยื่อเจริญ (ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยง) และพบว่ายอดสามารถพัฒนาได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับออกซินชนิด IAA หรือ IBA 0.05-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มการยืดยาวยอดพร้อมกับการชักนำรากโดยย้ายเลี้ยงในอาหารเติม IAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การชักนำแคลลัส เซลล์ซัสเพนชัน และการพัฒนาพืชต้นใหม่

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ของพืชที่แบ่งตัวและเพิ่มปริมาณโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์แวคคิวโอลสูง แคลลัสมี 2 แบบ คือ แคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น (compact callus) และแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (friable callus) โดยทั่วไปทุกชิ้นส่วนของพืชสามารถสร้างแคลลัสได้ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ยังอ่อน เช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ใบอ่อน ดอกอ่อน ยอด ใบเลี้ยงในเมล็ด ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดี เนื่องจากเซลล์อยู่ในระยะกำลังเจริญ และขึ้นกับอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน

เซลล์ซัสเพนชัน คือการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเดี่ยวๆ หรือกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลว เนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมแก่การนำมาเลี้ยงเป็นเซลล์ซัสเพนชันคือ แคลลัสชนิดที่เกาะตัวอย่างหลวมๆ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันจะต้องเลี้ยงในสภาพหมุนวน สภาพเขย่า หรือกวนเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และได้รับอาหารและอากาศอย่างเพียงพอ

การชักนำพืชต้นใหม่จากจุดกำเนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่จุดกำเนิดธรรมชาติ (ตายอดหรือตาข้าง) เช่นจากแคลลัส หรือจากใบ เรียกว่า adventitious shoot การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชอาจเกิดผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนนีซิส (organogenesis) หรือเอ็มบริโอเจนนีซิส (embryogenesis) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน การชักนำยอดจากแคลลัสสามารถกระทำได้โดยย้ายเลี้ยงอาหารที่มีอัตราส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงระหว่าง 10:1 หรือ 100:1 หรืออาจไม่จำเป็นต้องเติมออกซินเลยก็ได้ การชักนำยอดโดยทั่วไปมักใช้ไซโตไคนินเข้มข้น 0.5-30 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการใช้ในความเข้มข้นที่มากเกินไปอาจทำให้ยอดที่ผิดปกติได้ สำหรับออกซินที่ใช้ในการชักนำยอดได้แก่ NAA และ IBA ซึ่งจะใช้ความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในกรณีการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอพบว่า 2,4-D มีบทบาทมากที่สุด (อารีย์ วรัญญวัฒก์, 2541; Bhojwani and Razdan, 1983)

เชาวลิต บุญศรี (2542) ชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบกล็อกซิเนียบนอาหารสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลต์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสเกาะตัวอย่างหลวมๆ สีขาวอมเหลือง นอกจากนี้ยังพบว่าการชักนำยอดรวมจากการวางเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมสูงสุด 98 ยอดต่อใบ สมปอง เตชะโต (2530) เพาะเลี้ยงแคลลัสที่พัฒนาจากโปรโตพลาสต์ของถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7 ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.02-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ และเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหาร

สูตรเดิมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าโซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าขนาดเล็ก Rout และคณะ (1999) ชักนำแคลลัสและพัฒนาพืชต้นใหม่ของ *Plumbago zeylanica* โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและลำต้นบนอาหารสูตร MS พบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมแก่การชักนำแคลลัสคือ BA 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 11.42 ไมโครโมลาร์ การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสคือ BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 1.42 ไมโครโมลาร์ และพบว่าชิ้นส่วนใบส่งเสริมการสร้างแคลลัสและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ดีกว่าลำต้น Ignacimuthu และคณะ (1999) ชักนำพืชต้นใหม่ของ *Eryngium foetidum* โดยผ่านกระบวนการสร้างเอ็มบริโอ พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่โตเต็มที่ซึ่งเก็บจากแปลงปลูกในอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog) เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP (6-benzylaminopurine) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้ใน 3 สัปดาห์ แคลลัสเกาะตัวกันแน่นสีน้ำตาล เพิ่มปริมาณโดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นชักนำเอ็มบริโอโดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 (gibberellic acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อพัฒนาเป็นเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วชักนำรากและเร่งการยืดยาวของยอดโดยการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Saito และ Suzuki (1999) ชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของแอปเปิล *Malus* × *domestica* สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสดังกล่าวและจากแคลลัสที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของเอปเปิลสายพันธุ์ Fuji พบว่าสามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ 1) IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA (abscisic acid) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2) IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Hammatt และ Grant (1998) ชักนำยอดจากใบเชอรี่พื้นเมือง (*Prunus avium*) แบล็คเชอรี่ (*Prunus serotina*) และพันธุ์ลูกผสม (*Prunus avium* × *Prunus sargentii*) พบว่าการชักนำยอดในอาหารสูตร WPM (woody plant medium) เติม TDZ ส่งเสริมการเกิดยอดมากกว่าการเติม BA และพบว่าแบล็คเชอรี่ที่เลี้ยงในอาหารสูตร WPM ส่งเสริมการเกิดยอดดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Driver and Kuniyuki walnut medium รายงานการทดลองของ Kumar และคณะ (1998) พบว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของ *Albizia procera* บนอาหารสูตร MS เติม BA 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ ชักนำยอดได้สูงสุด การเติม 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่า ส่วนการเติม IBA หรือ IAA มีประสิทธิภาพด้อยกว่า NAA การเพาะเลี้ยงโดยใช้วุ้นไฟต้าเจลส่งเสริมการชักนำพืชต้นใหม่ดีกว่าวุ้น agar-agar และ

การเติมซิลเวอร์ไนเตรต 15 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการสร้างยอดแต่ลดการสร้างแคลลัส Shimizu และคณะ (1997) ชักนำแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชันของ *Iris germanica* 3 สายพันธุ์ พบว่าการเพาะเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ proline 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมเพื่อชักนำเซลล์ซัสเพนชัน พบว่าเซลล์ซัสเพนชันมีอัตราการเจริญคงที่ภายหลังการย้ายเลี้ยง 2-4 ครั้ง และเพิ่มจำนวน 2-3 เท่า ในเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งเติม GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอ ในขณะที่อาหารเติม KN 0-3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลลดการสร้างเอ็มบริโอ Robichon และคณะ (1997) ศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่ของ ivy leaved geranium (*Pelargonium peltatum*) จำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่าการเพาะเลี้ยงใบหรือก้านใบบนอาหารสูตร ½MS เติม TDZ 0.45, 2.3 และ 4.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้โดยตรง และยอดดังกล่าวมีตำแหน่งเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนนีซิส พบว่าสามารถชักนำได้เพียง 3 สายพันธุ์ โดยนำชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสซึ่งเติม NAA 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ ชักนำเอ็มบริโอโดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติม NAA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโอสร้างส่วนของใบเลี้ยง ยอดอ่อน และราก แล้วเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ Marcotrigiano และคณะ (1996) รายงานการชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงใบของ American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ Anderson เติม TDZ 10 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ การวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงให้ยอดแขนงมากกว่าการวางเลี้ยงในสภาพมืด และพบว่าชิ้นส่วนที่เหมาะสมคือใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ชักนำให้ยืดยาวของยอดโดยย้ายเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Benmoussa และคณะ (1996) ชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงปล้องของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus densiflorus*) บนอาหารสูตร MS พบว่าการเติม BA 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ pCPA 5.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการสร้างแคลลัสสูงสุด และเป็นแคลลัสที่เกาะตัวอย่างหลวมๆ ในขณะที่การเติม 2,4-D และ KN ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้น้อยกว่าและแคลลัสมีการเกาะตัวกันแน่น Hoshino และคณะ (1995) ชักนำ แคลลัสและเซลล์ซัสเพนชันของอัฟริกันไวโอเล็ต (*Saintpaulia ionantha* Wendl) โดยเลี้ยงใบบนอาหารสูตร B5 เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 2 กรัมต่อลิตร พบว่าได้แคลลัสที่เกาะตัวอย่างหลวมๆ หลังจากนั้นนำมาชักนำเซลล์ซัสเพนชันโดยย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที Zafar และคณะ (1995) ชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ ของ *Medicago*

littoralis พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสูตร B5 เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้แคลลัสมีอัตราการเจริญสูงสุด และสามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้จากแคลลัสที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบและลำต้นใต้ใบเลี้ยง เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม 2i-P 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.1 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BOA (1,2-benzisoxazole-3-acetic acid) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Arias-Castro และคณะ (1993) ชักนำแคลลัสจากรากชะเอม (*Glycyrrhiza glabra*) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร B5 เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงชักนำเซลล์ซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตรเดิม พบว่าเซลล์ซัสเพนชันที่เลี้ยงในสภาพมืดและที่มีแสงให้อัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า ใน 3-4 วัน และมีอัตราการเจริญสูงสุดภายหลังเพาะเลี้ยง 12-14 วัน Iapichino และคณะ (1992) ชักนำพืชต้นใหม่จากใบของ *Rhododendron* spp. จำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ที่สามารถพัฒนาพืชต้นใหม่ได้เมื่อเพาะบนอาหารสูตร Anderson เติม IBA 4.9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2i-P 73.8 ไมโครโมลาร์ และพืชต้นใหม่ดังกล่าวมีตำแหน่งเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของใบ Narasimhulu and Reddy (1983) ศึกษาการชักนำแคลลัสและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัส เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสที่พัฒนาจากชิ้นส่วนลำต้นใต้และเหนือใบเลี้ยง ใบ และใบเลี้ยงบนอาหารเติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเติมเฉพาะ KN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถชักนำยอดได้โดยตรงโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้และเหนือใบเลี้ยง และใบเลี้ยง บนอาหารเติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การแยกโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ คือ เซลล์พืชที่ปราศจากผนังเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการแยกส่วนของผนังเซลล์ออกไป โดยโปรโตพลาสต์จะยังมีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ห่อหุ้มส่วนต่างๆ ภายในเซลล์เอาไว้ การแยกโปรโตพลาสต์สามารถกระทำได้โดยวิธีกล (mechanical isolation) หรือ วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) ปัจจุบันนิยมแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ เนื่องจากสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้มากและมีคุณภาพสูง กระทำได้ง่าย โดยนำชิ้นส่วนพืชมาจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ เช่น เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส หรือเซลลูเลสจาก *Tricodema viridae* หรือเซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 ร่วมกับเพคโตไลเอส หรือมาเซอโรไซม์ ใน

อัตราความเข้มข้นที่เหมาะสม โปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากทุกส่วนของพืช เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบจริง ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร หรือเซลล์ซัสเพนชัน แต่ที่นิยมได้แก่ใบและเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ มีผนังเซลล์ที่ไม่หนาเกินไป ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้มากและมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง มีพัฒนาการภายหลังการเพาะเลี้ยง และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดี โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ได้เองภายใน 2-3 วัน เมื่อเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์เรียกว่า ไมโครโคโลนี แล้วเจริญจนมีขนาดใหญ่ขึ้นและพัฒนาเป็นแคลลัส และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539; ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536; อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541) การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในพืชแต่ละชนิดจะประสบผลสำเร็จมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญดังนี้

4.1 แหล่งของโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์แยกได้จากแหล่งต่างๆ กัน เช่น ใบ กลีบดอก ผล แคลลัส หรือรากของพืช โปรโตพลาสต์จากส่วนที่แตกต่างกัน มีการเจริญแตกต่างกัน โดยปกติแล้วโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อที่มีอายุมากหรือมีระยะการเจริญในขั้นสอง (secondary growth) มักให้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย เนื่องจากเซลล์มีผนังหนา มีสารจำพวกลิกนิน ซูเบอร์ลิน และคิวติน ซึ่งยากแก่การย่อยด้วยเอนไซม์ และเซลล์ส่วนใหญ่จะไม่มีชีวิตแล้ว หรือหากมีชีวิตก็มักไม่แบ่งเซลล์ต่อไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) ดังนั้นชิ้นส่วนที่เหมาะแก่การแยกโปรโตพลาสต์ ได้แก่ แผ่นใบ แคลลัส ใบเลี้ยง และเซลล์ซัสเพนชัน เป็นต้น มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล็อกซิเนียโดยใช้ใบที่มีขนาดความยาวกว่า 2.5 เซนติเมตร และใบที่มีขนาดสั้นกว่า 2.5 เซนติเมตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายซอร์บิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ อินคิวเบทนาน 5 ชั่วโมง พบว่าใบที่มีขนาดยาวกว่า 2.5 เซนติเมตร สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 3.2×10^5 ต่อกรัมน้ำหนักสด ในขณะใบที่สั้นกว่าสามารถแยกได้ 2.5×10^5 ต่อกรัมน้ำหนักสด Karim และ Adachi (1997) แยกโปรโตพลาสต์จากใบและเซลล์ซัสเพนชันของหอม (*Allium cepa*) ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.005 โมลาร์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง พบว่าแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันได้ $4\text{-}5\times10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ในขณะที่แยกจากใบได้เพียง 1×10^5 ต่อกรัมน้ำหนักสด Ai-Ping และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง ใบจริงที่เพาะเลี้ยงในและนอกสภาพปลอดเชื้อ และเซลล์ซัสเพนชันของแอปเปิล (*Malus×domestica* Borkh.) จำนวน 4 สายพันธุ์ ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ dextran sulphate potassium salt 0.3 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ KH_2PO_4 เข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ และแมนนิทอล

0.65 โมลาร์ พบว่าแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันได้จำนวนและความมีชีวิตสูงจากทุกสายพันธุ์ รองลงมาคือใบเลี้ยง และใบจริงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ส่วนใบจริงที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลองแยกโปรโตพลาสต์ได้ต่ำ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่างๆ ของแอปเปิลสายพันธุ์ Starkrimsom ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง พบว่า โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันแบ่งเซลล์สูงสุด 19.9 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยง 21 วัน รองลงมาได้แก่ใบเลี้ยงและใบจริงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแบ่งเซลล์ 16.5 และ 14.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองไม่พบการแบ่งเซลล์ Yan-Xiu และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงโสน (*Sesbania bispinosa* (Jacq.) W. F. Wight) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 7-13 วัน ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ โอโนซูกะ 1 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ พบว่า ใบเลี้ยงที่มีอายุ 10 วัน สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 3.0×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด Hoshino และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของอัฟริกันไวโอเล็ต (*Saintpaulia ionantha* Wendl) ด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 1 เปอร์เซ็นต์ เติมแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ และแมนนิทอล 0.2 โมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ $1\text{-}3\times10^{7}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร B5 เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร gellan gum 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซูโครสและแมนนิทอลอย่างละ 0.1 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่น 1×10^{5} โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้ใน 6 วัน และเจริญเป็นไมโครโคโลนีในเวลา 2 เดือน Zafar และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของ *Medicago littoralis* พบว่าชิ้นส่วนใบและใบเลี้ยงให้จำนวนความมีชีวิต และการแบ่งเซลล์สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และพบว่าใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองซึ่งมีอายุ 45-50 วัน ให้จำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ดีกว่าใบที่มีอายุ 75 วัน หรือใบที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลอง และพบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นอากาโรสส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Kunitake และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์จากใบ lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) จำนวน 9 สายพันธุ์ ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ และ ซอร์บิทอล 0.6 โมลาร์ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง พบว่า lisianthus สายพันธุ์ Early Bicolor Purple สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 16.3×10^{5} ต่อกรัมน้ำหนักสด Mills และ Hammerschlag (1994) แยก

โปรโตพลาสต์จากใบของท้อ (*Prunus persica*) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้เอนไซม์โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบที่มีขนาดเล็ก (ยาว 4-10 มิลลิเมตร) สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับใบขนาดกลาง (ยาว 13-17 มิลลิเมตร) และใบขนาดใหญ่กว่า (ยาว 22-30 มิลลิเมตร) Belarmino และคณะ (1994) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนลำต้นและก้านใบของมันเทศ (*Ipomoea batatas*) และสายพันธุ์ป่า (*I. lacunosa*) โดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายอาหารสูตร MS เติมแมนนิทอล 9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซีส แล้วนำไปแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ MES 6 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ แมนนิทอล 9 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าแยกโปรโตพลาสต์ได้ $1\text{-}2\times10^{6}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และจากสายพันธุ์ป่าได้ $4\text{-}5\times10^{5}$ ต่อกรัมน้ำหนักสด Oh และ Kim (1994) แยกโปรโตพลาสต์จากกลีบดอกพิทูเนีย (*Petunia hydrida*) พบว่ากลีบดอกที่มีอายุ 1-2 วัน หลังดอกบาน เมื่อนำมาแยกด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 9 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้จำนวนและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังเพาะเลี้ยงสูงสุดเมื่อเทียบกับกลีบดอกอายุอื่น (3-7 วัน) และพัฒนาพืชต้นใหม่ที่ปกติ Ochatt (1993) แยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนลำต้น ใบ และรากของลูกผสม *Weigela* × *florida* cv. Bristol Ruby (*Caprifoliaceae*) พบว่าชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมของแต่ละชิ้นส่วนแตกต่างกัน ภายหลังเพาะเลี้ยงพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสามารถแบ่งเซลล์สูงสุด แล้วเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกชิ้นส่วนอื่นๆ มีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำและหยุดการเจริญในที่สุด Nakano และ Mii (1992) แยกโปรโตพลาสต์จากใบของพืชในสกุล *Dianthus* ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 1 เปอร์เซ็นต์ MES 5 มิลลิโมลาร์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ พบว่าชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้จำนวนและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์สูงกว่าใบที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลอง และยังพบว่าชนิดและสายพันธุ์ของ *Dianthus* มีผลต่อจำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ภายหลังการเพาะเลี้ยง Dan และ Stephens (1991) พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L. cv. Lucullus 234) ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูไลซิน 1 เปอร์เซ็นต์, มาเซอเรส 0.2 เปอร์เซ็นต์, และโรไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16-17 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 1.23×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด Chand และคณะ

(1990) พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของ *Solanum dulcamara* L. ที่ดูแลรักษาเป็นเวลา 3-7 เดือน และมีอายุหลังย้ายเลี้ยง 4-5 วัน ให้โปรโตพลาสต์ที่มีความสมบูรณ์เป็นจำนวนมาก ในขณะที่เซลล์ซัสเพนชันที่ดูแลรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ให้โปรโตพลาสต์ที่มีรูปร่างยาวรี และพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันที่มีอายุหลังย้ายเลี้ยง 4-5 วัน ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด ในขณะที่โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันที่มีอายุหลังย้ายเลี้ยง 8-9 วัน มีเวคคิวโอลขนาดใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงพบว่าโปรโตพลาสต์ขยายขนาดใหญ่และมีการแตกหน่อมากขึ้น

4.2 ชนิดและระดับของออสโมติคัม

โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ ดังนั้นจึงมีความอ่อนแอต่อระดับออสโมติคที่สูงหรือต่ำเกินไป หากโปรโตพลาสต์อยู่ในสภาพที่มีระดับแรงดันออสโมติคสูงจะทำให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซิสโดยน้ำภายในเซลล์จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกภายนอกทำให้โปรโตพลาสต์แฟบลง ในทางตรงกันข้าม โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสภาพที่มีระดับแรงดันออสโมติคที่ต่ำเกินจะให้น้ำภายนอกเซลล์เคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าภายในเซลล์เป็นผลให้เซลล์เต่งและแตกในที่สุด ดังนั้นโปรโตพลาสต์จึงจำเป็นต้องอยู่ในสารละลายที่มีระดับออสโมติคัมที่เหมาะสม สารละลายที่นิยมใช้ได้แก่สารละลายน้ำตาลแมนนิทอล และ ซอร์บิทอล เนื่องจากเป็นน้ำตาลที่เฉื่อยต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของโปรโตพลาสต์ ในขณะที่น้ำตาลอื่นๆ เช่น กลูโคส หรือ ซูโครส เซลล์จะสามารถดูดไปใช้และมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) ศึกษาระดับของออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล็อกซิเนีย พบว่าการใช้สารละลายซอร์บิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด 3.36×10^5 ต่อกรัมน้ำหนักสด และโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง และแตกน้อย การใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ทำให้โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม และแตกมาก ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ส่งผลให้โปรโตพลาสต์หดตัว มีลักษณะเบี้ยว วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา (2537) ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมแก่การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบที่ 3-4 นับจากปลายยอดของมะเขือเทศพันธุ์สีดา โดยใช้สารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ปริมาณและความมีชีวิตสูงสุด ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 โมลาร์ ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตได้ Fellner (1994) ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง และออสโมลาริตี้ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากละอองเกสรที่แก่เต็มที่ของ *Tulbaghia violacea* Harv. (Liliaceae) พบว่าสภาพที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์คือ ความเป็นกรด-ด่าง 5.8 และออสโมลาริตี้ 652 $mOskg^{-1}\ H_2O$

4.3 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

เซลล์พืชที่เกาะกันเป็นเนื้อเยื่อนั้นจะถูกยึดติดด้วยชั้นมิดเดิลลาเมลลาซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารพวกเพคติน และเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่งซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์จะต้องทำการย่อยมิดเดิลลาเมลลาก่อนด้วยเอนไซม์กลุ่มเพคติเนส แล้วจึงย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2536) เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มเซลลูเลส เช่น เซลลูไลซิน, เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส, อาร์-10 กลุ่มเฮมิเซลลูเลส เช่น โรไซม์ เอชพี 150, เฮมิเซลลูเลส และกลุ่มเพคติเนส เช่น มาเซอเรส, เพคติเนส, เพคโตไลเอส วาย-23 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืช การย่อยผนังเซลล์ต้องใช้เอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด คือ เซลลูเลส และเพคติเนส ซึ่งอาจใช้เอนไซม์ทีละชนิดหรือใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดผสมรวมกันก็ได้ (อารีย์ วรัญญวัฒก์, 2541) และเอนไซม์จะต้องละลายในสารละลายที่มีออสโมติกัมที่เหมาะสม และทำให้ปราศเชื้อโดยการกรอง โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2543) แยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง ใบจริงของต้นกล้าส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง ด้วยเอนไซม์ต่างๆ กัน พบว่า เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ MES 3 มิลลิโมลาร์ และธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบทั้ง 3 ชนิดได้ 1.09×10^{7}, 3.07×10^{7} และ 8.48×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 80.90, 85.86 และ 89.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา (2537) แยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบที่ 3-4 นับจากปลายยอดของมะเขือเทศพันธุ์สีดาโดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับมาเซอโรไซม์ความเข้มข้นต่างๆ ปรับออสโมติคัมด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ผลการทดลองพบว่า เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 17.1×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 87.37 เปอร์เซ็นต์ สมปอง เตชะโต (2531) แยกโปรโตพลาสต์จากใบของมะอึก (*Solanum quitoense* Lam.) พบว่า เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 9.6×10^{5} ต่อกรัมน้ำหนักสด สมปอง เตชะโต (2530) แยกโปรโตพลาสต์จากใบจริงคู่แรกของถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7 โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด Reichert และ Liu (1996) แยก

โปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้าปอกระเจา (*Hibiscus cannabinus* L.) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสและเพคติเนสชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าปอกระเจาสายพันธุ์ Cub เมื่อแยกด้วยเอนไซม์เซลลูไลซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอเรส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 7 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7.1×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 87 เปอร์เซ็นต์ Anthony และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนที่แผ่เต็มที่ใบที่ 2 และ 3 ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* cv. M. Thai 8) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลสอาร์เอส 0.4 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ MES 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในสารละลาย CPW9M เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 1.95×10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 85±2 เปอร์เซ็นต์ Webb และคณะ (1994) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนที่ยังไม่แผ่เต็มที่ของ *Lactuca perennis* และศึกษาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ โดยนำใบแช่ในสารละลาย CPW13M เพื่อให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซีส เวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วอินคิวเบทด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสอาร์-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ MES 0.11 เปอร์เซ็นต์ และ BSA (bovine serum albumin) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลาย CPW13M เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ $1.1\pm0.3 \times 10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด มีความมีชีวิต 86.5±6.8 เปอร์เซ็นต์ Mills และ Hammerschlag (1994) แยกโปรโตพลาสต์จากใบของท้อ (*Prunus persica*) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้เอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์โอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอเรส 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 1.49×10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 94 เปอร์เซ็นต์ Grezes และคณะ (1994) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของกาแฟ (*Coffea arabica*) พบว่าการนำเซลล์ซัสเพนชันไปพลาสโมไลซีสด้วยสารละลายเกลือ (K_3 salt) เติมซูโครส 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ $3.5\text{-}4.6\times10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด Perales และ Schieder (1993) แยกโปรโตพลาสต์จากใบและปลายยอดของแอปเปิล (*Malus* × *domestica* Borkh.) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจำนวน 7 สายพันธุ์ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 0.3 เปอร์เซ็นต์ เติม PVP-10 (polyvinylpyrrolidone 10000) 1 เปอร์เซ็นต์ MES 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.63 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 700 mOs kg^{-1} อินคิวเบทบนเครื่องเขย่าที่ 3 รอบต่อ

นาที ในสภาพมืดเป็นเวลา 17 ชั่วโมง พบว่าแยกโปรโตพลาสต์ได้ 6×10^{6} – 1.6×10^{7} ต่อกรัมน้ำหนักสด

4.4 ระยะเวลาในการอินคิวเบท

ระยะเวลาการอินคิวเบทชิ้นส่วนพืชในสารละลายเอนไซม์ย่อมมีผลต่อจำนวนและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ กล่าวคือ เมื่ออินคิวเบทเป็นเวลานานขึ้น เอนไซม์สามารถย่อยผนังเซลล์ได้มากขึ้นจะทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากขึ้น อย่างไรก็ตามการอินคิวเบทเป็นระยะเวลานานก็อาจส่งผลให้โปรโตพลาสต์ถูกทำลายโดยเอนไซม์ ทำให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์มีลดลง โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2543) แยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ แล้วอินคิวเบทเป็นระยะเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนสูงขึ้นเมื่ออินคิวเบทเป็นระยะเวลานานขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา (2537) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอินคิวเบทเนื้อเยื่อใบที่ 3-4 นับจากปลายยอดของมะเขือเทศพันธุ์สีดาโดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับออสโมติกัมด้วยสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ โดยศึกษาระยะเวลาในการอินคิวเบทต่างๆ กัน 5 ช่วงเวลา คือ 90, 120, 150 180 และ 210 นาที พบว่าการอินคิวเบทเป็นเวลา 90 นาที ให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด Reichert และ Liu (1996) ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้าปอกระเจา (*Hibiscus cannabinus* L.) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยเอนไซม์เซลลูไลซิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอเรส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 7.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 1.8×10^{5} ต่อกรัมน้ำหนักสด การอินคิวเบทเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนที่ใกล้เคียงกัน คือ 7.8×10^{6} และ 7.2×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการอินคิวเบทที่ช่วงเวลาดังกล่าวนั้นทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงเหลือ 85 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการอินคิวเบทเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เพียง 1.8×10^{5} ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่มีความมีชีวิตสูงถึง 87 เปอร์เซ็นต์

4.5 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ซึ่งอาจมีการรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้มีการสูญเสียเกลือและสารต่างๆ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของสารอาหารที่เพียงพอและมีระดับของออสโมติคัมที่เหมาะสมจนกว่าโปรโตพลาสต์นั้นจะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่อย่างสมบูรณ์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะประสบความสำเร็จเพียงใดนั้นขึ้นกับปัจจัยจากการเพาะเลี้ยงด้วยเช่นกัน เช่น ปัจจัยด้านอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต เทคนิควิธีในการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2543) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบจริง ใบเลี้ยง และใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงของส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปรับความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้โปรโตพลาสต์มีพัฒนาการดีที่สุด มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล็อกซิเนียในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 0.4 โมลาร์ ปรับความหนาแน่น 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ และเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมต่อไปอีก 21 วัน พบว่ามีการสร้างโคโลนีเล็กๆ ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และพัฒนาเป็นเซลล์ซัสเพนชัน สมปอง เตชะโต (2531) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของมะอึก (*Solanum quitoense* Lam.) ในอาหารสูตร MSB_1 เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมการแบ่งเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4-7 วัน อย่างไรก็ตามพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หยุดลงหลังจากที่พัฒนาเป็นไมโครโคโลนีจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MSB_2 อีกเป็นเวลา 1 เดือน และย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิมเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสเจริญอย่างรวดเร็ว และมีสีเขียวภายใน 2 สัปดาห์ต่อมา Marchant และคณะ (1997) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) สายพันธุ์ Abraham Darby และ Marie Pavie พบว่าโปรโตพลาสต์ของกุหลาบทั้งสองสายพันธุ์สามารถแบ่งเซลล์ได้ในอาหารแข็งสูตร KM8p เติม PVP-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ NAA 8.91 ไมโครโมลาร์ และ BA 4.44 ไมโครโมลาร์ และเจริญเป็นแคลลัสที่มีการสร้างรากเมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร SH (Schenk and Hildebrandt) เติม 2,4-D 13.56 ไมโครโมลาร์ Ai-Ping และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของแอปเปิล (*Malus×domestica* Borkh.) จำนวน 4 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร MS, KM8P และ D_2 เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์ของแอปเปิลทุกสายพันธุ์สามารถแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนี

ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KM8P ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ D_2 พบว่าสามารถชักนำการแบ่งเซลล์ได้ในทุกสายพันธุ์แต่สามารถชักนำการสร้างโคโลนีได้เฉพาะสายพันธุ์ Starkrimson เท่านั้น Yan-Xiu และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบเลี้ยงของโสน (*Sesbania bispinosa* (Jacq.) W. F. Wight) ในอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ กัน กลูตามีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ปรับความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และวิธีการเพาะเลี้ยงต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบางๆ บนอาหารวุ้นอากาโรส (liquid-over-agar) ในอาหารเติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการแบ่งเซลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ และเจริญเป็นไมโครโคโลนีได้ภายหลังเพาะเลี้ยง 10 วัน เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิมที่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอลลงพบว่ากลุ่มเซลล์สามารถพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดใหญ่และเจริญเป็นแคลลัสสีเขียวเหลือง หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงแคลลัสไปยังอาหารสูตร MS เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ Nakano และคณะ (1995) ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของ Gentian (*Gentiana* spp.) และอิทธิพลของไซโตไคนินต่อการแบ่งเซลล์ พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร B5 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ 8.9 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติม gellan gum เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์สูงสุด 25.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 8.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นอากาโรส และ calcium alginate มีการแบ่งเซลล์ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ Zafar และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *Medicago littoralis* พบว่าการฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนใบในอาหารวุ้นอากาโรสส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Patil และคณะ (1994) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) จำนวน 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร TMp ปรับความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 4 วัน จึงเมื่อย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่า หลังวางเลี้ยง 7 วัน มีการแบ่งเซลล์ 55-70 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาเป็นแคลลัสภายหลังเพาะเลี้ยง 24 วัน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร TMc วางเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 21-28 วัน พบว่า แคลลัสมีขนาดใหญ่ 1-1.5 เซนติเมตร และมีการสร้างคลอโรฟิลด์ การพัฒนาพืชต้นใหม่ของมะเขือเทศทั้ง 3 สายพันธุ์ สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ZEA 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Belarmino และคณะ (1994) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนลำต้นและก้านใบของมันเทศ (*Ipomoea batatas*)

และสายพันธุ์ป่า (*I. lacunosa*) พบว่าการเพาะเลี้ยง *I. batatas* ในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 9 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้โปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์ใน 5 วัน เจริญเป็นกลุ่มเซลล์ 8-12 เซลล์ ภายหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงเติม casamino acid 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ABA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้และเจริญเป็นพืชต้นใหม่เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงเติม glutamine 800 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ KN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ป่าซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันแต่ลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตลงครึ่งหนึ่งและเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้โปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์ใน 7 วัน เจริญเป็นกลุ่มเซลล์ 6-10 เซลล์ ภายหลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงเติม IAA 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้และเจริญเป็นพืชต้นใหม่เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม GA_3 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Oh และ Kim (1994) เลี้ยงโปรโตพลาสต์จากกลีบดอกของพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์หนาแน่น 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลง เติม 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Difco Bacto Agar 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์สูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ Nakano และ Mii (1992) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของ *Dianthus chinensis* cv. Gosun-sekichiku ด้วยอาหารสูตรต่างๆ กัน 3 สูตร ปรับความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KM8P เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.5 โมลาร์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าอาหารสูตร MS หรือ ½MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน Dan และ Stephens (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L. cv. Lucullus 234) พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร KM6 (Kao and Michayluk) เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาการโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร A8 (สูตร KM6 ดัดแปลง โดยปรับความเข้มข้นของซูโครสเป็น 0.18 โมลาร์ ร่วมกับ แมนนิทอล 0.18 โมลาร์) พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้สูงสุดใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นย้ายไมโครแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.25

มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ 92.3 เปอร์เซ็นต์

5. การปลูกถ่ายยีน

การปลูกถ่ายยีนของพืชสามารถกระทำโดยหลายวิธี ได้แก่ การปลูกถ่ายยีนโดยอาศัย Ti-plasmid ของ *Agrobacterium tumefaciens* หรือ Ri-plasmid ของ *A. rhizogenes* เป็นตัวกลางในการส่งผ่านยีนเข้าสู่พืช การย้ายยีนจากพลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของพืช การใช้กระแสไฟฟ้า การยิงยีน และการใช้เข็มฉีดขนาดเล็กส่งผ่านพลาสมิดหรือดีเอ็นเอเข้าสู่นิวเคลียสของพืชโดยตรง การปลูกถ่ายยีนยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยม อะโกรแบคทีเรียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุกพืชแล้วถ่ายทอดชิ้นส่วนพันธุกรรมที่เรียกว่า T-DNA (transferred DNA) เข้าสู่พืช กลไกการถ่ายทอด T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช เริ่มจากพืชสร้างสารฟีโนลิกบริเวณที่เกิดบาดแผล สารดังกล่าวคือ acetosyringone มีผลกระตุ้น virulent gene (*Vir* gene) ที่อยู่บนส่วนของ T-DNA ให้ทำหน้าที่ตัดและส่งชิ้นส่วน T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช หลังจากนั้นส่วนของ T-DNA จะเข้ารวมกับหน่วยพันธุกรรมของพืช แล้วยีนซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA จะควบคุมการสร้างฮอร์โมนพืช และอนุพันธุ์ของกรดอะมิโน คือ ออกโตไพน์ โอไพน์ และ โนพาไลน์ กรดอะมิโนดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ส่วนฮอร์โมนที่สร้างขึ้นมีผลให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการแบ่งเซลล์ผิดปกติเป็นผลให้เกิดการพัฒนาเป็นปุ่มปม (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536; Krens *et al.*, 1982; Zupan and Zambryski, 1995) การปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมมักเป็นการถ่ายทอดลักษณะของยีนที่ต้องการเพียงหนึ่งหรือสองลักษณะเข้ารวมกับพันธุกรรมของพืชโดยพืชยังคงมีลักษณะพันธุกรรมส่วนใหญ่เหมือนเดิม (Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1998) จากความสามารถของอะโกรแบคทีเรียมข้างต้น จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการปลูกถ่ายยีนให้แก่พืช โดยการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ เช่น ต้านทานโรคและแมลง ต้านทานสารกำจัดวัชพืชบาสต้า ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมอื่นๆ เข้าสู่ชิ้นส่วน T-DNA แล้วให้อะโกรแบคทีเรียมเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดยีนเป้าหมายให้กับพืช

ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมได้แก่ พันธุกรรมของพืช สายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียม ชนิดและโครงสร้างของพลาสมิด วิธีการปลูกถ่าย และการคัดเลือกพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน ปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในหลายๆ พืช Zhang และ Zeevaart (1999) รายงานการปลูกถ่ายยีนให้กับใบเลี้ยงผักขม (*Spinacia oleracea* L.) โดยเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด p35S/sm*gfp* ที่ประกอบด้วยยีนคัดเลือก *npt*II (neomycinphosphotransferase) และยีนรายงานผล sm*gfp* (soluble-modified green-fluorescent

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

protein) พบว่ายีน smgfp สามารถเข้าไปรวมกับจีโนมของผักขมได้ และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ Miguel และ Oliveira (1999) ศึกษาสายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียม ต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนของอามอนด์ (*Prunus dulcis* Mill.) พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUSINT หรือ pFAJ3003 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงกว่าสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUSINT และสามารถพัฒนาพืชต้นใหม่ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนได้ Kuvshinov และคณะ (1999) ศึกษาสายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียม ต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนของเทอร์นิป (*Brassica rapa* spp. *oleifera*) โดยเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือข้อร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ เป็นเวลา 2 วัน พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pGPTV มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายเชื้อ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด pGPTV และสายเชื้อ C58C1 ซึ่งมีพลาสมิด pGV2260pHTT หรือ pGV3850pHTT หรือ pGV3850pGPTV นอกจากนี้ยังพบว่าการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมด้วย claforan (cefotaxime) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลลดการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 2-5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ carbenicillin 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกคือ 20-25 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าการใช้คานามัยซินสามารถพัฒนาพืชต้นใหม่ได้สูงกว่าการใช้ไฮโกรมัยซิน 3 เท่า อย่างไรก็ตาม ต้นดังกล่าวที่คัดเลือกด้วยคานามัยซินมีกิจกรรมของ GUS (β-glucuronidase) 12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ไฮโกรมัยซินมีกิจกรรมของ GUS 92 เปอร์เซ็นต์ Curtis และคณะ (1999) ศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมให้กับใบ *Datura meteloides* D.C. โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ 1065 ซึ่งมีพลาสมิด pVDH65 และ pTOK47 พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารชักนำยอดเป็นเวลา 1-4 วัน แล้วนำมาแช่ในซัสเพนชันของอะโกรแบคทีเรียมมีผลเพิ่มการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ให้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการนำชิ้นส่วนพืชที่ผึ่งตัดแยกมาจุ่มแช่ในซัสเพนชันของอะโกรแบคทีเรียมทันที การสร้างบาดแผลที่ท้องใบพบว่ามีผลลดการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ และการเจือจางเชื้อที่ 1:20 และ 1:10 มีผลให้พืชต้นใหม่มีกิจกรรมของ GUS สูงกว่าการเจือจางที่ 1:5 ส่วนเวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชเป็นเวลา 5, 10 และ 20 นาที พบว่าพืชต้นใหม่ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีกิจกรรมของ GUS ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ Nakamura และคณะ (1999) ปลูกถ่ายยีน soybean β-1,3-endoglucanase cDNA ให้กับ kiwifruit โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pROKIa-EG เพื่อให้ต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อรา พืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซินเมื่อตรวจสอบโดยวิธี PCR พบว่ามียีนดังกล่าวอยู่ 65.4 เปอร์เซ็นต์ นำต้นที่มียีนดังกล่าวไปชักนำรากและตรวจสอบยืนยันอีกครั้งโดย Southern blot และ Northern blot พบว่า มียีนดังกล่าวอยู่ในจีโนมของพืช และตรวจสอบโปรตีน soybean β-1,3-endoglucanase โดย Western blot พบว่าพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีโปรตีนดังกล่าวทุกต้น การ

ตรวจการต้านทานต่อเชื้อ *Botrytis cinerea* พบว่ามีพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน 2 ต้น มีกิจกรรมของเอนไซม์ soybean β-1,3-endoglucanase cDNA สูงกว่าต้นควบคุม 4-6 เท่า Jeknic และคณะ (1999) ปลูกถ่ายยีนให้กับ *Iris germanica* โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม พบว่า การคัดเลือกโดยใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และ geneticin (G418) มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันมากที่สุด และในกรณีใช้สารบาสต้า พบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญ 70 เปอร์เซ็นต์ สายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมคือ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233 การทดลองนี้สามารถชักนำพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อ paromomycin (มีกิจกรรมของยีน *npt* II) และมีกิจกรรมของ GUS มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และยีนดังกล่าวรวมกับจีโนมของพืชอย่างสมบูรณ์ Arokiaraj และคณะ (1998) ปลูกถ่ายยีนให้กับแคลลัสที่ชักนำจากอับละอองเกสรของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ GV2260 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUSINT พบว่า สามารถสร้างพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซิน มีกิจกรรมของ GUS ทั้งในส่วนของใบและซีรัมของน้ำยาง และสามารถถ่ายทอดลักษณะของยีนโดยการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (ติดตากับต้นตออื่นๆ) จำนวน 3 ชั่ว Nakamura และคณะ (1998) ปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมให้กับชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพลับญี่ปุ่น (*Diospyros kaki* Thunb) พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pSMAK251 มีประสิทธิภาพสูงสุด 11.1 เปอร์เซ็นต์ การใช้สารปฏิชีวนะคานามัยซิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการสร้างยอดจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าการใช้สารปฏิชีวนะ claforan 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการสร้างยอด ในขณะที่การใช้ carbenicillin sulfate 250 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนตายอดลดลง 4 เท่า Norelli และคณะ (1996) ศึกษาการสร้างบาดแผลต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนให้กับแอปเปิล (*Malus* × *domestica* Borkh. cv. Royal Gala) ด้วยอะโกรแบคทีเรียม สายเชื้อ EHA105 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUS_INT พบว่าการสร้างบาดแผลโดยใช้ปากคีบบีบมีผลให้ให้ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงกว่าการสร้างบาดแผลโดยใช้มีดผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ Chen และ Kuehnle (1996) ปลูกถ่ายยีนให้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Rudolph และ UH1060 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมี พลาสมิด pCa2Att พบว่าสารปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหน้าวัวสายพันธุ์ Rudolph คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากชิ้นส่วนของลำต้นระหว่างข้อ คือ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ UH1060 พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและลำต้นระหว่างข้อคือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังการปลูกถ่ายยีน พบว่าหน้าวัวทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างแคลลัสในอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซินและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ภายหลังเพาะเลี้ยง 1 ปีขึ้นไป พืชต้นใหม่ที่ได้เมื่อนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอพบว่ามีส่วนของยีน *neo* และ *att* อยู่ เมื่อตรวจสอบโปรตีน

โดยวิธี Western พบว่าเนื้อเยื่อแคลลัสสามารถสร้างโปรตีน attacin ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนเนื้อเยื่อพี่เลี้ยง (เนื้อเยื่อยาสูบ) พบว่าส่งเสริมการสร้างแคลลัสแต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซิน Berry และคณะ (1996) ปลูกถ่ายยีนให้กับใบและก้านใบของสะระแหน่สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ พบว่า อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ A281 ซึ่งมีพลาสมิด pTiBo542 สามารถส่งเสริมการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของสะระแหน่สายพันธุ์ orange mint (*Mentha spicata* L.) และชิ้นส่วนก้านใบของสายพันธุ์การค้า (*M.* × *piperita* L. cv. Black Mitcham) และ Scotch spearmint (*M.* × *gracillis* Sole cv. Baker) และพบว่าแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีอะโกรไพน์สูงกว่าการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนก้านใบ อย่างไรก็ตาม การทดลองดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาพืชต้นใหม่ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ Gama และคณะ (1996) ปลูกถ่ายยีนให้กับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของมันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) สายพันธุ์ White Star ด้วยการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pMON9793 พบว่ามีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินได้อย่างปกติ การตรวจสอบเนื้อเยื่อเคมีและการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Southern พบว่ามียีน GUS อยู่ในหน่วยพันธุกรรมของพืช ความเข้มข้นของคานามัยซินต่ำสุดที่ยับยั้งการสร้างเอ็มบริโอได้ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟทาซีม เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ทำให้จำนวนเอ็มบริโอลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม Semeria และคณะ (1996) ปลูกถ่ายยีนให้กับ lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) 2 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงใบร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ A281 ซึ่งเป็นสายเชื้อที่ก่อให้เกิดปุ่มปมมีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงกว่า สายเชื้อ EHA 105 ซึ่งเป็นสายเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดปุ่มปม (ทั้งสองสายพันธุ์มีพลาสมิด pKIWI105) และปลูกถ่ายยีนสร้างโปรตีน TSWV (tomato spotted wilt virus) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA105 ซึ่งมี พลาสมิด pSW9 พบว่าสามารถชักนำพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซินจำนวน 7 ต้น เมื่อตรวจสอบโดย PCR พบว่าพืชต้นใหม่ทั้งหมด มียีน TSWV และ *npt* II อยู่ในดีเอ็นเอที่แยกจากใบ อย่างไรก็ตาม มีเพียงต้นเดียวที่สามารถสร้างโปรตีน TSWV ได้ Shackelford และ Chlan (1996) ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ต่อประสิทธิภาพในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 และ EHA 101 พบว่า สารซีโฟทาซีมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อ LBA 4404 และสาร moxalactam มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อ EHA 101 นอกจากนี้ยังพบว่าสารปฏิชีวนะทั้งสองเมื่อใช้ความเข้มข้น 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสจากใบยาสูบ แต่หากเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดการพัฒนาพืชต้นใหม่ Scorza และคณะ (1995) ปลูกถ่ายยีน PRVCP (papaya

ringspot virus coat protein) ให้กับชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพลัม สายพันธุ์ Stanley ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ C58/Z707 ซึ่งมีพลาสมิด pGA482GG/CPPRV-4 พบว่าพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซินเมื่อนำไปทาบกิ่งกับต้นที่เป็นโรค plum pox virus สามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อได้ระยะหนึ่ง (19 เดือน) อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงไปเป็นระยะเวลานาน (มากกว่า 32 เดือน) ก็แสดงอาการของโรคดังกล่าว Pena และคณะ (1995) ปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นของส้มเขียวหวาน (*Citrus sinensis*) ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUSINT พบว่าสามารถชักนำยอดจากอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดดังกล่าวมีกิจกรรมของ GUS 7.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเสียบยอดกับต้นตอส้มพันธุ์อื่น และตรวจสอบโดย Southern blot พบว่ามียีน GUS อยู่ในพันธุกรรมของส้ม Zhu และคณะ (1995) ปลูกถ่ายยีน OSML (osmotin-like protein) 2 ชนิด (OSML13 และ OSML81) ให้กับชิ้นส่วนใบมันฝรั่ง (*Solanum commersonii*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI101.1 พบว่าพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซินมียีนดังกล่าวในจีโนมของพืช และมีกิจกรรมของ OSML ทั้งสองชนิด กิจกรรมของยีน OSML เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากแรงดันออสโมติก, ABA, โซเดียมคลอไรด์, salicylic acid, บาดแผล, และการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora infestans* Yepes และ Aldwinckle (1994) ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการพัฒนาพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบของแอปเปิลสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสารซีโฟทาซีมเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเจริญของยอดสูงกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลลดการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ส่วนการใช้ carbbenicillin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้สร้างแคลลัสเกิดขึ้นแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ การเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือมากกว่า ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ และการใช้คานามัยซิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือมากกว่า ร่วมกับ carbenicillin หรือซีโฟทาซีมไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เกิดขึ้น Pawlicki และคณะ (1992) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ C58C1 ซึ่งมีพลาสมิดคู่ ได้แก่ pGV2260 ร่วมกับ pGSTRN943 หรือ pGV2260 ร่วมกับ pGSGluc1 ให้กับแครอท (*Daucus carota* L.) พบว่าแครอทสายพันธุ์ Nanco พบว่ามีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด ก้านใบมีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุดเมื่อเทียบกับ ใบเลี้ยง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และราก ชิ้นส่วนพืชที่มีอายุ 3 หรือ 4 สัปดาห์ ส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนได้สูงสุดใกล้เคียงกัน การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมร่วมกันเป็นเวลา 2 และ 3 วัน ส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงใกล้เคียงกัน การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชก่อนเป็นระยะเวลาสั้นๆ พบว่าไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่าย

ยีน การเติม acetosyringone 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียม (LB medium) หรือเติมในอาหาร LB ร่วมกับอาหารที่ใช้ในขั้นตอนการแช่ชิ้นส่วนพืช ส่งเสริมการเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน เมื่อนำต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมาชักนำแคลลัสและพัฒนาพืชต้นใหม่อีกครั้งโดยผ่านกระบวนการสร้างเอ็มบริโอ พบว่าสามารถถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อสารคานามัยซินได้ทั้งในชั่วดังกล่าวและเมื่อนำต้นดังกล่าวมาสู่กระบวนการชักนำพืชต้นใหม่อีกครั้งหนึ่ง การศึกษาการต้านทานต่อคานามัยซิน พบว่าที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสูงกว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสจากก้านใบได้อย่างสมบูรณ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสและการพัฒนาพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และลำต้นของนมตำเลีย
2. เพื่อศึกษาวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของนมตำเลีย
3. เพื่อการศึกษาระบบการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ ให้กับชิ้นส่วนใบของนมตำเลีย

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุพืช

นำฝักของนมตำเลียที่แก่เต็มที่ (ภาพที่ 1) มาฆ่าเชื้อโดยการจุ่มเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟให้ทั่ว ผ่าแยกเมล็ดไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้ม 1,300 ลักซ์ เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์จึงตัดชิ้นส่วนข้อเหนือใบเลี้ยงยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ คัดเลือกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการย้ายเลี้ยงครั้งต่อไป และนำยอดดังกล่าวมาเป็นวัสดุพืชในการทดลองอื่นๆ

สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบในหลอดทดลอง เตรียมใบนมตำเลียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40-50 วัน หลังจากนั้นตัดใบที่แผ่เต็มที่ มีขนาดความยาว 1.5-2.5 เซนติเมตร มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดผ่าตัดแล้วจึงนำไปอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ ส่วนใบนอกหลอดทดลองใช้ใบกึ่งอ่อนกึ่งแก่คู่บนของต้นนมตำเลียที่ย้ายจากหลอดลงปลูกในกระถางและเลี้ยงในสภาพแสงธรรมชาติ (ความเข้มแสงประมาณ 1,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 28 องศาเซลเซียส อายุ 8 เดือน นำใบมาฟอกฆ่าเชื้อโดยการแช่ในเอทธานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง และแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วหั่นชิ้นส่วนใบเป็นชิ้นเล็กๆ ตามขวางแล้วจึงนำไปอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์

ในกรณีการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชัน ใช้เซลล์ซัสเพนชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 5 เดือน จึงแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันที่มีอายุ 7 วัน หลังย้ายเลี้ยง

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกและฝักของนมตำเลีย

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BA, NAA, KN และ TDZ
- เอนไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส, อาร์-10 และมาเซอโรไซม์ อาร์-10
- แมนนิทอล
- คลอร็อกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25 เปอร์เซ็นต์)
- วุ้นไฟต้าเจล วุ้นอากาโรส และวุ้นธรรมดา (ตรานางเงือก)
- เอทธานอล
- ไฮโปเนกซ์ (Hyponex) สูตร 10-10-10

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- ตู้ย้ายเลี้ยง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องคนสารระบบแม่เหล็ก
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- เครื่องกรองพร้อมกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร
- เครื่องดูดสูญญากาศ
- เครื่องเขย่า
- ไมโครไปเปต
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้อบไมโครเวฟ
- ตู้อบแห้ง
- กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด และแบบสเตอริโอ
- กล้องถ่ายรูป
- เครื่องแก้ว และภาชนะพลาสติก เช่น ขวดปรับปริมาตร กระบอกตวง ไปเปต ฟลาสก์ กระบอกฉีดยา หลอดเซ็นตริฟิวก์ จานเพาะเลี้ยง บีกเกอร์
- ปากคีบ ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้ามมีด
- กระจกสไลด์ ฮีมาไซโตมิเตอร์

วิธีการ

1. การชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

ตัดข้อของต้นนมตำเลียให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยมีจำนวนข้อ 1 ข้อต่อชิ้นส่วน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นร่วมกันของ BA กับ NAA เพาะเลี้ยง 8 ขวด และในแต่ละขวดเพาะเลี้ยง 4 ชิ้นส่วน วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้ม 1,300 ลักซ์ ตรวจสอบการสร้างยอด ราก และลักษณะอื่นๆ ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน

2. การเพิ่มความแข็งแรงยอดและการชักนำราก

ย้ายยอดและกลุ่มยอดที่มีขนาดเล็กและไม่แข็งแรงซึ่งได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งมีความยาว 2-3 เซนติเมตร ไปเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ดังนี้ คือ

1) ไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์
2) สูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
3) สูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์
4) สูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
5) สูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนและความยาวยอด ราก จำนวนข้อ ใบ และลักษณะอื่นๆ ภายหลังวางเลี้ยง 40 วัน วางแผนการทดลองโดยใช้การทดลองแบบ CRD (completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยโปรแกรม IRRISTAT เวอร์ชั่น 3.1 (Biometrics Unit, International Rice Research Institute; IRRI, Philippines)

3. การชักนำแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชัน

ศึกษาการชักนำแคลลัสจากแผ่นใบ ก้านใบ และลำต้นของนมตำเลียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 4 สัปดาห์ วางเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3, 4 และ 5

มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกชนิด ปริมาณ สี รูปร่างของแคลลัส ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 10 จานเพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยง 8 ชิ้นส่วนต่อจานเพาะเลี้ยง วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้ม 1,300 ลักซ์ เป็นเวลา 30 วัน ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่และเพาะเลี้ยงต่อมาอีก 20 วัน บันทึกชนิด ปริมาณ สี และรูปร่างของแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบในการทดลองข้างต้น หนัก 1 กรัม ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยง 4 ฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้ม 1,800 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 28 วัน บันทึกลักษณะ สี และการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชันในแต่ละชุดของสารควบคุมการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกัน จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารดังกล่าวเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันและใช้แยกโปรโตพลาสต์ต่อไป

4. การชักนำพืชต้นใหม่

ชักนำพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบ จากแคลลัสที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบ ซึ่งมีอายุ 50 วัน โดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA, KN หรือ TDZ เข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นเพาะเลี้ยง 4 ขวด ขวดละ 4 ชิ้นส่วน วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้ม 1,300 ลักซ์ เป็นเวลา 90 วัน เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 30 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด ตำแหน่งของการสร้างยอด และลักษณะอื่นๆ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT จากนั้นคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ร่วมกับ NAA 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกผลและเปรียบเทียบการเจริญเช่นเดียวกับข้างต้น

5. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

5.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

นำใบของนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาหั่นฝอยจำนวน 1 กรัม จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ข้างต้นละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อินคิวเบทในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร พันด้วยพาราฟิล์ม อินคิวเบทบนเครื่องเขย่าที่ 40 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มแสงต่ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำโปรโตพลาสต์มากรองด้วยผ้ากรองไนลอนเมชขนาด 77 ไมโครเมตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายเอนไซม์ส่วนบนออก เติมสารละลายล้าง (สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เติมธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงไป ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเบาๆ ให้เข้ากัน และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้างเอนไซม์ออก จากนั้นทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์โดยลอยชัสเพนชันของโปรโตพลาสต์ในสารละลายล้างปริมาตร 3 มิลลิลิตร บนสารละลายซูโครสเข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์ซึ่งแขวนลอยอยู่ชั้นกลางระหว่างสารละลายซูโครสและสารละลายล้าง แล้วนำโปรโตพลาสต์มาล้างด้วยสารละลายล้างอีกครั้ง ตรวจสอบจำนวน ขนาด รูปร่างโดยหยดชัสเพนชันของโปรโตพลาสต์บนสไลด์นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบความมีชีวิตโดยใช้สารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด (Fluorescein diacetate, FDA) เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซน เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ แล้วปรับความหนาแน่น 2.5×10^{5} โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ บันทึกพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT หลังจากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมไปเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เช่นเดียวกับข้างต้น วางแผนการทดลองโดยใช้การทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5.2 การศึกษาระยะเวลาในการอินคิวเบท

แยกโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ใบจำนวน 1 กรัม จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอินคิวเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วทำการแยกโปรโตพลาสต์เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา ปรับความหนาแน่น 2.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ บันทึกจำนวน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาการอินคิวเบทโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5.3 การศึกษาแหล่งของชิ้นส่วนพืช

แยกโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้านมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ใบจากการเลี้ยงในนอกหลอดทดลอง และเซลล์ซัสเพนชันที่ชักนำจากแคลลัสจากใบ แยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อชิ้นส่วนพืช 1 กรัม ทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ปรับความหนาแน่น 2.5×10^5 โปรโตพลาต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ บันทึกจำนวน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5.4 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบในสภาพปลอดเชื้อมาปรับความหนาแน่นเป็น 2.5×10^5 ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.5 โมลาร์ โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้ คือ

ก. การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม

ข. การเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวน โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ที่ผ่าปิดจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร จำนวน 5 หยด (แต่ละหยดมีปริมาตร 40 ไมโครลิตร) ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงให้อยู่ในลักษณะหยดแขวน

ค. การฝังเลี้ยง

- การฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งไฟต้าเจล โดยเลี้ยงในอาหารเติมวุ้นไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม
- การฝังเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งอากาโรส โดยเลี้ยงในอาหารเติมอากาโรส 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม
- การฝังเลี้ยงในอาหารแข็งอากาโรส โดยเลี้ยงในอาหารเติมอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม

สังเกตพัฒนาการของโปรโตพลาสต์เป็นระยะๆ บันทึกพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ ในแต่ละวิธีการเลี้ยงเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5.5 การศึกษาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น 5×10^4, 1×10^5, 2.5×10^5 และ 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งโดยใช้ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ สังเกตพัฒนาการเป็นระยะๆ บันทึกพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5.6 การศึกษาผลของ BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบในสภาพปลอดเชื้อด้วยความหนาแน่น 2.5×10^5 ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์

BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	1
1	2
1	3
1	4
1	5
2	1
3	1
4	1
5	1

สังเกตพัฒนาการเป็นระยะๆ และบันทึกพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA และ NAA โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในแต่ละการศึกษาข้างต้น เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15×60 มิลลิเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พันด้วยพาราฟิล์ม นำโปรโตพลาสต์ข้างต้นไปเพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส และเติมอาหารใหม่สูตรเดิม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นเติมอาหารที่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอลลงเป็น 0.4 โมลาร์ ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงเติมอาหารที่ไม่มีแมนนิทอล

6. การปลูกถ่ายยีน

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคานามัยซินต่อการเจริญของแคลลัส

ย้ายเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากใบในอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน เข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของคานามัยซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้สมบูรณ์

6.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารไบอะลาฟอสต่อการเจริญของแคลลัส

ย้ายเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากใบในอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารไบอะลาฟอสเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารไบอะลาฟอสที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้สมบูรณ์

6.3 การศึกษาสายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียมต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 (ภาคผนวกที่ 1) เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร YEB (yeast extract broth) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pTok 233 (ภาคผนวกที่ 2) เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งสูตร AB และอาหารเหลวสูตร LB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สายเชื้อ EHA 101 มีพลาสมิด pIG 121 (ภาคผนวกที่ 3) เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งสูตร AB และอาหารเหลวสูตร LB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pARK 5 (ภาคผนวกที่ 4) เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับชุดเปรียบเทียบเลี้ยงชิ้นส่วนใบของนมตำเลียในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเช่นเดียวกันแต่ไม่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เลี้ยงชิ้นส่วนใบของนมตำเลียร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม โดยนำใบนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาตัดครึ่งตามขวาง แล้วนำไปเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม เป็นเวลา 15 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไม่เติมสารปฏิชีวนะ) เป็นเวลา 2 วัน วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส แสง 1,800 ลักซ์ หลังจากนั้นจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีม เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวางเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายเลี้ยงในสภาพที่มีแสง ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมทุก 2-3 วัน หากพบว่ามีการปนเปื้อนเกิดขึ้นย้ายเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ 2-3 ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ ตรวจสอบการแสดงออกของ GUS (β-glucuronidase) ที่ได้รับการปลูกถ่ายเพื่อเปรียบเทียบชนิดของสายเชื้อต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน โดยตัดแคลลัสที่สร้างจากเนื้อเยื่อใบเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่จานหลุม 2-3 ชิ้นต่อหลุม เติมสารละลาย X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid) และสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (X-Gluc เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 26 ไมโครลิตร ร่วมกับสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปดูดอากาศออกด้วยเครื่อง

ดูดอากาศเพื่อให้สารละลายเข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอินคิวเบทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในกรณีที่ใบมีสีเขียวเนื่องจากคลอโรฟิลล์ให้ล้างด้วยเมทธิล แอลกอฮอล์ 3-4 ครั้ง นำมาตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

บทที่ 3

ผล

1. การชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

การวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของลำต้นเป็นเวลา 40 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดสูงสุดเฉลี่ย 2.8 ยอดต่อข้อ อย่างไรก็ตามยอดดังกล่าวมีขนาดเล็ก และสร้างแคลลัสบริเวณฐานมาก เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้ว่าสามารถชักนำยอดได้น้อยกว่า (2.2 ยอดต่อข้อ) แต่ยอดยืดยาว และมีแคลลัสเกิดขึ้นน้อยกว่า (ตารางที่ 2) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวในการย้ายเลี้ยงต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของนมตำเลียบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 40 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช		จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วน (เฉลี่ย)	ลักษณะอื่นๆ
BA (มก/ล)	NAA (มก/ล)		
1	0.5	1.0 (0-3)[1]	มีแคลลัสบริเวณฐานเล็กน้อย
1	1	0.7 (0-2)	มีรากเกิดขึ้น เฉลี่ย 1.7 ราก
1	2	0.2 (0-1)	มีแคลลัสบริเวณฐานเล็กน้อย
1	3	0.7 (0-2)	มีรากเกิดขึ้น เฉลี่ย 0.7 ราก
1	4	0.4 (0-2)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
2.5	0.5	2.8 (2-3)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
2.5	1	1.0 (0-3)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
2.5	2	1.1 (0-3)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
2.5	3	1.8 (1-2)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
2.5	4	0.2 (0-4)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
5	0.5	2.2 (1-4)	มีแคลลัสบริเวณฐานเล็กน้อย
5	1	0.9 (0-4)	มีแคลลัสบริเวณฐานเล็กน้อย
5	2	0.2 (0-1)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
5	3	0.2 (0-1)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก
5	4	1.3 (0-3)	มีแคลลัสบริเวณฐานมาก

[1] จำนวนยอดต่ำสุด-สูงสุด

2. การเพิ่มความแข็งแรงยอดและการชักนำราก

เมื่อย้ายยอดไปเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงเป็นเวลา 40 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงยอดบนไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และอาหารสูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ลำต้นแข็งแรง ใบมีขนาดใหญ่กว่าประมาณ 2 เท่า สีเขียวเข้ม ลำต้นขนาดใหญ่กว่า สร้างแคลลัสบริเวณฐานน้อย มีการสร้างรากที่มีจำนวนและความยาวมากกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า มีจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนข้อ และจำนวนใบมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ลักษณะของยอดนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ หลังเพาะเลี้ยง 40 วัน

ก. ไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์

ข. MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ค. MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์

ง. MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การชักนำแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชัน

3.1 การชักนำแคลลัส

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ และก้านใบ ของนมตำเลียบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมเนื่องจากสามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุดจากทั้งสองชิ้นส่วน และแคลลัสมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์สีเหลืองที่ยึดติดอย่างหลวมๆ เมื่อทดลองซ้ำโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และลำต้นของนมตำเลียบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 4 เป็นเวลา 50 วัน พบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากทุกชิ้นส่วนและทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสได้สูงสุด 0.10 กรัมต่อชิ้นส่วน การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบในอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้สูงสุด 0.31 กรัมต่อชิ้นส่วน และการเพาะเลี้ยงชิ้นลำต้นในอาหารเติม BA 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้สูงสุด 0.34 กรัมต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ก้านใบ และลำต้น บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช		น้ำหนักแคลลัส (กรัมต่อชิ้นส่วน)		
BA (มก/ล)	NAA (มก/ล)	ใบ	ก้านใบ	ลำต้น
3	3	0.09	0.21 bc	0.24 b
3	4	0.09	0.21 bc	0.24 b
3	5	0.07	0.18 c	0.25 b
5	3	0.08	0.31 a	0.24 b
5	4	0.10	0.17 c	0.25 b
5	5	0.08	0.30 ab	0.19 b
7	3	0.08	0.15 c	0.20 b
7	4	0.08	0.17 c	0.34 a
7	5	0.07	0.18 c	0.16 b
F-test		ns	*	*
C.V. (%)		20.9	51.5	41.0

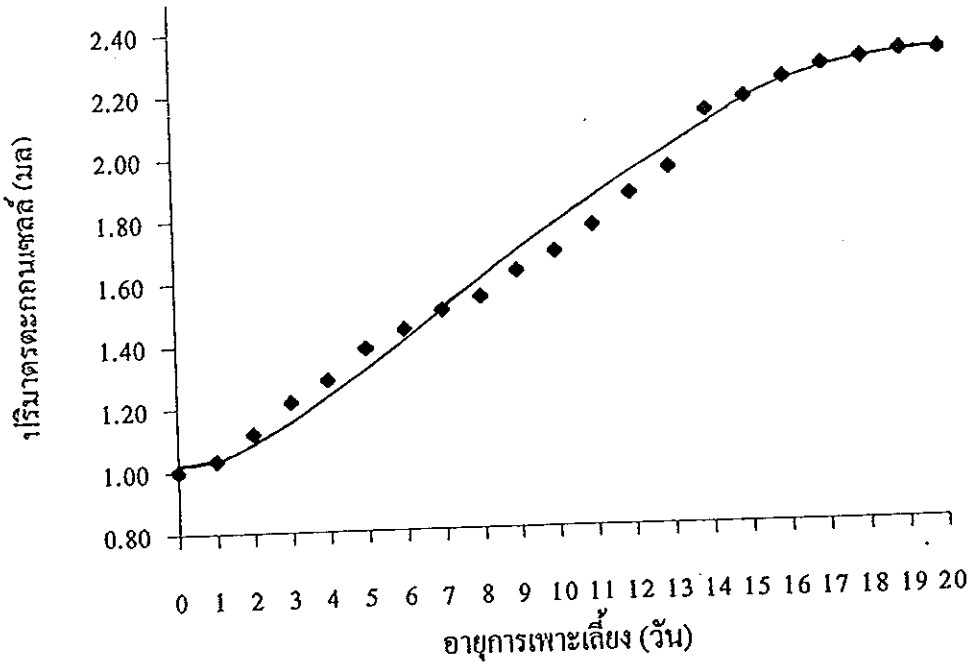
* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของแคลลัสในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

3.2 การชักนำเซลล์ซัสเพนชัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เจริญเป็นก้อนสีเหลืองปนเขียว เมื่อวางเลี้ยงนานขึ้น กลุ่มเซลล์ขยายขนาดใหญ่และจับเป็นก้อนแข็งมีสีเขียวเข้ม อย่างไรก็ตาม ที่ระดับ BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์เกาะกลุ่มอย่างหลวมๆ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวในการศึกษาอื่นๆ ต่อไป การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในทุกๆ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าไม่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เกิดขึ้น

เมื่อย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในช่วง 0-2 วัน เซลล์มีอัตราการเจริญอย่างช้าๆ (lag phase) แล้วเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-14 วัน (log phase) หลังจากนั้นอัตราการเจริญค่อยลดลงจนหยุดการเจริญ (stationary phase) (ภาพที่ 3) ตะกอนเซลล์มีสีเหลืองปนเขียวและเกาะกลุ่มอย่างหลวมๆ



ภาพที่ 3 อัตราการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันของนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การชักนำพืชต้นใหม่

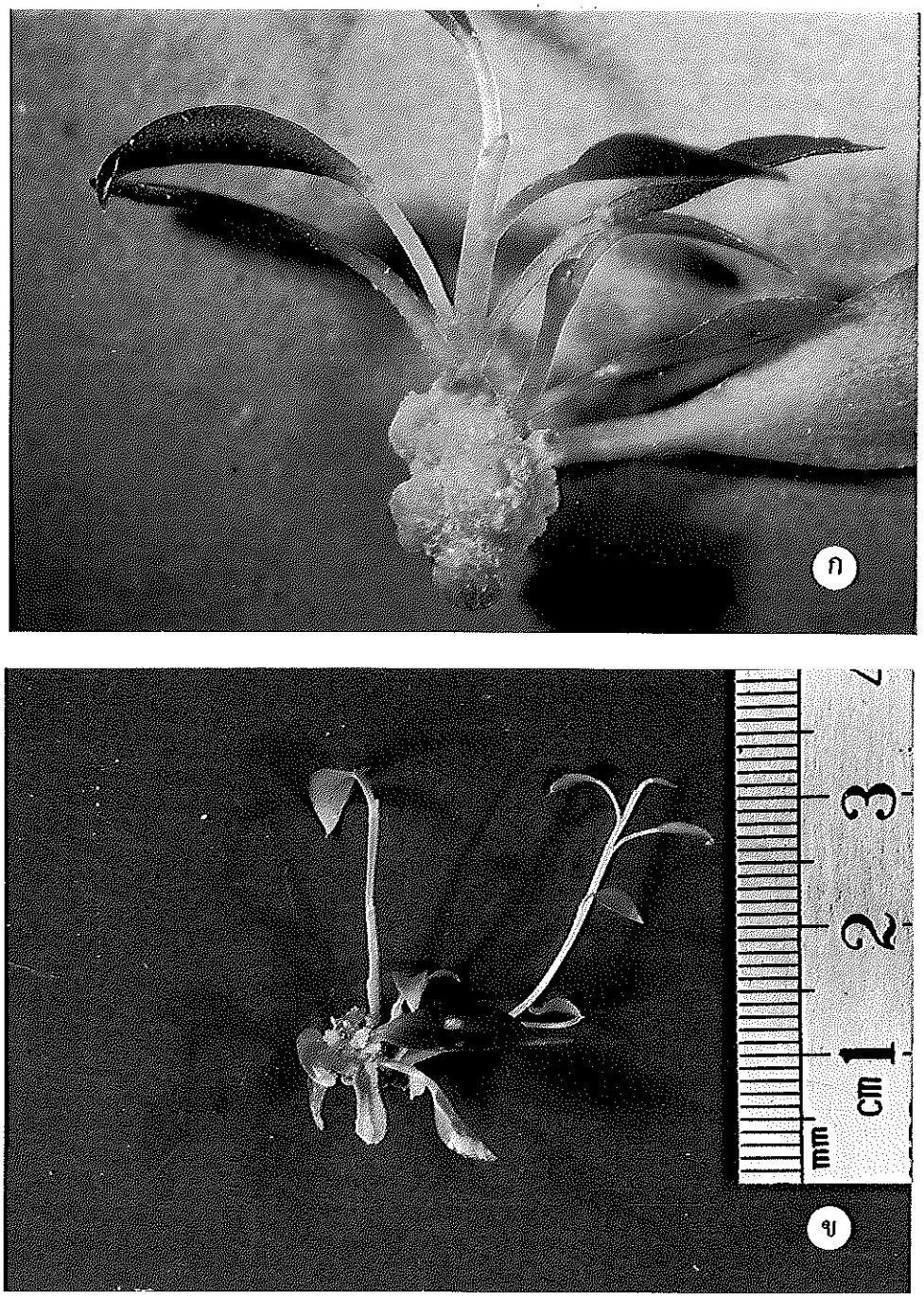
การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS เติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ทุกความเข้มข้น ในขณะที่การเติม TDZ และ KN สามารถชักนำได้เพียงบางระดับความเข้มข้นเท่านั้น การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารเติม BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ภายใน 2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง ยอดใหม่สร้างขึ้นเกิดบริเวณก้านใบ (ภาพที่ 4ก และ 4ข) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 30 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารเติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดสูงสุด 56.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA 6 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด 43.8 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 0.8 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 4) ดังนั้นการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบที่เหมาะสม คือ เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบในอาหารเติม BA 2-6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าไม่สามารถชักนำยอดได้แต่ส่งเสริมการสร้างแคลลัสบริเวณบาดแผลของก้านใบ

การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสที่ชักนำจากใบ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับการชักนำพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบข้างต้น ไม่สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้ (ไม่แสดงข้อมูล)

ตารางที่ 4 การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS เติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน

ไซโตไคนิน (มก/ล)			เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด	การสร้างยอด		ลักษณะอื่นๆ
BA	TDZ	KN		จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วน	ความยาว (ซม)	
-	-	-	0	0	-	สร้างรากบริเวณก้านใบ
2	-	-	37.5	0.8 (0-3)[1]	1.3	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
4	-	-	56.3	0.8 (0-3)	1.5	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
6	-	-	43.8	0.4 (0-1)	0.6	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
8	-	-	25.0	0.4 (0-3)	0.3	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
10	-	-	25.0	0.3 (0-1)	1.1	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
-	2	-	8.3	0.1 (0-1)	0.5	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
-	4	-	0	0	-	สร้างแคลลัสบริเวณก้านใบ
-	6	-	0	0	-	สร้างแคลลัสบริเวณก้านใบ
-	8	-	0	0	-	สร้างแคลลัสบริเวณก้านใบ
-	10	-	0	0	-	สร้างแคลลัสบริเวณก้านใบ
-	-	2	6.3	0.1 (0-1)	0.5	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
-	-	4	12.5	0.1 (0-1)	0.4	สร้างยอดบริเวณก้านใบ
-	-	6	8.3	0.1 (0-1)	0.3	สร้างรากบริเวณก้านใบ
-	-	8	0	0	-	สร้างแคลลัส สีเหลือง
-	-	10	0	0	-	สร้างแคลลัส สีเหลือง

[1] จำนวนยอดต่ำสุด-สูงสุด



ภาพที่ 4 การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของนมตำเลีย

ก. ยอดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

ข. ยอดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน

5. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

5.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ กัน ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ และอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 3.79×10^{6} โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 90.87 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอสเป็น 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ลดลง ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์ อาร์-10 จาก 0.5 เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นมากขึ้นพบว่ามีผลให้ความมีชีวิตลดลง (ตารางที่ 5) พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังเพาะเลี้ยง 14 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และแตกหน่อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม โปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 6.33 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมจากตารางที่ 5 กับเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (เอนไซม์ทั้งสองชนิดใช้ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์) พบว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรโตพลาสต์ได้ต่ำสุด ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทั้ง 2 ชนิด ทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่การใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 สามารถแยกโปรโตพลาสต์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกโปรโตพลาสต์ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลีย และพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)		จำนวนโปรโตพลาสต์ / กรัมน้ำหนักสด	ความมีชีวิต (%)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%)[1]	
CRS	MR-10			การแบ่งเซลล์[2]	การแตกหน่อ
0.5	0.5	1.52×10^{6}	93.44	3.12	3.05
1.0	0.5	2.93×10^{6}	93.75	2.11	1.35
1.5	0.5	2.16×10^{6}	91.66	4.77	0.95
2.0	0.5	2.04×10^{6}	91.13	6.33	1.26
0.5	1.0	1.93×10^{6}	92.35	2.87	6.56
1.0	1.0	3.79×10^{6}	90.87	4.75	1.95
1.5	1.0	2.84×10^{6}	90.30	4.08	2.81
2.0	1.0	3.41×10^{6}	88.12	0.77	2.77
F-test		ns	ns	ns	ns
C.V. (%)		46.6	1.6	51.5	80.8

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

[1] เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 2.5×10^{5} โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

[2] การแบ่งเซลล์ครั้งแรกและกลุ่มเซลล์

CRS : เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส

MR-10 : มาเซอโรไซม์ อาร-10

ตารางที่ 6 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลีย และพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ชนิดและความเข้มข้นเอนไซม์	จำนวนโปรโตพลาสต์ / กรัมน้ำหนักสด	ความมีชีวิต (%)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%)[1]	
			การแบ่งเซลล์[2]	การแตกหน่อ
CRS 1 % MR-10 1 %	2.53×10^{6} a	91.87	4.75	1.95
CR-10 1 % MR-10 1 %	1.04×10^{6} b	92.11	-	-
CR-10 2 % MR-10 1 %	2.22×10^{6} ab	93.72	4.93	1.94
CR-10 3 % MR-10 1 %	2.88×10^{6} a	92.00	1.56	2.45
F-test	*	ns	-	-
C.V. (%)	30.7	2.1	-	-

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

- : ไม่บันทึกและไม่วิเคราะห์ผลการทดลอง

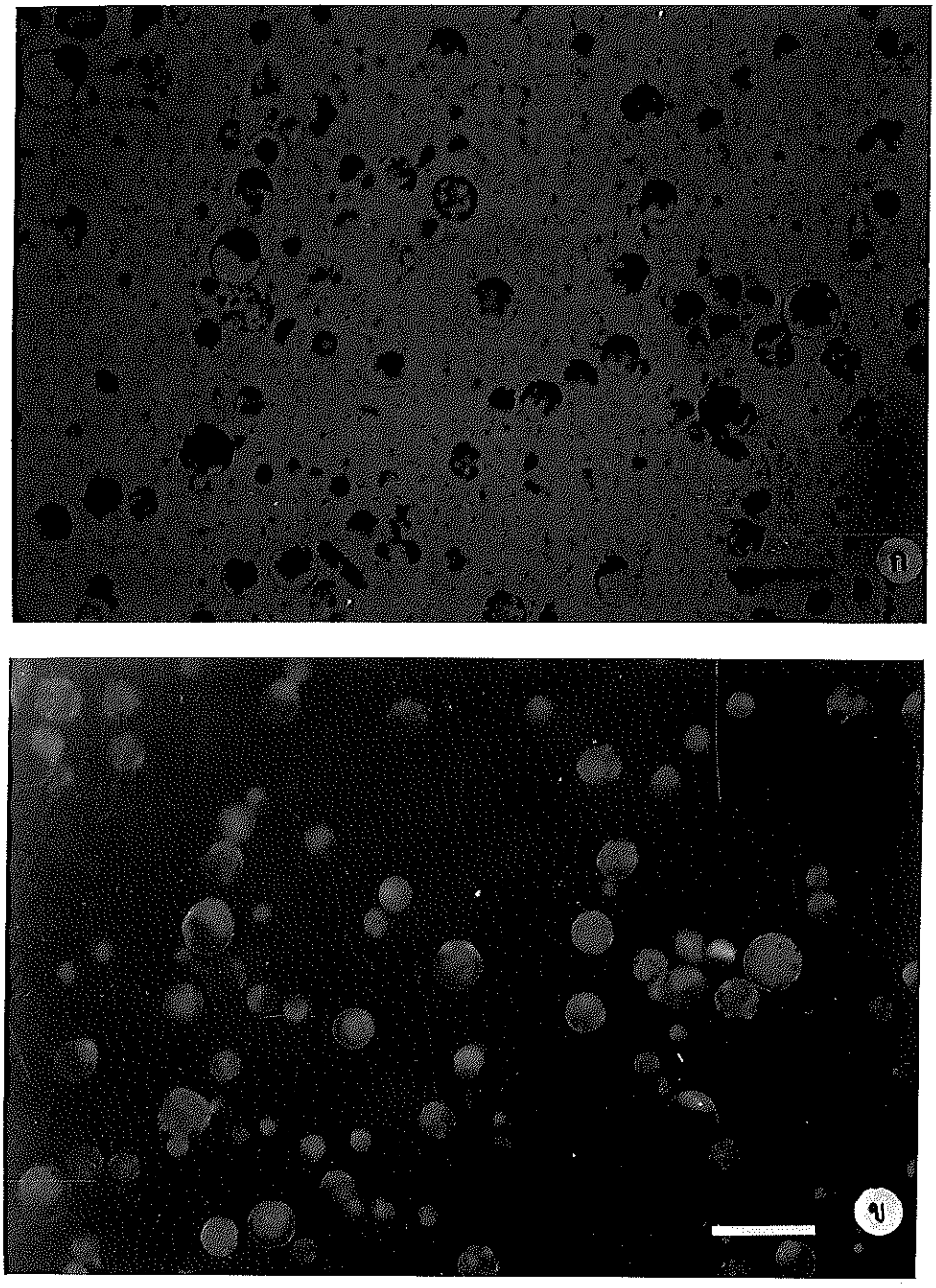
[1] เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 2.5×10^{5} โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

[2] การแบ่งเซลล์ครั้งแรกและกลุ่มเซลล์

CRS : เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส

CR-10 : เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10

MR-10 : มาเซอโรไซม์ อาร์-10



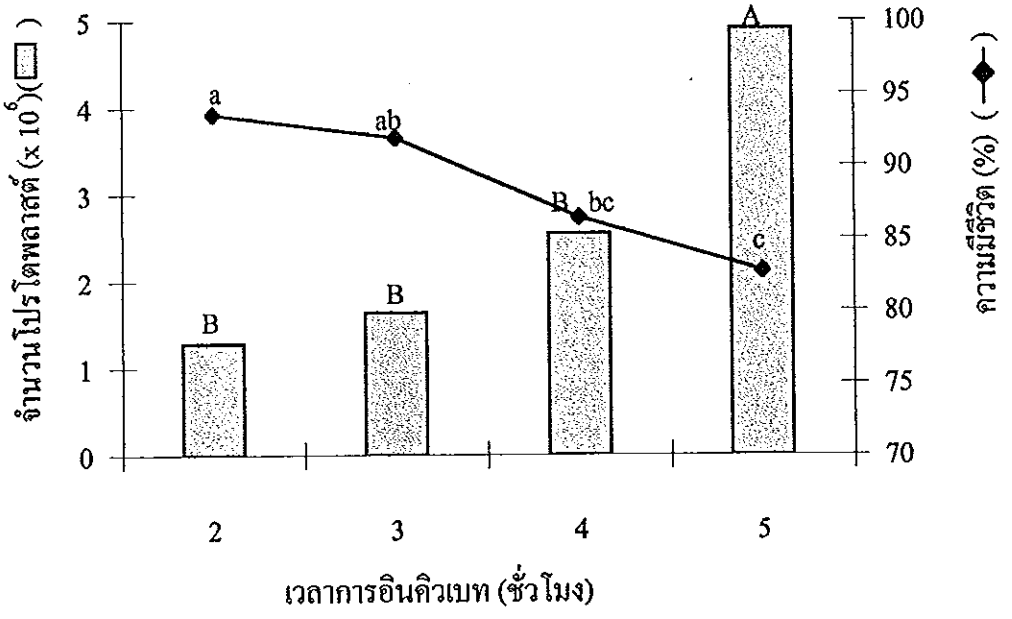
ภาพที่ 5 โปรโตพลาสต์จากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อของนมตำเลีย โดยใช้สารละลายเอนไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ก. ดูภายใต้แสงธรรมดา (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)

ข. ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเรืองแสงสีเขียวเหลือง (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)

5.2 การศึกษาระยะเวลาในการอินคิวเบท

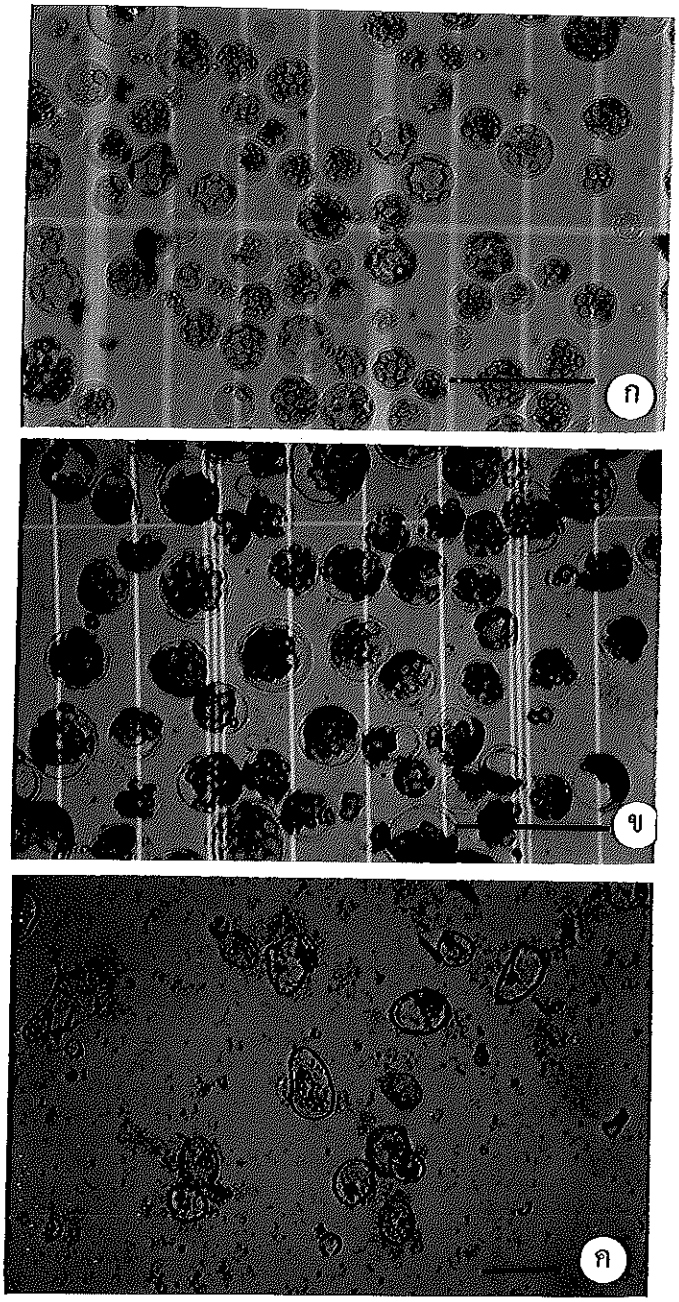
การแยกโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาในการอินคิวเบทมีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การอินคิวเบทเป็นระยะเวลานานสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากขึ้น โดยการทดลองนี้พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 4.91×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่ออินคิวเบทเป็นเวลา 5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงเมื่ออินคิวเบทเป็นระยะเวลานานขึ้น การทดลองนี้พบว่าความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด 93.53 และ 91.91 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออินคิวเบทเป็นระยะ 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาอินคิวเบทเป็น 4 และ 5 ชั่วโมง (ภาพที่ 6) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการอินคิวเบทคือ 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ผลของระยะเวลาการอินคิวเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของนมตำเลีย [ค่าเฉลี่ยจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT ($P \leq 0.05$)]

5.3 การศึกษาแหล่งของชิ้นส่วนพืช

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้ พบว่ามีรูปร่างลักษณะทั่วไปแตกต่างกันไปตามแหล่งของชิ้นส่วนพืช โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีรูปร่างกลม เต่ง และมีความสม่ำเสมอ มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 50 ไมโครเมตร (ภาพที่ 7ก) โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองมีลักษณะกลม เต่ง มีขนาดใหญ่ เฉลี่ยประมาณ 60 ไมโครเมตร เม็ดคลอโรพลาสต์มีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจนและมีปริมาณมากกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 7ข) อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ที่แยกได้แตกเป็นจำนวนมาก ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันพบว่า เซลล์ส่วนใหญ่แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่ยังคงมีผนังเซลล์ห่อหุ้มอยู่ มีลักษณะเป็นรูปยาวรี หรือเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า (ภาพที่ 7ค) การทดลองนี้พบว่าแหล่งของโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุดจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ 1.79×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลอง และเซลล์ซัสเพนชัน ซึ่งสามารถแยกได้ 4.40×10^5 และ 0.67×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 95.99 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้ความมีชีวิต 92.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองมีความมีชีวิตเพียง 81.70 เปอร์เซ็นต์ พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ภายหลังเพาะเลี้ยง 14 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถแบ่งเซลล์ได้ 4.93 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ซัสเพนชันสามารถแบ่งเซลล์ได้ 2.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองพบว่าโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างบิดเบี้ยว และแตกซึ่งสามารถสังเกตได้จากเม็ดคลอโรพลาสต์ที่ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงเป็นกลุ่มๆ โดยไม่มีผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้ม (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 7 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแหล่งชิ้นส่วนต่างๆ ของนมตำเลีย ที่แยกด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ และอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ก. โปรโตพลาสต์จากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)

ข. โปรโตพลาสต์จากใบที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลอง (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)

ค. โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชัน (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อจำนวน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์นมตำเลียหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (แยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.5 โมลาร์)

แหล่งชิ้นส่วนพืช	จำนวนโปรโตพลาสต์ / กรัมน้ำหนักสด	ความมีชีวิต (%)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%)[1]	
			การแบ่งเซลล์[2]	การแตกหน่อ
ใบในสภาพปลอดเชื้อ	1.79×10^{6} a	92.22 a	4.93	1.94
ใบนอกหลอดทดลอง	4.40×10^{5} b	81.70 b	0	0
เซลล์ชัสเพนชัน	0.67×10^{4} b	95.99 a	2.67	0
F-test	*	*	-	-
C.V. (%)	29.2	3.4	-	-

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P\leq0.05$)

ค่าเฉลี่ยจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

- ไม่วิเคราะห์ผลการทดลอง

[1] เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 2.5×10^{5} โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

[2] การแบ่งเซลล์ครั้งแรกและกลุ่มเซลล์

5.4 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อของนมตำเลียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงต่างๆ กัน พบว่า ทุกวิธีส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยง 3-5 วัน (ภาพที่ 9) การเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวนนั้น พบว่า โปรโตพลาสต์ที่อยู่บริเวณขอบของหยดสารละลายแตกภายหลังการเพาะเลี้ยง 3-5 วัน ส่วนโปรโตพลาสต์ที่อยู่บริเวณกลางหยดสามารถแบ่งเซลล์ได้ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวส่งผลให้โปรโตพลาสต์ขยายขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงโดยวิธีอื่นๆ และมีผลให้โปรโตพลาสต์จับตัวและตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองนี้พบว่า การฝังเลี้ยงในอาหารเติมอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ ให้

การแบ่งโปรโตพลาสต์สูงสุด (10.95 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือการฝังเลี้ยงในอาหารเติมอากาโรส 0.2 เปอร์เซ็นต์ (9.81 เปอร์เซ็นต์) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (8.54 เปอร์เซ็นต์) และการฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งเติมไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ (8.19 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวนให้การแบ่งโปรโตพลาสต์ต่ำสุด (0.42 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามการฝังเลี้ยงด้วยอากาโรส 0.2 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวน พบว่ามีพัฒนาการแบบแตกหน่อสูง (5.41, 4.39 และ 4.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่การฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งเติม ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีผลให้โปรโตพลาสต์แตกหน่อเพียงเล็กน้อย (1.88 และ 1.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ตารางที่ 8) ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ การวิธีฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งเติมไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลียหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%)[1]	
	การแบ่งเซลล์[2]	การแตกหน่อ
อาหารเหลว	8.54 a	1.23 b
แบบหยดแขวน	0.42 b	4.78 a
แบบฝังเลี้ยง		
ไฟต้าเจล 0.2 %	8.19 a	1.88 b
อากาโรส 0.2 %	9.81 a	5.41 a
อากาโรส 0.6 %	10. 95 a	4.39 a
F-test	*	*
C.V. (%)	52.3	37.4

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยการแบ่งเซลล์และการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

[1] เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 2.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

[2] การแบ่งเซลล์ครั้งแรกและกลุ่มเซลล์

5.5 การศึกษาความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยความหนาแน่น 4 ระดับ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์สูงสุด ซึ่งแตกต่างกับความหนาแน่นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเพิ่มขึ้น พบว่าโปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ลดลง และมีพัฒนาการแบบแตกหน่อสูงขึ้น (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลของความหนาแน่นต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบของนมตำเลียหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร)	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์(%)[1]	
	การแบ่งเซลล์[2]	การแตกหน่อ
5.0×10^4	6.52 b	2.78 b
1.0×10^5	11.83 a	7.29 a
2.5×10^5	6.83 b	6.60 a
5.0×10^5	8.30 ab	7.89 a
F-test	*	*
C.V. (%)	31.0	38.5

* : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

ค่าเฉลี่ยการแบ่งเซลล์และการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

[1] เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์

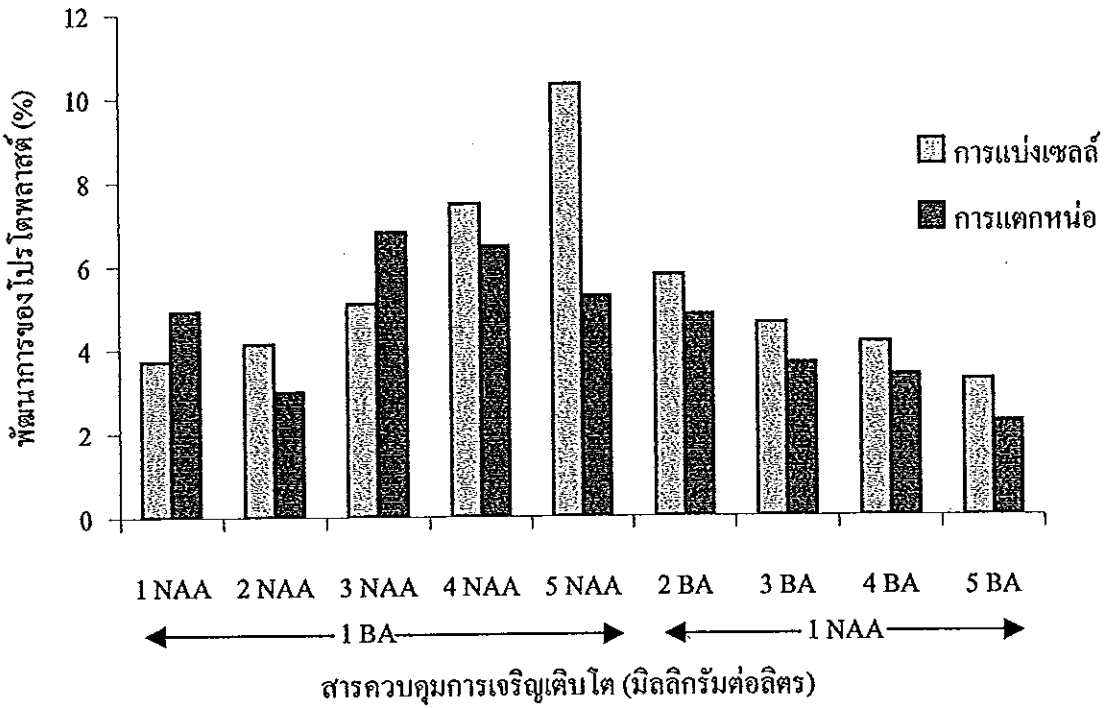
[2] การแบ่งเซลล์ครั้งแรกและกลุ่มเซลล์

5.6 การศึกษาผลของ BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

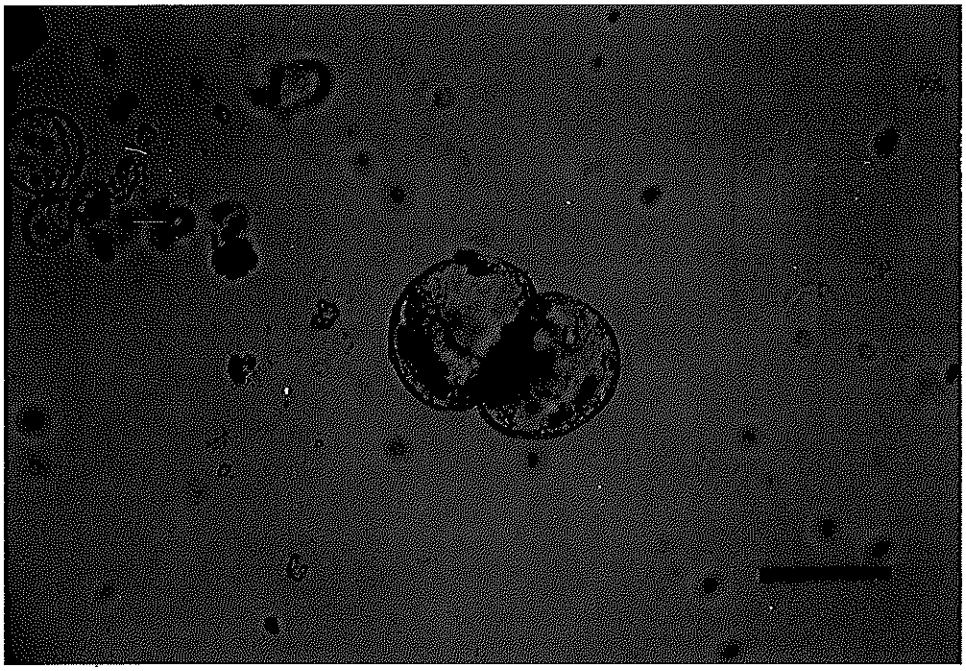
การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 2.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติมไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า โปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์ได้ภายหลังเพาะเลี้ยง 3-5 วัน ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม โปรโตพลาสต์มีการแตกหน่อ

ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 10) จากภาพที่ 8 พบว่าอาหารเติม NAA ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ให้สูงขึ้น ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของ BA จาก1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลดลง การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 10.34 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ต่ำด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 8)

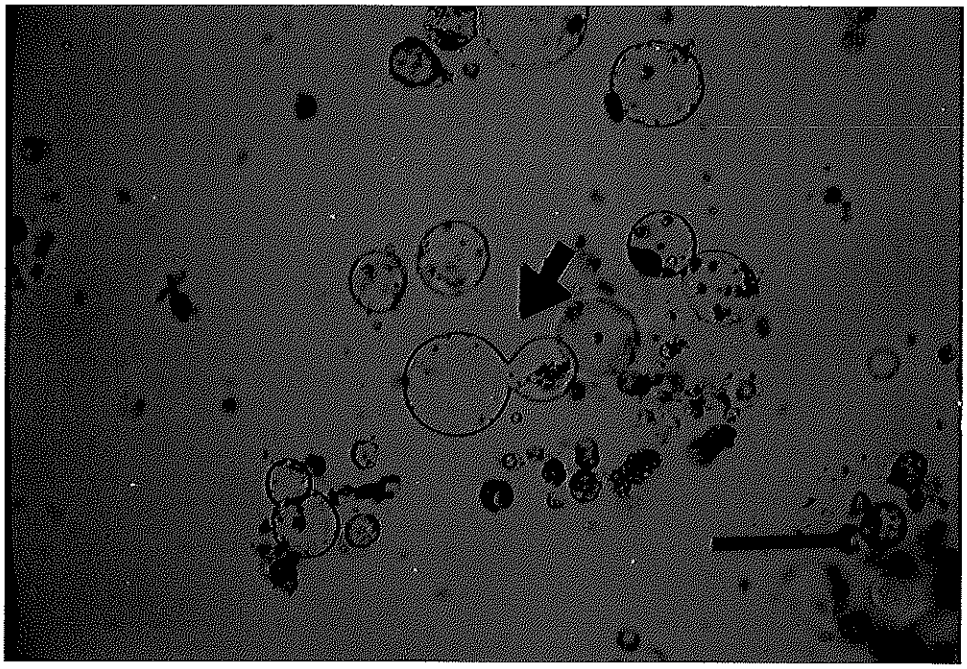
โปรโตพลาสต์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยง 3-5 วัน และเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ขนาด 4-10 เซลล์ ภายหลังเพาะเลี้ยง 10 วัน (ภาพที่ 11) และเจริญเป็นแคลลัสขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (ประมาณ 1 มิลลิเมตร) ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (ภาพที่ 12) ประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์สุดท้าย (final plating efficiency) 0.029 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส และชักนำเซลล์ซัสเพนชัน พบว่าแคลลัสมีปริมาณมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ได้



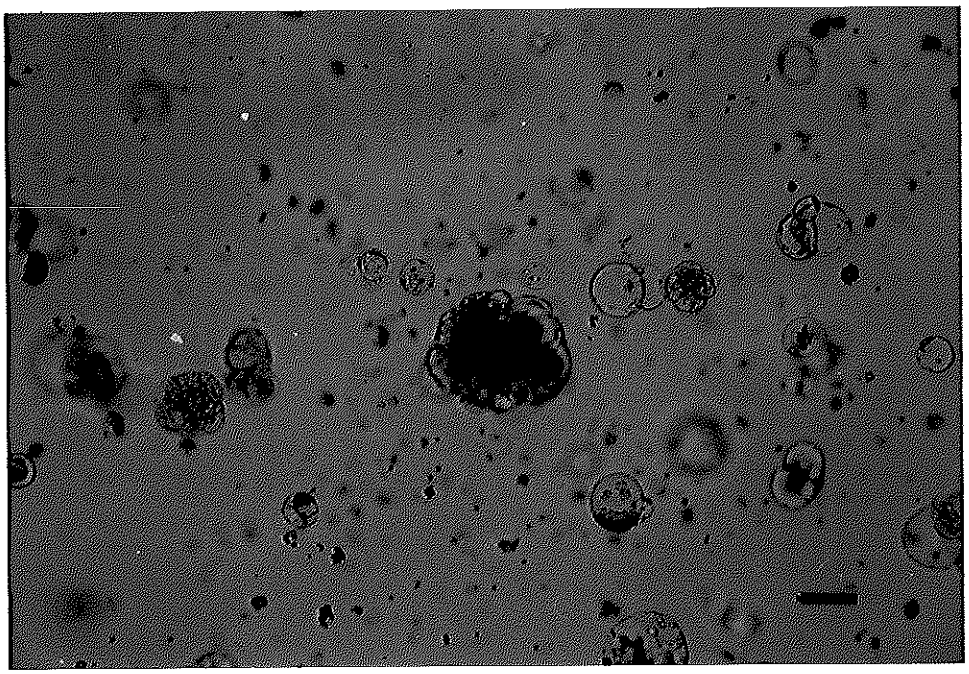
ภาพที่ 8 ผลของ BA และ NAA ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 14 วัน



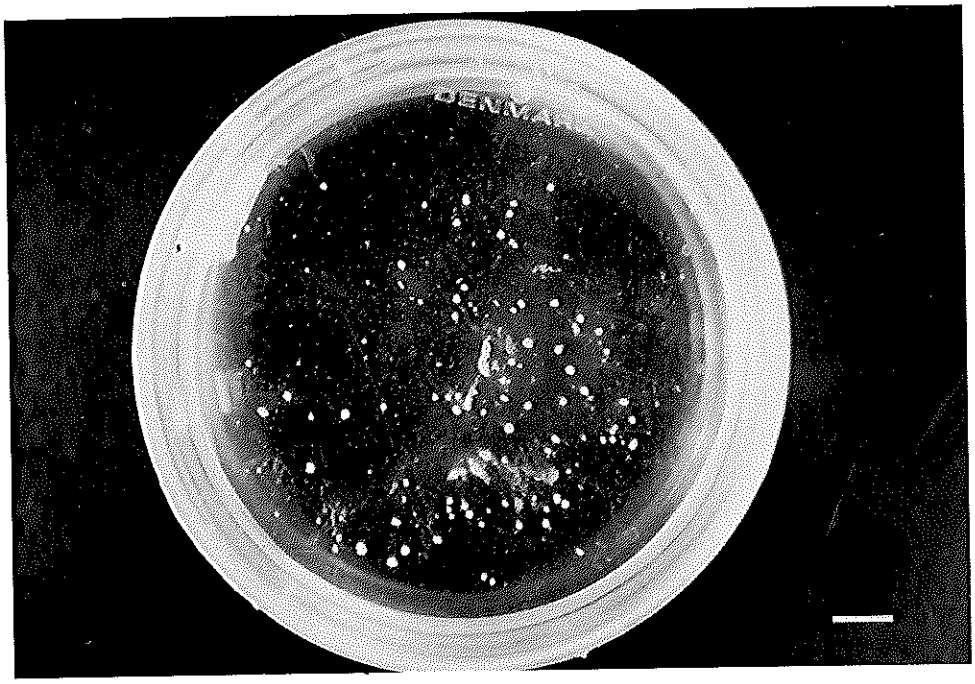
ภาพที่ 9 การแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 10 การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย (ศรชี้) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 11 โคโลนีขนาดเล็กที่พัฒนาจากโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในอาหารในอาหาร กึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน (บาร์ = 100 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 12 แคลลัสขนาดเล็กที่พัฒนาจากโปรโตพลาสต์นมตำเลีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน (บาร์ = 5 มิลลิเมตร)

6. การปลูกถ่ายยีน

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคานามัยซินต่อการเจริญของแคลลัส

การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบของนมตำเลียในอาหารชักนำแคลลัสเติมคานามัยซินเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ความเข้มข้นของคานามัยซินต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์คือ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 10) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้คานามัยซินเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนต้านทานต่อคานามัยซิน

ตารางที่ 10 ผลของสารปฏิชีวนะคานามันซินความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของแคลลัสนมตำเลีย

คานามัยซิน เข้มข้น (มก/ล)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
การเจริญของแคลลัส[1]	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	-	-

[1] เลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกผลหลังเพาะเลี้ยง 14 วัน

- แคลลัสตาย
+ แคลลัสสีเขียวเหลือง และมีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายเป็นส่วนใหญ่
++ แคลลัสสีเขียวเหลือง และมีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายอัตราส่วน 1:1
+++ แคลลัสสีเขียวเหลือง และมีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายเล็กน้อย
++++ แคลลัสสีเขียวเหลือง และสามารถเจริญอย่างปกติ

6.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารไบอะลาฟอสต่อการเจริญของแคลลัส

การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบของนมตำเลียในอาหารชักนำแคลลัสเติมสารไบอะลาฟอสเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ความเข้มข้นของสารไบอะลาฟอสต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์คือ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 11) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารไบอะลาฟอสเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pARK 5 ซึ่งมียีน *bar* ที่ต้านทานต่อสารดังกล่าว

ตารางที่ 11 ผลของสารไบอะลาฟอสความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของแคลลัสนมตำเลีย

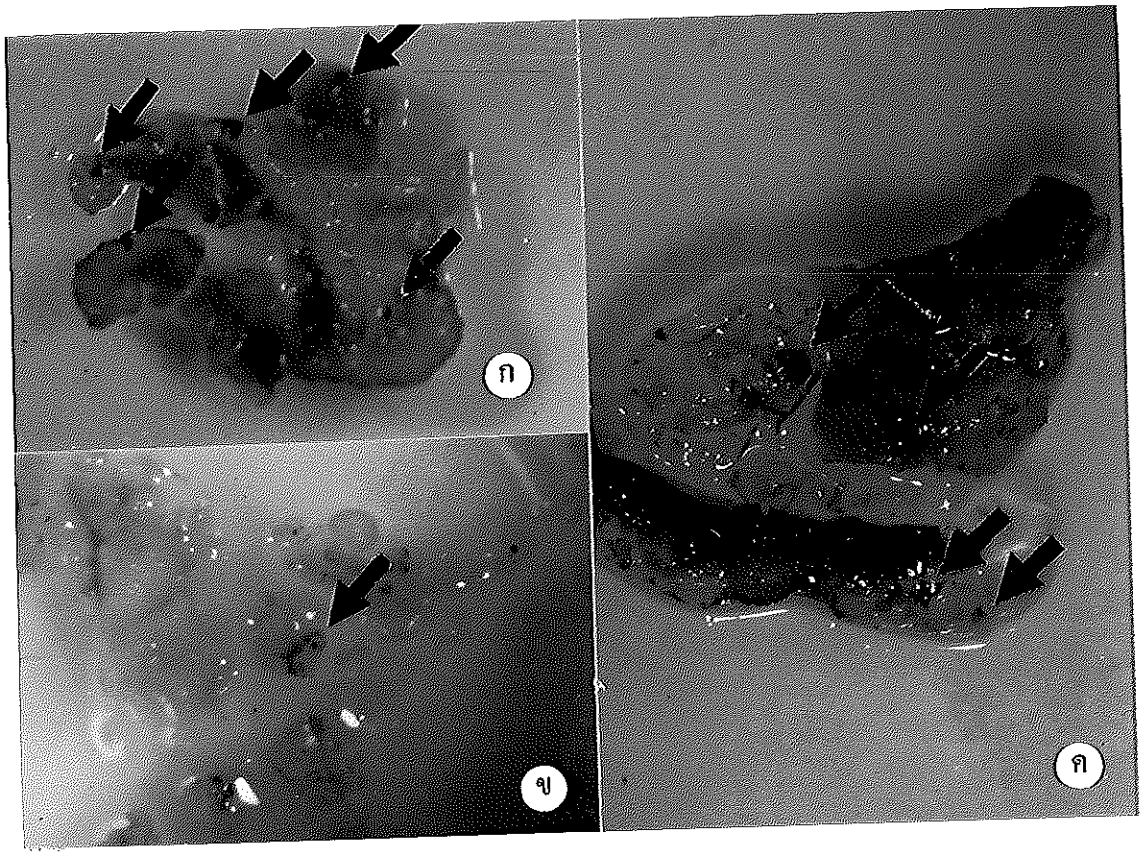
ไบอะลาฟอสเข้มข้น (มก/ล)	0	0.5	1	2	4	6	8	10	15	20
การเจริญของแคลลัส[1]	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-

[1] เลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกผลหลังเพาะเลี้ยง 14 วัน

- แคลลัสตาย
+ แคลลัสสีเขียวเหลือง และมีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายเป็นส่วนใหญ่
++ แคลลัสสีเขียวเหลือง และมีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายอัตราส่วน 1:1
+++ แคลลัสสีเขียวเหลือง และมีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลและตายเล็กน้อย
++++ แคลลัสสีเขียวเหลือง และสามารถเจริญอย่างปกติ

6.3 การศึกษาสายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียมต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน

การตรวจสอบเนื้อเยื่อเดมีจากกิจกรรมของ GUS ภายหลังการปลูกถ่ายยีน 24 วัน พบว่าอะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด 94.4 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนจุดสีน้ำเงิน 6.8 จุดต่อตัวอย่าง (ภาพที่ 13ก) รองลงมาคือสายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pIG121 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน 77.8 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนจุดสีน้ำเงิน 5.2 จุดต่อตัวอย่าง (ภาพที่ 13ค) และสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน 9.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยจำนวนจุดสีน้ำเงิน 1 จุดต่อตัวอย่าง (ภาพที่ 13ข) ส่วนชุดควบคุมพบว่าไม่มีกิจกรรมของ GUS เกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อนำแคลลัสไปย้ายเลี้ยงในอาหารที่เติมคานามัยซิน 90 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสส่วนใหญ่ตาย และไม่สามารถชักนำแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนให้พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สำเร็จ ส่วนการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pARK 5 และทำการคัดเลือกโดยการย้ายเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสที่เติมสารไบอะลาฟอส 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซิน 90 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสส่วนใหญ่ตายและไม่สามารถคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนได้



ภาพที่ 13 การตรวจสอบเนื้อเยื่อเคมีจากกิจกรรมของ GUS (blue spot) (ศรชี้) ของชิ้นส่วนใบที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนและด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ

ก. สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233

ข. สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121

ค. สายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pGI21

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

การชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของลำต้นในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 2.8 ยอดต่อชิ้นส่วน อย่างไรก็ตาม ยอดมีการยืดยาวต่ำ และสร้างแคลลัสบริเวณฐาน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างยอด 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ยอดมีความยาวมากกว่า และสร้างแคลลัสบริเวณฐานเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้นของ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของลำต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อนมตำเลียสูงขึ้น และมีการสร้างแคลลัสบริเวณฐานลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA สูงกว่า NAA 3-8 เท่า สอดคล้องกับรายงานการทดลองหลายๆ รายงาน ซึ่งพบว่าการใช้อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ไซโตไคนินสูงกว่าออกซินเพื่อการชักนำยอด (Al-Juboory *et al.*, 1991; Mohamed *et al.*, 1995; Patnaik and Debata, 1996; Phillips and Hubstenberger, 1985; Sharma and Chandel, 1992) ทั้งนี้เนื่องจากไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงมีผลต่อการสร้างยอด (อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541; Bhojwani and Razdan, 1983) อย่างไรก็ตามภายหลังการเพิ่มปริมาณยอดในอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ติดต่อกันเป็นระยะเวลามากกว่า 1 ปี พบว่ายอดมีลักษณะอ่อนแอลง มีขนาดเล็ก ใบแสดงอาการอวบน้ำ หรือเรียกว่าใบแก้ว มีขนาดเล็กสีเขียวอ่อน แม้ว่าจะมีการสร้างรากได้ก็ตาม แต่เมื่อย้ายปลูกมักตายในที่สุด สาเหตุเนื่องจากพืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน และเกิดจากระดับของแรงดันออสโมติกของอาหาร (Vandemoortele, 1999) ดังนั้นแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือ การย้ายเลี้ยงยอดในอาหารที่ไม่เติมหรือลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลง หรือการนำไปแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสหรือแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากการทดลองนี้พบว่า การย้ายเลี้ยงยอดของนมตำเลียในไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และอาหารสูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ใบมีขนาดใหญ่และเขียวเข้ม ลำต้นแข็งแรง สร้างรากที่แข็งแรง ไม่สร้างแคลลัสบริเวณฐาน และไม่สร้างยอดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสูตร MS เติม

ไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีใบขนาดเล็ก สร้างยอดเพิ่มขึ้น และมีแคลลัสบริเวณฐานมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีผลส่งเสริมการสร้างแคลลัส และส่งเสริมการเจริญด้านกิ่งก้านทำให้มีการแตกยอดเพิ่มขึ้น ใบมีขนาดเล็กและไม่แข็งแรง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Phillips และ Hubstenberger (1985) ซึ่งรายงานการเพิ่มความยืดยาวของยอดและชักนำรากในอาหารที่ลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลง Marcotrigiano และคณะ (1996) ชักนำให้ยอด American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) ยืดยาวโดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร Anderson ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังนั้นการย้ายเลี้ยงยอดในไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ หรือ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรือ อาหารสูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีเพิ่มความแข็งแรงของต้นพืช และได้ต้นกล้าที่มีระบบรากที่สมบูรณ์พร้อมแก่การย้ายปลูกต่อไป

2. การชักนำแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชัน

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน ใบ ก้านใบ และลำต้นของนมตำเลีย พบว่าทุกชิ้นส่วนสามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนลำต้นและก้านใบให้ปริมาณแคลลัสสูงกว่าใบ ในขณะที่ Rout และคณะ (1999) พบว่าชิ้นส่วนใบของ *Plumbago zeylanica* มีความเหมาะสมในการชักนำแคลลัสมากกว่าลำต้น ส่วน Zafar และคณะ (1995) พบว่าเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ *Medicago littoralis* สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด ทั้งนี้เพราะในแต่ละชิ้นส่วนมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะของต่อชิ้นส่วนลำต้นคือ BA 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับชิ้นส่วนก้านใบคือ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับชิ้นส่วนใบคือ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองสังเกตได้ว่าสัดส่วนของไคโตไคนินและออกซินในการชักนำแคลลัสในแต่ละชิ้นส่วนมีความใกล้เคียงกัน (1-2 เท่า) สอดคล้องกับ เชาวลิต บุญศรี (2542) รายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมแก่การชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบกล็อกซิเนีย คือ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Benmoussa และคณะ (1996) ชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงปล้องของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus densiflorus*) บนอาหารสูตร MS เติม BA 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ pCPA 5.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการสร้างแคลลัสสูงสุด ในขณะที่การเติม 2,4-D และ KN ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้น้อยกว่า เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ มีผลให้เซลล์เจริญเป็นก้อนสีเหลืองปนเขียว ในการเลี้ยงบางชุดในอาหารเติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ

NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์เกาะกลุ่มอย่างหลวมๆ เมื่อวางเลี้ยงนานขึ้น กลุ่มเซลล์ขยายขนาดใหญ่ และจับเป็นก้อนแข็งมีสีเขียวเข้ม มีรายงานผลความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันโดยใช้ 2,4-D (Arias-Castro *et al.*, 1993; Hoshino *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาการใช้ 2,4-D จึงไม่สามารถทราบลักษณะของเซลล์ซัสเพนชันได้ เมื่อศึกษาการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันพบว่ามีการเจริญแบบ sigmoid curve โดยในช่วง 0-2 วันแรก เซลล์มีอัตราการเจริญอย่างช้าๆ ในช่วงนี้เซลล์เตรียมเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์ หลังจากนั้นมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-14 วัน แล้วอัตราการเจริญค่อยๆ ลดลงและหยุดการแบ่งเซลล์ในที่สุด Arias-Castro (1993) รายงานว่าช่วงการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันของชะเอม (*Glycyrrhiza glabra*) อยู่ในช่วง 12 วัน นอกจากนี้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุ๊คโตสใน 2 วัน และน้ำตาลทั้งหมดจะถูกเซลล์ใช้เพื่อการเจริญจนหมดใน 12 วัน ดังนั้นเซลล์ใช้อาหารสะสมภายในเซลล์มีผลให้น้ำหนักแห้งลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงมากกว่า 12 วัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีผลยืดระยะการเจริญเป็น 21 วัน ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันของนมตำเลียในการศึกษานี้ใช้น้ำตาลซูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเวลาในการเปลี่ยนอาหารใหม่จึงนานกว่า 12 วัน เซลล์ซัสเพนชันของนมตำเลียสามารถเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่า ภายหลังการเพาะเลี้ยง 13 วัน ในขณะที่ Shimizu และคณะ (1997) รายงานว่าเซลล์ซัสเพนชันของ *Iris germanica* ใช้เวลา 1 สัปดาห์เพื่อเพิ่มจำนวนเป็น 2-3 เท่า ส่วน Arias-Castro (1993) พบว่าเซลล์ซัสเพนชันของชะเอม (*Glycyrrhiza glabra*) สามารถเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่า ภายหลังการเพาะเลี้ยง 3-4 วัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะเซลล์ซัสเพนชันของนมตำเลียมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ อาจมีผลให้เซลล์ที่อยู่ด้านในได้รับอาหารและอากาศน้อยกว่าเซลล์ที่ด้านนอก และมีผลให้อัตราการแบ่งเซลล์ต่ำกว่าเซลล์ซัสเพนชันที่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

3. การชักนำพืชต้นใหม่

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของนมตำเลียเป็นไปได้ดีในอาหารสูตร MS เติม BA เพียงอย่างเดียว ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้ TDZ และ KN ในขณะที่ เชาวลิต บุญศรี (2542) รายงานการชักนำยอดรวมของกล็อกซิเนียจากการวางเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมสูงสุด 98 ยอดต่อใบ ส่วน Kumar และคณะ (1998) รายงานว่าการใช้ BA 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชำยอดจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของ *Albizia procera* ได้สูงสุด อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนใบนมตำเลียในอาหารเติม BA (2-6 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่ำ (0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าไม่สามารถชักนำยอดได้ แต่สร้างแคลลัสมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเติม NAA มีผลทำให้เกิดความสูญเสียสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชระหว่างออกซินและไซโตไคนิน (Narasimhulu and Reddy, 1983) และอาจเป็นไปได้ว่าพืชบางชนิดมีการสร้างและสะสมออกซินภายใน (Bhojwani and Razdan, 1983) ดังนั้นในการชักนำยอดจากใบของนมตำเลียในการศึกษานี้จึงไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน อย่างไรก็ตาม Hammatt และ Grant (1998) ชักนำยอดจากใบเชอรี่พื้นเมือง (*Prunus avium*) แบล็คเชอรี่ (*Prunus serotina*) และพันธุ์ลูกผสม (*Prunus avium* × *Prunus sargentii*) พบว่าการชักนำยอดในอาหารสูตร WPM เติม TDZ ส่งเสริมการเกิดยอดมากกว่าการเติม BA Marcotrigiano และคณะ (1996) รายงานการชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงใบของ American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) พบว่าการเติม TDZ 10 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำยอดได้ Iapichino และคณะ (1992) ชักนำพืชต้นใหม่จากใบของ *Rhododendron* spp. พบว่าสามารถพัฒนาพืชต้นใหม่ได้เมื่อเพาะบนอาหารสูตร Anderson เติม IBA 4.9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2i-P 73.8 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาการสร้างยอดใหม่จากชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงเห็นว่าสร้างขึ้นบริเวณรอยตัดของก้านใบ สอดคล้องกับการทดลองของ Robichon และคณะ (1997) และ Iapichino และคณะ (1992) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสที่ชักนำจากใบได้ ในขณะที่ Rout และคณะ (1999) สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสของ *Plumbago zeylanica* ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 1.42 ไมโครโมลาร์ Ignacimuthu และคณะ (1999) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Eryngium foetidum* ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้โดยผ่านกระบวนการสร้างเอ็มบริโอ Remotti และ Loffler (1995) รายงานการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสที่เกาะตัวกันแน่นของแกลดิโอลัส เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ZEA 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดลองนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเติม KN เพียงอย่างเดียวและมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (2-10 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งผลให้แคลลัสเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด เช่นเดียวกับงานทดลองของ Narasimhulu และ Reddy (1983)

4. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

4.1 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของนมตำเลีย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอสจาก 0.5 ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้แยกโปรโตพลาสต์ได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ปริมาณและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ดังกล่าวมีกิจกรรมที่สูง และอาจมีเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และนิวคลิเอส ซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ เมื่อนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ด้วยความเข้มข้นสูงๆ ทำให้โปรโตพลาสต์แตกและสูญเสียความมีชีวิต ในการทดลองนี้พบว่า ความเข้มข้นของเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอสที่เหมาะสมคือ 1 เปอร์เซ็นต์ สมปอง เตชะโต (2530) แยกโปรโตพลาสต์จากใบถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นทำให้โปรโตพลาสต์ที่แยกได้ลดลง โดยทั่วไป เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ก็เพียงพอต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในพืชส้มจุก อย่างไรก็ตาม โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2453) รายงานว่าในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ต้องใช้ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของมาเซอโรไซม์ อาร์-10 จาก 0.5 เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้แยกโปรโตพลาสต์ได้มากขึ้นในทางตรงกันข้ามทำให้ความมีชีวิตลดลง วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา (2537) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาด้วยเอนไซม์มาเซอโรไซม์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 0.5 เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากขึ้น Grezes และคณะ (1994) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของกาแฟ (*Coffea arabica*) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาความเข้มข้นของมาเซอโรไซม์ อาร์-10 ในช่วง 0-1.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุดใกล้เคียงกันเมื่อใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.7-1.1 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองนี้สรุปได้ว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลียที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ก็เพียงพอต่อการแยกเซลล์ให้หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หากใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปก็ให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อย เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกโปรโตพลาสต์ระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ กับ เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพการแยกใกล้เคียงกับเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเซลลูเลส

โอโนซูกะ อาร์-10 ทั้ง 3 ความเข้มข้นให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สูงกว่าการใช้เซลลูเลส โอโนซูกะอาร์เอส ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลส อาร์-10 เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมต่ำ แต่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ดังนั้นเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่สูงกว่าจึงเป็นอันตรายต่อเซลล์น้อยกว่า (สมปอง เตชะโต, 2530)

4.2 ระยะเวลาในการอินคิวเบท

การอินคิวเบทชิ้นส่วนใบในสารละลายเอนไซม์เป็นระยะเวลาสั้นอาจไม่เพียงพอแก่การย่อยให้เซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในขณะที่ใช้เวลานานมีผลทำให้เอนไซม์มีเวลาย่อยผนังเซลล์มากขึ้นทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้น อย่างไรก็ตามการอินคิวเบทเป็นเวลานานมีผลให้ความมีชีวิตลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาก่อนอยู่ในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลานานเกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ตลอดจนองค์ประกอบภายในเซลล์ การทดลองนี้พบว่าการอินคิวเบทเป็นเวลา 2 และ 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำ แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง เมื่อเทียบกับการอินคิวเบทเป็นเวลา 4 และ 5 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนสูงกว่า แต่ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดต่ำลง ดังนั้นการอินคิวเบทเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของนมตำเลีย (ภาพที่ 5) ในกรณีการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) โดย โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2543) พบว่า การอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 9.20×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และเมื่ออินคิวเบทเป็นเวลานานขึ้นส่งผลให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุชาทิพย์ การรักษา (2537) รายงานการอินคิวเบทชิ้นส่วนใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาเป็นเวลา 90 นาที ว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 19.17×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด 86.18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มเวลาในการอินคิวเบทเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง แม้ว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นก็ตาม อย่างไรก็ตาม Reichert และ Liu (1996) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้าปอกระเจา (*Hibiscus cannabinus* L.) ด้วยเอนไซม์เซลลูไลซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอเรส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ว่าต้องใช้เวลาอินคิวเบทนานถึง 16 ชั่วโมง จึงสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 1.8×10^{5} ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตยังคงสูงถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การอินคิวเบทเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 7.8×10^{6} และ 7.2×10^{6} โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และความมีชีวิตลดลงเหลือ 85 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การอินคิวเบทเป็นเวลานานนั้นอาจเป็นไปได้ว่าพืชดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารเชื่อมระหว่างเซลล์หรือเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส ซับซ้อนมากกว่า และเอนไซม์ที่ใช้มีกิจกรรมต่ำ

4.3 แหล่งของชิ้นส่วนพืช

แหล่งชิ้นส่วนต่างกันให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่างกัน จากการใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ของนมตำเลียในการศึกษานี้ พบว่า ใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกมีจำนวนและความมีชีวิตสูงสุด มีลักษณะกลม เต่ง และมีพัฒนาการหลังเพาะเลี้ยงดีที่สุด Zarfar และคณะ (1995) แยกโปรโตพลาสต์ของ *Medicago littoralis* ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนใบและใบเลี้ยง ให้จำนวน ความมีชีวิต และการแบ่งเซลล์สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัส และพบว่าใบในสภาพปลอดเชื้ออายุ 45-50 วัน ให้จำนวน ความมีชีวิต และการแบ่งเซลล์สูงกว่าใบที่มีอายุ 75 วัน หรือใบที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลอง Ochatt (1993) แยกโปรโตพลาสต์จาก *Weigela* × *florida* cv. Bristol Ruby (*Caprifoliaceae*) พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสามารถแบ่งเซลล์สูงสุด แล้วเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนลำต้นและรากมีการแบ่งเซลล์ต่ำและหยุดการเจริญในที่สุด Nakano และ Mii (1992) แยกโปรโตพลาสต์จากใบของพืชในสกุล *Dianthus* พบว่าชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้จำนวนและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์สูงกว่าใบที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลอง อย่างไรก็ตาม Ai-Ping และคณะ (1995) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนต่างๆ ของแอปเปิล (*Malus*×*domestica* Borkh.) พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันมีการแบ่งเซลล์สูงสุด 19.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ 14.7 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองไม่มีการแบ่งเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองหรือจากเซลล์ซัสเพนชันในการศึกษานี้พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่เลี้ยงนอกหลอดทดลองมีลักษณะกลม เต่ง และมีเม็ดคลอโรพลาสต์เป็นจำนวนมาก แต่โปรโตพลาสต์ดังกล่าวส่วนใหญ่แตกในขั้นตอนการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากออสโมติคัมในระดับที่ทดสอบไม่เหมาะสมทำให้น้ำแพร่เข้าสู่เซลล์จนเซลล์ขยายขนาดใหญ่และแตกในที่สุด ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันพบว่ามีจำนวนน้อย เซลล์ส่วนใหญ่ถูกแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่ยังมีผนังเซลล์ห่อหุ้มอยู่ มีรูปร่างยาวรีหรือสี่เหลี่ยมผืนผ้า ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไป เวลาในการอินคิวเบทไม่เพียงพอ สภาพของเซลล์ซัสเพนชันที่นำมาใช้แยกครั้งนี้มีลักษณะเกาะกันเป็นก้อนยากแก่การย่อย และระดับออสโมติคัมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อาจสูงเกินไปทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เป็นผลให้เซลล์เหี่ยว ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรศึกษาสภาพดังกล่าวที่เหมาะสมแก่การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชัน

4.4 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโดยวิธีต่างๆ ส่งผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีที่สารอาหารแพร่เข้าสู่เซลล์โดยตรง แต่โปรโตพลาสต์ตกตะกอนบริเวณก้นจานเพาะเลี้ยงและเกาะกลุ่มกัน เมื่อเคลื่อนย้ายหรือเอียงจานเพาะเลี้ยงทำให้โปรโตพลาสต์เคลื่อนที่ตามการทิศทางการไหลของอาหารซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โปรโตพลาสต์แตกหรือชะงักการเจริญ ในขณะที่การฝังเลี้ยงในอาหารแข็งอาจทำให้โมเลกุลของสารอาหารเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ได้ช้า แต่เซลล์ถูกตรึงไว้กับที่ซึ่งจะช่วยป้องกันการตกตะกอนและการเกาะกลุ่มของโปรโตพลาสต์ ดังนั้นทางเลือกหนึ่งสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็คือการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งซึ่งจะช่วยให้โปรโตพลาสต์ถูกตรึงไว้กับที่และสารอาหารแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ในการศึกษานี้พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และการฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งโดยเติมไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือเติมอากาโรส 0.2 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม การฝังเลี้ยงในอาหารวุ้นอากาโรส 0.2 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ โปรโตพลาสต์มีการแตกหน่อสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและการฝังอาหารกึ่งแข็งที่เติมไฟต้าเจล 2-4 เท่า ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2543) พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) โดยวิธีฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง โดยใช้วุ้นไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวน และการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งโดยใช้วุ้นอากาโรส ไม่ส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ในทำนองเดียวกันนี้ Nakano และคณะ (1995) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของ Gentian (*Gentiana* spp.) ในอาหารกึ่งแข็งที่เติม gellan gum 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์สูงสุด 25.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 8.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการฝังเลี้ยงในอาหารวุ้นอากาโรส หรือ calcium alginate โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ผลข้างต้นคาดว่าเกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากความไม่บริสุทธิ์หรือโครงสร้างที่ไม่เหมาะสมของวุ้นอากาโรสต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ อย่างไรก็ตาม Zarfar และคณะ (1995) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *Medicago littoralis* พบว่าการฝังเลี้ยงในอาหารวุ้นอากาโรสส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Dan และ Stephens (1991) พบว่าการฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L. cv. Lucullus 234) ในอาหารวุ้นอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ 19.12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบางๆ หรืออาหารเหลวเป็นชั้นบางๆ บนอาหารวุ้นอากาโรส 0.4 เปอร์เซ็นต์ (agarose layer) ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวนมีผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ในระดับต่ำ และมีเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อสูง อาจเกิดขึ้นเนื่องจากมีจำนวน

โปรโตพลาสต์ในแต่ละหยดน้อย และมีอาหารน้อย เมื่อเลี้ยงไประยะหนึ่งมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ยับยั้งการเจริญของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ความชื้นในภาชนะที่เลี้ยงต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบอื่นๆ ส่งผลให้เกิดการระเหยของสารอาหารและน้ำที่เป็นองค์ประกอบในอาหารที่เลี้ยงมีผลกระทบต่อการเจริญและการแบ่งเซลล์ จากผลดังกล่าวสังเกตเห็นว่าโปรโตพลาสต์ที่อยู่บริเวณขอบหยดของสารละลายโปรโตพลาสต์แตกภายหลังเพาะเลี้ยง 3-5 วัน นอกจากนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากบริเวณขอบหยดมีอาหารเกาะติดกับจานเพาะเลี้ยงเป็นชั้นบางๆ ทำให้โปรโตพลาสต์สัมผัสอากาศโดยตรง แล้วทำให้โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในบริเวณดังกล่าวแตก

การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นต่ำเกินไป (5×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) พบว่าโปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความหนาแน่นเพิ่มขึ้นมากๆ ส่งผลให้การแบ่งเซลล์ลดลง เนื่องจากการแก่งแย่งธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และมีการสะสมสารเมตาบอไลต์มายับยั้งการเจริญ และมีการแตกหน่อมากขึ้น การทดลองนี้พบว่าความหนาแน่นที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย คือ 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร สามารถส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 11.83 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต (2543) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุกหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้สูงสุด 5-10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นที่ต่ำ (1×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) หรือสูงเกินไป (1×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร) ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ 0-5 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของนมตำเลียด้วยความหนาแน่นที่เหมาะสมในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีผลส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์สูงสุด สมปอง เตชะโต (2531) รายงานว่าการเติม NAA ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า BA (NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 หรือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์มะอึกได้ ในทำนองเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7 สมปอง เตชะโต (2530) พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร B5 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการสร้างโคโลนีสูงสุด 45 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ การทดลองนี้พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของนมตำเลียได้สำเร็จ แม้ว่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามไม่สามารถพัฒนาพืชต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนาจากโปรโตพลาสต์ได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไป ควรศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์ จากการศึกษาออสโมติคัมของเอนไซม์ที่ใช้แยก ความเป็นกรด-ด่าง การดัดแปลงสูตรอาหาร เช่นลด NH_4NO_3 เพื่อลดความเป็นพิษของแอมโมเนียมอิออน การเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยง ดังที่รายงานโดย

Kunitake และคณะ (1995) นอกจากนี้ควรศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการพัฒนาพืชต้นใหม่จากแคลลัสให้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. การปลูกถ่ายยีน

การศึกษาผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนทำได้หลายวิธี เนื่องจากในยีนโครงสร้างที่ปลูกถ่ายมียีนรายงานผล ดังนั้นวิธีการที่ง่ายที่สุดคือการตรวจสอบยีนรายงานผลดังกล่าว เช่น การต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคานามัยซินอันเนื่องมาจากยีน *npt*II การต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไบอะลาฟอสอันเนื่องมาจากยีน *bar* เป็นต้น ก่อนที่จะใช้สารปฏิชีวนะคัดเลือกพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนจำเป็นต้องทดสอบความเข้มข้นของสารนั้นๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของพืชที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายยีนอย่างสมบูรณ์ ซึ่งความเข้มข้นของสารแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช ในพืชบางชนิดมีความต้านทานต่อคานามัยซินต่ำ เช่น แอปเปิล ซึ่งมีรายงานว่า การเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้แอปเปิลพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือมากกว่า ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ (Yepes และ Aldwinckle, 1994) ในขณะที่บางพืชต้านทานต่อคานามัยซินระดับปานกลาง เช่น พลับญี่ปุ่น (*Diospyros kaki* Thunb) ซึ่งมีรายงานว่า การเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการสร้างยอดจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของได้อย่างสมบูรณ์ (Nakamura และคณะ, 1998) ในสะระแหน่ (*Mentha* × *piperita* L.) มีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสและทำให้เนื้อเยื่อตาย 95 เปอร์เซ็นต์ (Niu *et al.*, 1998) และในมันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) สายพันธุ์ White Star พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการสร้างเอ็มบริโอจากแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์ (Gama *et al.*, 1996) ในขณะที่บางพืชต้านทานต่อคานามัยซินสูง เช่น หน้าวัว ซึ่งมีรายงานว่าสารปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของหน้าวัวสายพันธุ์ Rudolph คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากชิ้นส่วนของลำต้นระหว่างข้อ คือ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนใบและลำต้นระหว่างข้อของสายพันธุ์ UH1060 คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chen and Kuehnle, 1996) และในแครอท (*Daucus carota* L.) พบว่าสารปฏิชีวนะคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสูงกว่า สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสจากก้านใบได้อย่างสมบูรณ์ (Pawlicki *et al.*, 1992) จากการศึกษานี้ พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารชักนำแคลลัสจากใบนมตำเลีย สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์ การที่นมตำเลียหรือพืชอื่นๆ ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้นสูง อาจเนื่องมาจากพืช

เหล่านั้นมียีน non-specific kanamycin phosphotransferase อยู่ในหน่วยพันธุกรรม (Yepes และ Aldwinckle, 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถพัฒนาพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคามามัยซิน แม้ว่ามีกิจกรรมของ GUS ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีนที่ได้รับการปลูกถ่ายไม่สามารถรวมกับหน่วยพันธุกรรมของพืชอย่างสมบูรณ์ หรือยีน *npt*II ที่ได้รับการปลูกถ่ายไม่แสดงกิจกรรมในนมตำเลีย ในขณะที่นักวิจัยหลายท่าน รายงานผลสำเร็จในการพัฒนาพืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อคานามัยซิน (Arokiaraj *et al.*, 1998; Chen and Kuehnle, 1996; Jeknic *et al.*, 1999; Kuvshinov *et al.*, 1999; Miguel and Oliveira, 1999; Pawlicki *et al.*, 1992; Pene *et al.*, 1995; Scorza *et al.*, 1995; Semeria *et al.*, 1996; Zhang and Zeevaart, 1999; ; Zhu *et al.*, 1995)

สำหรับสารกำจัดวัชพืชไบอะลาฟอสนั้นพบว่า ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสจากใบนมตำเลียได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ Jeknic และคณะ (1999) รายงานการใช้สารบาสต้า (ไบอะลาฟอส) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่ามีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ซัสเพนชันของ *Iris germanica* 70 เปอร์เซ็นต์ Niu และคณะ (1998) พบว่าการคัดเลือกสะระแหน่ (*Mentha* × *piperita* L.) ที่ได้รับการปลูกถ่ายโดยการยิงยีนให้กับชิ้นส่วนใบแล้วคัดเลือกด้วยไบอะลาฟอส เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมาตรวจสอบไม่พบยีนเป้าหมายในหน่วยพันธุกรรมของพืช Wan และ Lemaux (1994) ปลูกถ่ายยีนโดยการยิงยีนให้กับข้าวบาร์เลย์ และสามารถคัดเลือกข้าวบาร์เลย์ที่ต้านทานต่อสารไบอะลาฟอสเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปยังรุ่นลูก โดยพบว่ารุ่นลูกที่งอกบนอาหารคัดเลือกเติมสารไบอะลาฟอส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายปลูกลงกระถางยังคงแสดงการต้านทานต่อการฉีดพ่นสารบาสต้า 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่สามารถชักนำแคลลัสจากใบที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pARK5 ในอาหารคัดเลือกเติมสารไบอะลาฟอสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไม่มีการส่งผ่านยีนจากอะโกรแบคทีเรียมดังกล่าวหรือไม่มีการรวมตัวของยีนที่ส่งผ่านกับหน่วยพันธุกรรมของพืช หรือยีนที่ได้รับการปลูกถ่ายไม่แสดงกิจกรรมในพืชนั้น

การปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนใบของนมตำเลียด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อต่างๆ กันจำนวน 4 สายเชื้อ พบว่า อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233 ให้ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด สอดคล้องกับ Jeknic และคณะ (1999) ซึ่งใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok233 ให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนกับเซลล์ซัสเพนชันของ *Iris germanica* สูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพลาสมิดดังกล่าวจัดเป็น superbinary vector เพราะประกอบด้วยยีน *vir*B, *vir*C และ *vir*G (ภาคผนวกที่ 2) ที่ได้จากอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ A281 ซึ่งเป็นสายเชื้อที่มีความรุนแรง (Jeknic *et al.*, 1999) ในขณะที่ Kuvshinov และคณะ (1999) รายงานว่าการปลูก

ถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือข้อของเทอร์นิปด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pGPTV ว่ามีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิดชนิดเดียวกัน และสายเชื้อ C58C1 ซึ่งมีพลาสมิด pGV2260pHTT หรือ pGV3850pHTT หรือ pGV3850pGPTV อย่างไรก็ตามสายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมกับพืชต่างๆ มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน จากรายงานของ Semeria และคณะ (1996) พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ A281 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนให้กับใบของ lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) สูงกว่าสายเชื้อ EHA 105 Niu และคณะ (1998) รายงานว่าการปลูกถ่ายยีนให้กับใบของสะระแหน่ (*Mentha* × *piperita* L.) ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด pBISM1 มีการกิจกรรมของ GUS สูงกว่าสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUS-INT Berry และคณะ (1996) รายงานการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนใบและก้านใบของสะระแหน่ว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ A281 ซึ่งมีพลาสมิด pTiBo542 สามารถส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ Brasileiro และคณะ (1996) รายงานการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นใต้และเหนือใบเลี้ยง ก้านใบ และใบของ common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AT8196 และ Ach5 มีประสิทภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด Moore และคณะ (1992) พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ A281 สามารถชักนำการสร้างปุ่มปมของลำต้นส้มได้ดีเมื่อเทียบกับสายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pMON9793 Miguel และ Oliveira (1999) รายงานการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนใบอามอนด์ (*Prunus dulcis* Mill.) ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUSINT หรือ pFAJ3003 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงกว่าสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด p35SGUSINT Nakamura และคณะ (1998) รายงานการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงพลับญี่ปุ่นว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pSMAK251 มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับการศึกษานี้พบว่าอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อที่มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนรองลงมาได้แก่สายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pIG121 และสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ส่วนสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pARK5 ไม่ประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีน

นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดและอายุของแหล่งชิ้นส่วน และพันธุกรรมของพืช (Berry *et al.*, 1996; Pena *et al.*, 1995) ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม (Curtis *et al.*, 1999) การใช้คลื่นเสียงจาก sonicator (โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต, 2543) วิธีการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนพืช (Norelli *et al.*, 1996) การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารชักนำแคลลัสเป็นระยะเวลาสั้นๆ ก่อนการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม (Kuvshinov *et al.*, 1999; Curtis *et al.*, 1999; Pawlicki *et al.*, 1992) การเติมสาร acetosyringone (Pawlicki *et al.*, 1992) และการดัดแปลงวิธีการปลูกถ่ายยีน เช่น การยิงอนุภาคทังสเตนให้กับชิ้นส่วนพืชเพื่อสร้างบาดแผลแล้วนำไป

ปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม (Brasileiro *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยดังกล่าว แต่คาดว่าปัจจัยเหล่านั้นจะมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนให้สูงขึ้น ซึ่งควรได้รับการศึกษาในโอกาสต่อไป รวมทั้งกระบวนการการพัฒนาพืชต้นใหม่จากแคลลัสของนมตำเลียให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 5

สรุป

การเพาะเลี้ยงข้อ การชักนำแคลลัส เซลล์ซัสเพนชัน และพืชต้นใหม่

1. ชักนำยอดของนมตำเลียโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงยอดในไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรืออาหารสูตร MS เติมไฮโปเนกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและชักนำราก

2. ชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นโดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำแคลลัสได้ 0.34 กรัมต่อชิ้นส่วน หรือจากชิ้นส่วนก้านใบในอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำแคลลัสได้ 0.31 กรัมต่อชิ้นส่วน หรือจากชิ้นส่วนใบในอาหารเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำแคลลัสได้ 0.10 กรัมต่อชิ้นส่วน

3. ชักนำเซลล์เซลล์ซัสเพนชันในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้เซลล์เจริญสูงสุดหลังย้ายเลี้ยง 14 วัน

4. ชักนำพืชต้นใหม่โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร MS เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำยอดได้ 56.3 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.8 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสไม่สามารถชักนำยอดได้

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

5. สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมแก่การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 2.22×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 93.72 เปอร์เซ็นต์

6. การอินคิวเบทชิ้นส่วนใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 1.64×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตสูงสุด 91.91 เปอร์เซ็นต์

7. แหล่งชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์คือ ใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 40-50 วัน สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 1.79×10^{6} ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 92.22 เปอร์เซ็นต์

8. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมคือ การฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งเติมวุ้นไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมโปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ 8.19 เปอร์เซ็นต์

9. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 1×10^{5} ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 11.83 เปอร์เซ็นต์

10. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 10.34 เปอร์เซ็นต์

11. พัฒนาการของโปรโตพลาสต์นมตำเลีย พบว่า สามารถแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยง 3-5 วัน แล้วเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (4-10 เซลล์) ในเวลา 10-14 วัน และเจริญเป็นแคลลัสขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าในเวลา 60 วัน

การปลูกถ่ายยีน

12. การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์

13. การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเติมสารไบอะลาฟอส เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้อย่างสมบูรณ์

14. อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233 มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด 94.4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

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

อดุชร พงษ์ไสว. 2541. ไม้เลื้อยประดับ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

เชาวลิต บุญศรี. 2542. การชักนำพืชต้นใหม่และการแยกโปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัสของกล็อกซิเนีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปิยะ เฉลิมกลิ่น. 2543. โฮย่า กำลังมาแรง. ว. เคหการเกษตร 24: 110-114.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรี วุฒิสิทธิ์. 2539. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล็อกซิเนีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

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

สมปอง เตชะโต. 2531. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะอึก : 2 การชักนำการสร้างแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ. ว. สงขลานครินทร์ 10: 377-384.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โสภา ทวีคณะโชติ และสมปอง เตชะโต. 2543. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22: 15-23.

อารีย์ วรัญญวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. นครราชสีมา : สำนักงานเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

Ai-Ping, D., Hong-Fan, W. and Yu-Fen, C. 1995. Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplasts of apple (*Malus* × *domestica* cv. Starkrimson). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 145-149.

Al-Juboory, K. H., Williams, D. J. and Skirvin, R. M. 1991. Growth regulators influence root and shoot development of micropropagated Algerian ivy. HortScience 26: 1079-1080.

Anthony, P., Davey, M. R., Power, J. B. and Lowe, K. C. 1995. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 299-302.

Arias-Castro, C., Scragg, A. H., Stafford, A. and Rodriguez-Mendiola, M. 1993. Growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:77-82.

Arokiaraj, P., Yeang, H. Y., Cheong, K. F., Hamzah, S., Jones, H., Coomber, S. and Charlwood, B. V. 1998. CaMV 35S promoter directs β-glucuronidase expression in the laticiferous system of transgenic *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Plant Cell Reports 17: 621-625.

Belarmino, M. M., Abe, T. and Sasahara, T. 1994. Plant regeneration from stem and petiole protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its wild relative, *I. lacunosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 145-150.

Benmoussa, M., Mukhopadhyay, S. and Desjardins, Y. 1996. Optimization of callus culture and shoot multiplication of *Asparagus densiflorus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 91-94.

Berry, C., Van Eck, J. M., Kitto, S. L. and Smigocki, A. 1996. Agrobacterium-mediated transformation of commercial mints. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 177-181.

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and practice. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.

Brasileiro, A. C. M., Aragao, F. J. L., Rossi, S. and Dusi, D. M. A. 1996. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated trandsformation using microprojectile bombardment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121: 810-815.

Chand, P. K., Davey, M. R. and Power, J. B. 1990. Efficient plant regeneration from cell suspension protoplasts of the woody medicinal plant *Solanum dulcamara* L. (bittersweet, woody nightshade). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22: 119-125.

Chen, F. and Kuehnle, A. R. 1996. Obtaining transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolate internodes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121: 47-51.

Chen, L. Z. and Adachi, T. 1998. Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology. Plant Cell Reports 17: 508-514.

Crockett, J. U. 1978. Flowering House Plants. Virginia: Time-Life Books Inc.

Curtis, I. S., Power, J. B., Hedden, P., Ward, D. A., Phillips, A., Lowe, K. C. and Davey, M. R. 1999. A stable transformation system for the ornamental plant, *Datura meteloides* D. C. Plant Cell Reports 18: 554-560.

Dan, Y. and Stephens, C. T. 1991. Studies of protoplasts culture types and plant regeneration from callus-derived protoplasts of *Asparagus officinalis* L. cv. Lucullus 234. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 321-331.

Datta, S. K., Datta, K., Soltanifar, N., Donn, G. and Potrykus, I. 1992. Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. Plant Molecular Biology 20:619-629.

Feher, A., Felfoldi, K., Preiszner, J. and Dudits, D. 1991. PEG-mediated transformation of leaf protoplasts of *Solanum tuberosum* L. cutivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 105-114.

Fellner, M. 1994. Influence of pH and sucrose concentration on nonenzymatic and enzymatic isolation of protoplasts from mature pollen of *Tulbaghia violacea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 157-162.

Gama, M. I. C. S., Leite Jr., R. P., Cordeiro, A. R. and Cantliffe, D. J. 1996. Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 237-244.

Grezes, J., Thomus, D. and Thomasset, B. 1994. Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 91-97.

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

Hoshino, Y., Nakano, M. and Mii, M. 1995. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Cell Reports 14: 341-344.

Iapichino, G., McCulloch, S. and Chen, T. H. H. 1992. Adventitious shoot formation from leaf explants of *Rhododendron*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30: 237-241.

Ignacimuthu, S., Arockiasamy, S., Antonysamy, M. and Ravichandran, P. 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 131-137.

Jeknic, Z., Lee, S. P., Ernst, R. C. and Chen, T. H. H. 1999. Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124: 575-580.

Karim, M. A. and Adachi, T. 1997. Cell suspension, isolation and culture of protoplasts of *Allium cepa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 43-47.

Kisaka, H., Kisaka, M., Kanno, A. and Kameya, T. 1998. Intergeneric somatic hybridization of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by protoplast fusion. Plant Cell Reports 17: 362-367.

Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J. and Schilperoort, R. A. 1982. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296: 72-74.

Kumar, S., Sarkar, A. K. and Kunhikannan, C. 1998. Regeneration of plants from leaflet explants of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 137-143.

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

Kuvshinov, V., Koivu, K., Kanerva, A. and Pehu, E. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of greenhouse-grown *Brassica rapa* spp. *oleifera*. Plant Cell Reports 18: 773-777.

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

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

Miguel, C. M. and Oliveira, M. M. 1999. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. Plant Cell Reports 18: 387-393.

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

Mohamed,Y.Y., Barringer S.A. and Splittstoesser, W.E. 1995. Micropropagation of the endangered succulent, *Stapelia semota*, by axillary proliferation. Cactus and Succulent Journal 67: 366-368.

Moore, G., Jacono, C. C., Neidigh, J. L., Lawrene, S. D. and Cline, K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segment and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 11: 238-242.

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

Nakamura, T. 1991. A study of geographical differentiation and chromosome of succulent plants in the family Asclepiadaceae. Kromosomo 2: 2068-2077.

Nakamura, Y., Kobayashi, S. and Nakajima, I. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyl segments of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). Plant Cell Reports 17: 435-440.

Nakamura, Y., Sawada, H., Kobayashi, S., Nakajima, I. and Yoshikawa, M. 1999. Expression of soybean β-1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants. Plant Cell Reports 18: 527-532.

Nakano, M., Hosokawa, K., Oomiya, T. and Yamamura, S. 1995. Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41:221-227.

Nakano, M. and Mii, M. 1992. Protoplast culture and plant regeneration of several species in the genus *Dianthus*. Plant Cell Reports 11: 225-228.

Narasimhulu, S. B. and Reddy, G. M. 1983. Plantlet regeneration from different callus cultures of *Arachis hypogare* L. Plant Science Letters. 31: 157-163.

Nicolaisen, M. and Poulsen, G. B. 1993. Optimization of polyethylene glycol mediated transient gene expression in pea protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 93-97.

Norelli, J., Mills, J. and Aldwinckle, H. 1996. Leaf wounding increases efficiency of *Arobacterium*-mediated transformation of apple. HortScience 31: 1026-1026.

Niu, X., Lin, K., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A. 1998. Transgenic peppermint (*Mentha* x *piperita* L.) plants obtained by cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 17: 165-171.

Ochatt, S. J. 1993. An efficient protoplast-to-plant system for the hybrid ornamental shrub, *Weigela* × *florida* cv. Bristol Ruby (*Caprifoliaceae*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 315-320.

Oh, M. H. and Kim, S. G. 1994.Plant regeneration from petal protoplast culture of *Petunia hybrida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 275-283.

Patil, R. S., Davey, M. R. and Power, J. B.1994. Highly efficient plant regeneration from mesophyll protoplasts of Indian field cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 255-258.

Patnaik, J. and Debata, B. K. 1996. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. through axillary bud culture. Plant Cell Reports 15: 427-430.

Pawlicki, N., Sanwan, R. S. and Sangwan-Norreel, B. S. 1992. Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 129-139.

Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Duran-Vila, N. and Navarro, L. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 14: 616-619.

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

Perez-Molphe-Balch, E. and Ochoa-Alejo, N. 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. Plant Cell Reports 17: 591-596.

Phillips, G. C. and Hubstenberger, J. F. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture 4: 261-269.

Reichert, N. A. and Liu, D. 1996. Protoplast isolation, culture, and fusion protocols for kenaf (*Hibiscus cannabinus*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 201-210.

Remotti, P. C. and Loffler, H. J. M. 1995. Callus induction and plant regeneration from gladiolus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 171-178.

Robichon, M. P., Renou, J. P. and Jalouzot, R. 1997. Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 209-212.

Rout, G. R., Saxena, C., Samantaray, S. and Das, P. 1999. Rapid plant regeneration from callus cultures of *Plumbago zeylanica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 47-51.

Saito, A. and Suzuki, M. 1999. Plant regeneration from meristem-derived callus protoplasts of apple (*Malus* × *domestica* cv. 'Fuji'). Plant Cell Reports 18: 549-553.

Scorza, R., Levy, L., Damsteegt, V., Yepes, L. M., Cordts, J., Hadidi, A., Slightom, J. and Gonsalves, D. 1995. Transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene and reaction of transgenic plants to plum pox virus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 943-952.

Semeria, L., Ruffoni, B., Rabaglio, M., Genga, A., Vaira, A. M., Accotto, G. P. and Allavena, A. 1996. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 67-72.

Shackelford, N. J. and Chlan, C. A. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology Reporter 14: 50-57.

Sharma, N. and Chandel, K. P. S. 1992. Effect of ascorbic acid on axillary shoot induction in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 109-113.

Sherraf, I., Tizroutine, S., Chaput, M. H., Allot, M., Mussio, I., Sihachakr, D., Rossignol, L. and Ducreux, G. 1994. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *Lycopersicon pennellii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 137-144.

Shimizu, K., Nagaike, H., Yabuya, T. and Adachi, T. 1997. Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50:27-31.

Vandemoortele, J. 1999. A procedure to prevent hyperhydricity in cauliflower axillary shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 85-88.

Wan, Y. and Lemaux, P. G. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol. 104: 37-48.

Warnaar, F. 1984. Aromatic and fatty acids of triterpene esters and rubber content of *Hoya* lactices and their taxonomic significance. Phytochemistry 23:1049-1053.

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

Yan-Xiu, Z., Harris. P. J. C. and Dun-Yi, Y. 1995. Plant regeneration protoplasts isolated from cotyledon of *Sesbania bispinosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 119-123.

Yepes, L. M. and Aldwinckle, H. S. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 257-269.

Zafar, Y., Nenz, E., Damiani, F., Pupilli, F. and Arcioni, S. 1995. Plant regeneration from explant and protoplast derived calluses of *Medicago littoralis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 41-48.

Zhang, J., Tiwari, V. K., Golds, T. J., Blackhall, N. W. Cocking, E. C., Mulligan, B. J., Power, J. B. and Davey, M. R. 1995. Parameters influencing transient and stable transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41:125-138.

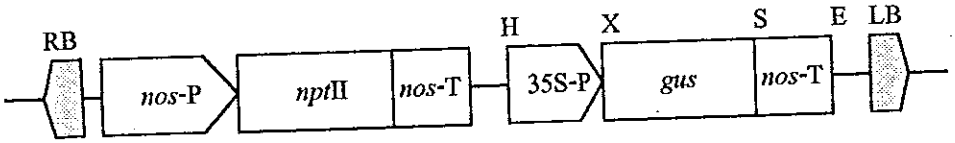
Zhang, H. X. and Zeevaart, 1999. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Plant Cell Reports 18: 640-645.

Zhu, B., Chen, T. H. H. and Li, P. H. 1995. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. Plant Physiol. 108: 929-937.

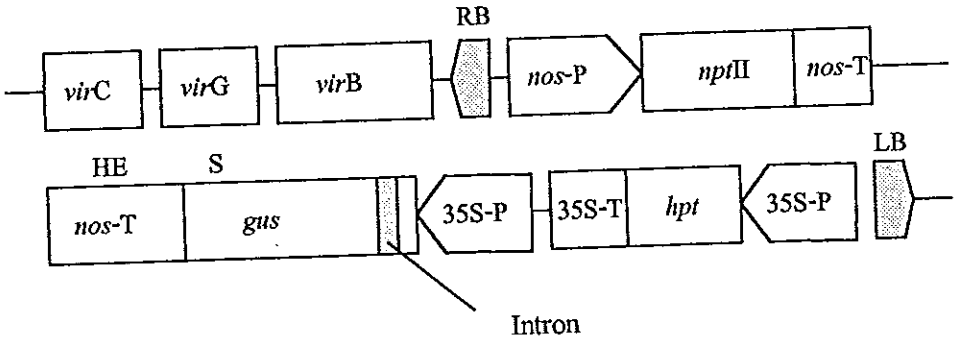
Zupan, J. R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiol. 107: 1041-1047.

ภาคผนวก

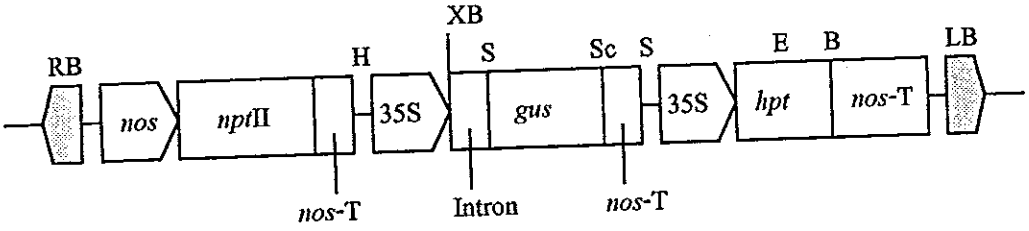
ภาคผนวกที่ 1 โครงสร้างของพลาสมิด pBI121



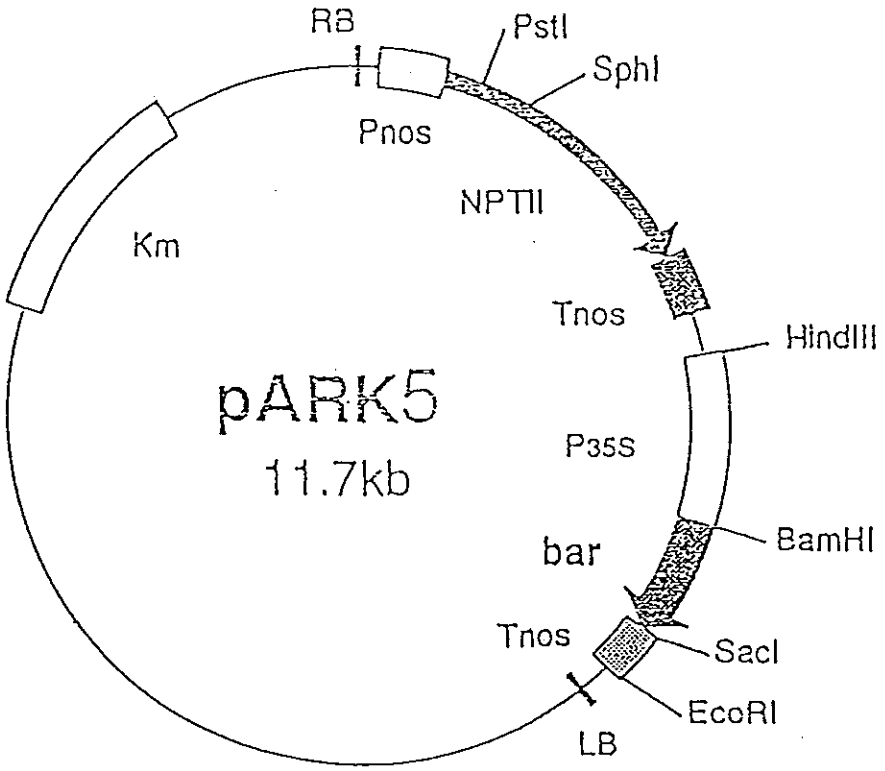
ภาคผนวกที่ 2 โครงสร้างของพลาสมิด pTok233



ภาคผนวกที่ 3 โครงสร้างของพลาสมิด pIG121



ภาคผนวกที่ 4 โครงสร้างของพลาสมิด pARK5



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสมัชชา นาคสมบัติ	
วัน เดือน ปีเกิด	13 เมษายน 2516	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	2539