การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน
(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

Protoplast Isolation and Culture from Leaves of Shogun
(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

อุมาพร ศรีภักดี

Umaporn Sripakdee

Order Key 20158
BIB Key 160192

เลขหมู่ SB370.S5 U4 1541 ค.2
เลขทะเบียน 24 มี.ย. 2542

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2541

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน
(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

ผู้เขียน นางสาว อุมาพร ศรีภักดี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

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

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

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน
(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

ผู้เขียน นางสาว อุมาพร ศรีภักดี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) นั้นใช้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเมล็ดงอกใช้ใบอายุต่างๆ กันมาหั่นฝอยละเอียด จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สัดส่วนของใบหนัก 1 กรัมต่อเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ทั้งหมดที่ศึกษาละลายในแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ MES (2-(N-morpholinoethanesulfonic acid)) เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ $MgSO_4.7H_2O$ 1.7 มิลลิโมลาร์ และ $CaCl_2.2H_2O$ 2.99 มิลลิโมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างต่างๆ กันในช่วง 5.4-6.2 หน่วย นำใบที่อินคูเบทในเอนไซม์แต่ละชุดไปเขย่าในสภาพที่มืดอุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ5 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกโปรโตพลาสต์ ศึกษาจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

จากการศึกษาพบว่า การฟอกเมล็ดด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่ว่าเพาะทั้งเมล็ดที่มีเปลือกหุ้ม หรือไม่มีเปลือกหุ้ม เมื่อนำชิ้นส่วนลำต้นส่วนปลายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker) เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวม (เปอร์เซ็นต์ และ จำนวน) สูงที่สุดชิ้นส่วนดังกล่าวใช้เป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์ต่อไป จากการทดสอบชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์พบว่า เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ อินคูเบทในสภาพเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงที่สุด $6.6x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 83.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์ที่ให้จำนวนสูงที่สุด $1.1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดคือ 5.6 และที่ความเป็นกรดด่างนี้ยังให้ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงที่สุด 79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบอายุของใบของต้นกล้าที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์พบว่า ใบอายุ 35 วันหลังจากเมล็ดงอกให้จำนวนสูงที่สุด $6.8x10^5$ โปรโตพลาสต์กรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 82 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มเวลาการอินคูเบทจาก 3 เป็น 5 ชั่วโมง ส่งเสริมให้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นจาก $3.7x10^6$ เป็น $4.5x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของใบจากต้นกล้ากับใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น (หรือจากการทำไมโครคัตติ้ง) พบว่าใบจากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงมากกว่าใบจาก

ไมโครคัตติ้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ ด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ พบว่าความหนาแน่น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุดประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มโชกุนคือสูตร MS เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเข้มข้นออสโมติคัมด้วยแมนนิตอล 0.7 โมลาร์ สภาพแวดล้อมการวางเลี้ยงที่เหมาะสมคือในที่มืด อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในสภาพที่สารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมส่งเสริมการแตกหน่อจำนวนมาก ดังนั้นการแบ่งเซลล์ในระยะต่อมาจึงยังไม่ประสบผลสำเร็จ

Thesis Title	Protoplast Isolation and Culture from Leaves of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)
Author	Miss Umaporn Sripakdee
Major Program	Plant Science
Academic Year	1998

Abstract

Isolation of protoplasts of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) was carried out using seedlings germinating on hormone-free basal MS (Murashige and Skoog) medium. After the seeds germinated, the leaves at various physiological ages were collected, cut into narrow strips and incubated in different kinds and concentrations of enzymes. Usually 1 g of leaf tissue was incubated with10 ml. of enzyme. The combination of enzymes used in this investigation was dissolved in 0.7 M mannitol in the presence of 3 mM MES (2-(N-morpholinoethanesulfonic acid)), 1.7 mM $MgSO_4.7H_2O$, and 2.9 mM $CaCl_2.2H_2O$. The pH of the enzyme mixture solution was adjusted ranging from 5.4-6.2 Incubation was carried in an orbital shaker at 40 rpm under dark condition at 27±2°C for three and five hours. At the end of incubation, a number and yield of released protoplasts were seperately compared in each treatment by completely randomized design.

The results revealed that surface sterilization of the seeds for 20 min gave 100% germination in both the presence and absence of seed coat. Culturing seedling stems at the distal end onto MT (Murashige and Tucker) medium supplemented with 0.5 mg/l BA (benzyladenine) provided the best result in multiple shoot formation (percentage and number). Those shoots were further used as plant material for protoplast isolation. Among enzymes tested, it was found that 1.5% cellulase from *Trichoderma viride* in combination with 1.5% macerozyme R-10 gave the highest yield and viability of protoplasts of $6.6x10^5$/g fresh weight and 83.6%, respectively, after incubation on an orbital shaker at 40 rpm for 3 h. The optimum pH for the highest yield of released protoplasts was 5.6. This pH provided $1.1x10^6$ protoplasts/g fresh weight and percentage viability of 79. In the case of leaf ages, 35-day old leaves after emerging or germination gave the highest yield and viability of protoplasts of $6.8x10^5$ and 82%, respectively. Increasing the time of incubation to 5h increased the number of protoplasts, significantly to $4.5x10^6$, the number at 3h had been $3.7x10^6$. For sources, seedling leaves gave much greater yields of protoplasts than microcutting.

The culture of mesophyll protoplsts in thin layer of liquid MS medium at various densities revealed that $2x10^5$ protoplasts/ ml promoted the highest division at approximately 4%. The most suitable culture medium was MS supplemented with 5 mg/l NAA (α-naphthaleneacetic acid) and 1 mg/l BA and adjusted osmoticum with mannitol to 0.7M. The cultures were maintained under dark condition at $27\pm2^{\circ}C$. First division of the protoplasts was observed after a week of culture. In an unsuitable of plant growth regulators, a high frequency of budding occurred. Accordingly, further division and development of protoplasts in this experiment was not evident.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำทั้งในด้านการเรียน การวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. จรัสศรี นวลศรี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ และคณาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอน และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่อนุเคราะห์สถานที่พิมพ์วิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างสูง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง และขอบคุณน้องๆทุกคนที่เป็นกำลังใจมาโดยตลอด

อุมาพร ศรีภักดี

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	11
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	12
วัสดุอุปกรณ์	12
วิธีการ	13
3. ผล	21
4. วิจารณ์	45
5. สรุป	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้เขียน	59

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในสูตรอาหาร MS ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 19
2. ความเข้มข้นของ GA_3 และสารสกัดจากมอลท์ที่เติมในอาหารสูตร MT ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน 20
3. ผลการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดส้มโชกุนที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดและไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาต่าง ๆ ต่อการปลอดเชื้อและการงอก บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 21
4. ผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต่อการสร้างยอดรวมบนอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1เดือน 22
5. ผลของเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ จากใบอายุ 45 วัน 25
6. ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระดับต่าง ๆ ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มโชกุนอายุ 30-60 วัน 28
7. ผลของอายุใบส้มโชกุนต่อจำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ ที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ 30
8. ผลของเวลาในการอินคูเบทใบส้มโชกุนอายุ 30-60 วัน ในเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอรเซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ 32
9. แหล่งของชิ้นส่วนใบต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ 34
10. ผลของความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆต่อการแบ่งเซลล์ หลังจากตรวจสอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ของการเลี้ยง 38
11. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 41
12. ผลของความเข้มข้นของ GA_3 และสารสกัดจากมอลท์ที่เติมในอาหาร MT ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ 42

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ผลของการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงตำแหน่งต่าง ๆต่อจำนวนใบและความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น ในสูตรอาหาร MT เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	23
2.	ยอดรวมและจำนวนใบต่อยอดที่ชักนำจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงตำแหน่งต่าง ๆ ในสูตรอาหาร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	24
3.	ผลของเอนไซม์ความเข้มข้นต่าง ๆต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบส้มโชกุน อายุ 45 วัน	26
4.	ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบส้มโชกุน อายุ 45 วัน โดยใช้เอนไซม์เซลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (X 200)	27
5.	โปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงแสดงถึงความมีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA (X 200)	27
6.	ผลของระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์แยกจากใบอายุ 30-60 วัน ในเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย $x10^5$ต่อกรัมน้ำหนักสด)	29
7.	ผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย $x10^5$ต่อ กรัมน้ำหนักสด)	31
8.	ผลของเวลาการอินคูเบทใบส้มโชกุนในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ มาเซอร์โรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย $x10^5$ต่อกรัมน้ำหนักสด)	33
9.	โปรโตพลาสต์จากใบ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงอายุ 2 เดือน (ข) (X 200)	35
10.	โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 300)	36
11.	โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรอาหาร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 300)	36
12.	โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 300)	37
13.	ผลของความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆต่อการแบ่งเซลล์หลังจากตรวจสอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ของการเลี้ยง	39

14. การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหาร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 400) 43
15. การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหาร MS (X 400) 44

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4- dichlorophenoxyacetic acid
BA / BAP	=	benzyladenine / benzylaminopurine
DMRT	=	Duncan's Multiple Range Test
FDA	=	fluorescein diacetate
GA_3	=	gibberellic acid
IAA	=	indole-3-acetic acid
KN	=	kinetin
MES	=	2-(N-morpholinoethanesulfonic acid)
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
MT	=	Murashige and Tucker (medium)
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
PVP	=	polyvinylpyrroridone
ZEA	=	zeatin
2-iP	=	2-isopentenyl adenine

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ส้ม (*Citrus* spp.) อยู่ในวงศ์ Rutaceae มีแหล่งกำเนิดในเอเชียอาคเนย์ ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังแหล่งอื่นๆของโลก ส้มเป็นพืชตระกูลค่อนข้างใหญ่ มีถึง 130 สกุล และ 1,500 ชนิด ผลผลิตมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากองุ่น (มงคล แซ่หลิม, 2535) ส้มเจริญได้ดีในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนกึ่งหนาวในบริเวณเส้นรุ้งที่ 45 องศาเหนือ ถึง 35 องศาใต้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 25 องศาเซลเซียส ถึง 30 องศาเซลเซียส ชอบดินร่วนปนทรายที่มีอินทรีย์วัตถุสูงการระบายน้ำดี ดินควรเป็นกรดเล็กน้อย ประเทศที่ปลูกส้มเป็นอุตสาหกรรม ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย อิสราเอล เป็นต้น (มงคล แซ่หลิม และ วิจิตต์ วรรณชิต, 2528) สำหรับส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) พบในจังหวัดยะลาโดยชาวจีนชื่อนายเชี๊ยะพัว แซ่ตั้ง ได้ทดลองผสมส้มพันธุ์บิกกากับส้มเขียวหวาน ทำให้ได้ส้มพันธุ์ใหม่ในปี 2512 ประมาณ 7 ต้น พบว่ามีลักษณะทรงต้นเหมือนพันธุ์บิกกาจากชัวเถาคือทรงพุ่มตรง ใบตั้ง และต่างจากส้มเขียวหวานตรงที่รสชาติหวานอมเปรี้ยวดีกว่าพันธุ์บิกกาและต่างไปจากส้มเขียวหวานธรรมดา นอกจากนี้ยังไม่มีกาก กลิ่นหอมคล้ายส้มจีน ทำให้ตลาดมีความต้องการสูง ราคาประมาณกิโลกรัมละ 50-80 บาท ปัจจุบันเริ่มมีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังภาคต่างๆ ของประเทศไทย (นพรัตน์ บำรุงรักษ์, 2536)

ในปัจจุบันการปลูกพืชตระกูลส้มเป็นการค้ามีอุปสรรคสำคัญคือ โรคและแมลงศัตรูซึ่งมีมากมาย โรคที่พบมีทั้งที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ส่วนแมลงศัตรูที่พบ เช่น ไรแดง เพลี้ยไฟ เพลี้ยหอย ไส้เดือนฝอย (มงคล แซ่หลิม, 2535) ทำให้มีการใช้สารเคมีกันมากในแต่ละปี ซึ่งส่งผลกระทบถึงสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค จากความก้าวหน้าทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เช่น การผลิตมะนาวปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2536) การนำปลายยอดขนาดเล็กมาเสียบยอดบนต้นกล้าส้มที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Navarro, 1984) การปลูกถ่ายยีนในส้มโชกุนด้วยอะโกรแบคทีเรีย (สนธยา หนูด้วง, 2541) แต่วิธีการดังกล่าวยังป้องกันการเกิดโรคได้ไม่สมบูรณ์เพราะเมื่อนำต้น ปลอดโรคจากหลอดมาปลูกลงดินก็ยังประสบปัญหาเกี่ยวกับแมลงที่เป็นพาหะนำโรค ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อผลิตพืชต้านทานต่อโรคและแมลง ซึ่งอาจทำได้โดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์สร้างโปรโตคลน รวมโปรโตพลาสต์สร้างลูกผสมโดยการใช้สารเคมีหรือใช้ไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้นเช่นในส้มสามารถรวมโปรโตพลาสต์ที่

แยกได้จากใบกับโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันโดยใช้ polyethyleneglycol (PEG) เป็นตัวกระตุ้น (Deng *et al.*, 1992) นอกจากนี้อาจใช้เทคนิค ทางด้านพันธุวิศวกรรมเช่นการตัดต่อยีนที่ต้องการ ใส่เข้าไปใน โปรโตพลาสต์ด้วยวิธีต่าง ๆ แล้วนำไปเลี้ยงชักนำให้เป็นพืชต้นใหม่ต่อไป ต้นพืชที่ได้ก็เป็นพืชจำลองพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนที่ต้องการ (Wenbin and Zhenghua, 1983) อย่างไรก็ตามในขั้นตอนก่อนที่จะเป็นพืชจำลองพันธุ์ที่สมบูรณ์จำเป็นต้องมีการศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ซึ่งเป็นการศึกษาขั้นต้นในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชตระกูลส้ม

ทรงพุ่ม

ขนาดของทรงพุ่มของพืชตระกูลส้มมีตั้งแต่ 15- 30 ฟุต การเจริญเติบโตของเนื้อไม้ในต้นส้มจะมีทั้ง primary และ secondary growth เหมือนกับพืชอื่นทั่วไป

ใบส้ม

ใบส้มแบ่งได้เป็นสองส่วนคือ แผ่นใบ และก้านใบ ส่วนของก้านใบจะมีส่วนคล้ายกับแผ่นใบที่เรียกว่า wing ติดอยู่ด้วย ใบส้มเป็นใบเดี่ยว ยกเว้นส้มสามใบและลูกผสมของส้มสามใบ รูปทรงและขนาดของใบแตกต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของส้ม ขนาดของ wing แตกต่างกันตามแต่ชนิดของส้ม สีของใบมีตั้งแต่สีเขียวอมเหลือง เช่น ใบเลมมอน จนถึง สีเขียวเข้มออกดำ เช่น ส้มโอ สวีทออเรนซ์ ผิวใบด้านบนเป็นมัน ด้านใต้ใบเป็นสีตองอ่อน ขอบใบ บางชนิดเรียบ บางชนิด ก็เป็นหยัก บนแผ่นใบ และก้านใบมีต่อมน้ำมันเต็มไปหมด

ดอก

ส้มให้ดอกเมื่อลำต้นผ่านความแห้งแล้งมาช่วงหนึ่งก่อน หลังจากนั้นตาที่พักตัวอยู่ก็จะแตกออกเป็นกิ่งอ่อน ตาที่ยอดของกิ่งอ่อนเกิดตาดอก ตาดอกของส้มมี 2 ชนิด คือตายอดและตาข้าง ส้มมีดอกแบบสมบูรณ์เพศ ชั้นของกลีบเลี้ยงมี 3-5 อัน อยู่ถัดจากกลีบรอง มีสีขาว ผนังกลีบดอกปกคลุมด้วยพวกคิวตินที่หนามากทำให้มองดูเป็นมันและสะท้อนแสง

ผล

ผลส้มจัดเป็นพวกเบอรี่ มีชื่อเรียกว่า hesperidium เจริญจากรังไข่โดยตรงมีราว 10 พูเชื่อมติดกันเป็นวงกลมล้อมรอบแกนที่เรียกว่า central axis ผลส้มแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ เปลือกผล (ovary wall) ผนังกั้นและแกนผล (septa and central axis) และ ถุงน้ำหวาน (juice sac) ผลส้มใช้เวลาสุกแก่ประมาณ 6-7 เดือน หลังจากกลีบดอกร่วง

เมล็ด

ส้มมีลักษณะเมล็ดเป็น polyembryony ไข่อ่อนที่อยู่ในผลมีการจัดเรียงเป็นสองแถวเกาะติดกับขอบผนังของพูรังไข่ที่มาเชื่อมกับแกนกลางผล จัดเป็นแบบ axile placentation ลักษณะของเมล็ดส้มมี 2 ด้านคือ

1. micropylar end เป็นด้านแหลมของเมล็ด เป็นส่วนที่ต้นอ่อนจะงอกรากออกมา
2. chalazal end เป็นด้านป้านของตัวเมล็ด ด้านนี้มีพัฒนามาจากคาลาซา ของไข่อ่อน ประกอบไปด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอก และก้านไข่

องค์ประกอบภายในเมล็ดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1.ใบเลี้ยง (cotyledon) ใบเลี้ยงมีหลายสี เช่น สีขาวครีม สีครีมหรือสีเขียว บางครั้งอาจเป็นสีเขียวแก่ เมล็ดที่มีคัพภะเพียง 1 คัพภะ มีใบเลี้ยงที่มีขนาดใกล้เคียงกันทั้ง 2 ซีก ถ้ามีหลายคัพภะมักจะพบความผิดปกติเกิดขึ้นเสมอ คือ อาจมีใบเลี้ยง 3-4 ใบ และขนาดรูปร่างของคัพภะก็แตกต่างกันด้วย

2.คัพภะ (embryo) ส่วนของคัพภะอาจมีหนึ่งหรือหลายคัพภะได้ ลักษณะของเมล็ดส้มที่มีจำนวนมากกว่า 1 คัพภะ/เมล็ด เรียกว่า polyembryony คัพภะมี 2 ชนิด

2.1 คัพภะที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์ เจริญเติบโตเป็นไซโกท เรียกว่า gametophytic embryo หรือ zygotic embryo

2.2 คัพภะที่เกิดจากการพัฒนาการของเซลล์นิวเซลลา ตรงบริเวณใกล้กับเซลล์ไข่อ่อน เรียกคัพพะชนิดนี้ว่า nucellar embryo

รากและระบบราก

รากส้มส่วนใหญ่อยู่ต่ำจากผิวดินประมาณ 2 ฟุต การแผ่กระจายของรากส้มและการเจริญเติบโตของรากจะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของทรงพุ่มที่อยู่เหนือดิน การแผ่กระจายของรากส้มและการเจริญเติบโตของรากจะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของทรงพุ่มที่อยู่ระดับเหนือดิน เช่น ส้มที่มีลำต้นสูงชะลูดแสดงว่าส้มนั้นมีรากแก้วแทงดิ่งในแนวลึกและมีรากแขนงเป็นจำนวนน้อย ในทางตรงข้ามถ้าส้มมีทรงพุ่มแตกแผ่กว้างออกไปแสดงว่าส้มต้นนั้นมีรากแขนงเป็นจำนวนมากแผ่ออกไปในระดับตื้นและมีรากแก้วตื้น (มงคล แช่หลิม, 2535)

2. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆของต้นกล้าส้ม

Sim และคณะ (1989) ได้วางเลี้ยงชิ้นส่วนเหนือใบเลี้ยงของส้มจี๊ด (*Citrus mitis*) ในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม BAP (benzylaminopurine) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำยอดรวม ตัดแบ่งชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนโคน (proximal) ส่วนกลาง(middle) และส่วนปลาย (distal) วางเลี้ยงแนวนอน ในที่มืด พบว่าชิ้นส่วนปลายมีเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์

Normah และคณะ (1997) ศึกษาชิ้นส่วนต่าง ๆที่ได้จากการเพาะเมล็ด ส้ม *C. halimmii* ซึ่งเป็นส้มพันธุ์ป่าของประเทศมาเลเซียในหลอดทดลองในสูตรอาหาร MS เติม BA (benzyladenine) 2.2 - 11.1 ไมโครโมลาร์ โดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด ข้อ และ ส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง ขนาด 0.5 $\pm$ 0.1 เซนติเมตร พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงสามารถสร้างยอดรวมได้มากที่สุด คือ 9.6 ยอด/ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง

สนธยา หนูด้วง (2541) ศึกษาผลของของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงของส้มโชกุน โดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MS เติม BA หรือ KN (kinetin) หรือ 2- iP (2-isopentenyl adenine) ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ยอดรวมสูงสุด 1.45 ยอด รองลงมาคือ KN และ 2- iP ซึ่งให้ยอดรวมเฉลี่ยเพียงยอดเดียว

3. การแยกโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ หมายถึง เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) เซลล์พืชทุกชนิดนอกจากมีเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังมีผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง โครงสร้างของผนังเซลล์ ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส เซลล์พืชแต่ละเซลล์เชื่อมติดกันด้วยชั้นมิดเดิลลาเมลลา ซึ่งประกอบด้วยสารพวกเพกติน ฉะนั้นการย่อยเซลล์เพื่อแยกโปรโตพลาสต์ จึงต้องมีเอนไซม์ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใช้สำหรับย่อยมิดเดิลลาเมลลา ก็คือ เพคติเนสเอนไซม์และกลุ่มที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ คือ เซลลูเลส และ เฮมิเซลลูเลส (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) วิธีการแยก โปรโตพลาสต์มี 2 วิธีการใหญ่ ๆ คือ วิธีกล วิธีนี้ใช้มีดที่มีความคมเฉือนใบให้มีขนาดเล็กมาก (หั่นฝอย) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูง ทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ได้ อีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีทำได้ง่ายไม่มีขั้นตอนยุ่งยาก และนิยมกันแพร่หลายวิธีการนี้คือ การใช้เอนไซม์แยก วิธีนี้ค้นพบโดย Cocking (1960) อ้างโดย สมปอง เตชะโต (2536) ซึ่งใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพื่อแยกโปรโตพลาสต์ของใบยาสูบ วิธีดังกล่าวได้พัฒนาต่อมาโดย Nagata และ Takabe (1970) อ้างโดย สมปอง เตชะโต (2536) ใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ขั้นตอนเพียงขั้นตอนเดียว คือผสมเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน เอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์หลุดออกมาเป็นอิสระ ง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ เอนไซม์พวกนี้คือมาเซอร์โรไซม์ เมื่อแต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระแล้ว เอนไซม์ชนิดที่สองจะทำการย่อยผนังเซลล์เพื่อย่อยเอาผนังเซลล์ออก เอนไซม์พวกนี้คือเซลลูเลส องค์ประกอบของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมช่วยให้ได้โปรโตพลาสต์เป็นจำนวนมาก (สมปอง เตชะโต, 2536) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆอีกหลายประการซึ่งปัจจัยดังกล่าว ได้แก่

3.1 พันธุ์ แหล่งชิ้นส่วนพืช และ อายุ

แหล่งของพืช โดยทั่วไปแบ่งเป็นสองประเภท คือพืชที่ปลูกนอกหลอดทดลอง และพืชที่อยู่ในหลอดทดลองซึ่งรวมทั้งแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชัน ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมีข้อดีคือ สามารถหาวัสดุง่าย ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มาก ความมีชีวิตสูง ภายใต้สภาพการแยกที่เหมาะสม (Wenbin and Zhenghua, 1983) ในการแยกโปรโตพลาสต์ของส้มนั้น ชิ้นส่วนที่นิยมนำมาแยกโปรโตพลาสต์และประสบความสำเร็จในการเลี้ยงคือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (Hidaka and Kajiura 1988 ; Ling *et al.*,1989, Ling *et al.*,1990 ; Kunitake *et al.*,

1991; Jumin and Nito 1995) รองลงมาได้แก่ นิวเซลลาแคลลัส (Spiegel- Roy and Vardi 1984) นอกจากนี้ในพืชชนิดอื่นก็ได้มีการศึกษา เช่น

Kao และ Michayluk (1980) ทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบอัลฟัลฟา(alfalfa) พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนใช้เวลาในการแยกน้อยกว่าและมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบแก่

Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้หลายสกุลเช่น คัทลียา ฟาแลนด์น๊อฟซีส และเด็นโดรเบียม จากส่วนต่างๆคือ โปรโตคอร์ม ราก ใบ และกลีบดอก พบว่าในการแยกโปรโตพลาสต์ จากโปรโตคอร์มใช้เวลาในการอินคูเบทนานที่สุดและได้จำนวน โปรโตพลาสต์น้อยที่สุด โปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบแตกง่าย มีผลึกรูปเข็มและมีคลอโรพลาสต์จากโปรโตพลาสต์ที่แตก หลุดปนอยู่ในสารละลายเอนไซม์เป็นจำนวนมาก ส่วนกลีบดอกให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งอื่น

Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) แยกโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น พบว่าขนาดของใบ และ ระยะพัฒนาการทางสรีระ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพของโปรโตพลาสต์ โดยใบจากต้นในแปลงปลูกและเรือนกระจกความยาวน้อยกว่า 7 เซนติเมตร หรือมีน้ำหนักน้อยกว่า 400 มิลลิกรัม เหมาะสมในการนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ส่วนใบในหลอดทดลองหนัก 50-100 มิลลิกรัม จากข้อที่ 6-7 จากปลายยอดให้ โปรโตพลาสต์ที่มีคุณภาพดีที่สุด

พัฐวดี ทองสีดำ (2536) ศึกษาขนาดของใบที่ใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้อะแรนด้าพบว่า ขนาดของใบที่มีความยาวน้อยกว่า 1 เซนติเมตรให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าใบที่มีความยาวระหว่าง 1-3 เซนติเมตร และพบว่าใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าโปรโตคอร์ม เมื่อใช้น้ำหนักเริ่มต้นของใบและโปรโตคอร์ม 1 กรัมเท่ากัน

3.2 ความดันออสโมติค

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ดังนั้นเซลล์ต้องสัมผัสกับอาหารโดยตรงทำให้เซลล์แตกง่าย ดังนั้นในขั้นตอนการแยกและการวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารต้องปรับความดันออสโมติคที่เหมาะสม ความต่างศักย์ระหว่างความดันออสโมติค ภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ต้องสมดุลกัน ถ้าความดันออสโมติคภายนอกสูงเกินไปทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตของเซลล์เสียหายได้ โดยเซลล์ลดการนำเข้าของกรดอะมิโนและ ลดการสร้างผนังเซลล์ สุดท้ายโปรโตพลาสต์เหี่ยวเสียรูปร่าง ส่วนความดันออสโมติคที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตก (Evans and Bravo, 1983) สารเคมีที่ใช้ปรับความดันออสโมติคเรียกว่า ออสโมติคัม ได้แก่ น้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล ซอร์บิทอล เป็นต้น และ น้ำตาลที่ไม่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ ได้แก่ กลูโคส และ ซูโครส โดยการใช้ร่วมกันหรืออย่างใดอย่างหนึ่งเพียงลำพัง อย่างไรก็ตามสารละลายออสโมติคัมที่นิยมใช้ ในการแยกโปรโตพลาสต์คือ แมนนิทอล ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 0.23-0.9 โมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นที่

ใช้ขึ้นอยู่กับความดันออสโมติคของใบในขณะแยก (Kao and Michayluk, 1974) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของออสโมติคัมในการแยก โปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยก ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ความเข้มข้นของออสโมติคัม อยู่ในช่วง 0.5-0.7 โมลาร์ (Catherine *et al.*, 1990 ; Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991; Esmilda and Schieder, 1993 ; พัฐวดี ทองสีดำ, 2535 ; สมปอง เตชะโต, 2538) การแยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของส้ม ใช้ออสโมติคัมความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.3-0.45 โมลาร์ (Hidaka and Kajiura, 1988 ; Ling *et al.*, 1990 ; Niedz, 1993) ในบางกรณีพบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของส้ม ต้องใช้ออสโมติคัมความเข้มข้นสูงถึง 0.7 โมลาร์ (Niedz, 1993)

3.3 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ ขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์

Touruan-Mathius (1992) ศึกษาเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ใบอ่อนของกาแฟ พบว่า เซลลูเลสอาร์10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์, ไดรซีเลสเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ มาเซอร์เรสเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ละลายเอนไซม์ในแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ร่วมด้วย MES (2-(N-morpholinoethanesulfonic acid)) 3 มิลลิโมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 การอินคูเบทในสภาพมืดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 10 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีความมีชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์

สมปอง เตชะโต (2538) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ จากใบปาล์มน้ำมันโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์, มาเซอโรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยเพคโตไลเอส วาย 23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หากไม่มีเพคโตไลเอสวาย 23 ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เลย เอนไซม์ทั้งหมดละลายในแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ร่วมด้วย MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.7-5.8 วางอินคูเบทบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 45 รอบต่อนาทีพบว่า การวางอินคูเบทในที่มืดให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสอาร์เอสมีประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์ได้ดีกว่าเซลลูเลสอาร์10

Esmilda และ Schieder (1993) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนหรือปลายยอดที่ยังไม่แตกใบอ่อนของแอปเปิ้ลด้วยเอนไซม์ต่างๆ พบว่าเซลลูเลส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลสเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ PVP (polyvinylpyrroridone 10000) 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ร่วมด้วย MES 5 มิลลิโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.63 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 อินคูเบทบนเครื่องเขย่า 3 รอบต่อ

นาที ในสภาพมืดเป็นเวลา 17 ชั่วโมงให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $6x10^6$-$1.6x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

4. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์การเลี้ยงในอาหารจึงต้องเติมสารออสโมติคัมลงไปด้วย สูตรอาหารที่นิยมใช้โดยทั่วไปได้แก่สูตร MS (Evans and Bravo, 1983)

Spiegel-Roy และ Vardi (1984) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้ม 5 ชนิด คือ *C. sinensis* L. Osbeck (orange) cv. Nucella Shamouti, cv. Shamouti Landau; *C. aurantium* L.(sour orange); *C. reticulata* Blanco (mandarin) cv. Murcott, cv. Dancy, cv. Ponkan; *C. paradisi* Macf. (grapefruit) cv. Dancan; and *C. limon* L. Burn f. cv. Villafranca ที่แยกได้จากนิวเซลลาแคลลัส ในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker, 1969) เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ วุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม ซูโครส 0.06 โมลาร์ GA_3 0.03 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดจากมอลท์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เอ็มบริโอพัฒนาเป็นรูปตอปิโด แล้วย้ายเอ็มบริโอระยะดังกล่าว ไปชักนำยอดในอาหารสูตร MT เติม ซูโครส 0.15 โมลาร์ อะดีนีนซัลเฟต 0.1 มิลลิโมลาร์ GA_3 0.003 มิลลิโมลาร์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5-7 สัปดาห์จึงย้ายไปชักนำรากในอาหารเหลวที่มีเกลืออนินทรีย์ของสูตรอาหาร MT เติม ซูโครส 0.06 โมลาร์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

Hidaka and Kajiura (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้ม 3 ชนิดคือ Washington 'navel (*C. sinensis* L. Osbeck), Yuko (*C. yuko* Hort.ex.Tanaka) และ Ponkan (*C. reticulata* Blanco) จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ด้วยความหนาแน่น $2x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์สีเขียวได้ดีที่สุด ในอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส 0.09 โมลาร์ กลูโคส 0.08 โมลาร์ แมนนิทอล 0.23 โมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ IAA (indole-3-acetic acid) 1 ไมโครโมลาร์ ZEA (zeatin) 1 ไมโครโมลาร์ และ GA_3 (gibberellic acid) ไมโครโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 วางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์เมื่อย้ายเอ็มบริออยด์สีเขียวไปเลี้ยงในที่มีแสง 4.7-8.6 วัตต์ต่อตารางเมตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็งสูตร MS เติม GA_3 1ไมโครโมลาร์ และซูโครส 0.06 โมลาร์ สามารถชักนำพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์

Ling และคณะ (1989) ได้ศึกษาวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสซึ่งชักนำจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ได้จากการวางเลี้ยงอับละอองเกสรของส้ม calamondin

(*C. mandurensis* Lour.) พบว่าการเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 5 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MT ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมซูโครส 0.15 โมลาร์ ปรับความดันออสโมติคด้วยซอร์บิทอล 0.45 โมลาร์หรือ 0.25 โมลาร์ เติมวุ้น อากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 วางเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในสภาพการให้แสง 35.3 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์สีเขียวได้ และเมื่อย้ายไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MT เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เอ็มบริออยด์สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ ภายในเวลา 30 วัน

Ling และคณะ (1990) แยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของส้ม satsuma (*C. unshiu* Marc.) และเลี้ยงในสูตรอาหาร MT ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ปรับความดันออสโมติคด้วย ซอร์บิทอล 0.3 โมลาร์ ซูโครส 0.3 โมลาร์ ทำให้อาหารแข็งด้วยดิฟโฟแบคโตเอการ์ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 วางเลี้ยงในที่มืดความหนาแน่น $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีได้ภายใน 10-14 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ โซมาติคเอ็มบริโอพัฒนาหลังจากวางเลี้ยงโคโลนี 60 วัน เมื่อย้ายโซมาติคเอ็มบริโอไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MT เติมซูโครส 50 กรัมต่อลิตร วุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มแสง 35.3 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำยอดและรากได้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ภายในเวลา 2 เดือน

Kunitake และคณะ (1991) แยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของส้ม satsuma พันธุ์ Tokumori Wase (*C. unshiu* Marc.) และวางเลี้ยงในสูตรอาหาร MT เติมอะดีนีนซัลเฟตเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 0.15 โมลาร์, แมนนิทอล 0.45 โมลาร์ และ Gellan Gum 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงที่ความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ สามารถพัฒนาเป็นกลุ่ม โคโลนีได้ 46 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมอะดีนีนซัลเฟต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ย้ายโคโลนีมาเลี้ยงในสูตรอาหาร MT เติมน้ำตาลแลคโตสเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ได้ เมื่อย้าย เอ็มบริออยด์มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันเติม GA_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ Gellan Gum 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เอ็มบริออยด์งอกเป็นพืชต้นใหม่ได้ 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 30-60 วัน

Deng และคณะ (1992) ทำการรวมโปรโตพลาสต์จากใบส้ม *Fortunella crassifolia* Swing cv. Meiwa กับโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน ของ *C. sinensis* L.

Osbeck cv. Valencia หลังจากการรวมโปรโตพลาสต์แล้ววางเลี้ยงในสูตรอาหาร ตามวิธีการของ Grosser และคณะ (1990) อ้างโดย Deng และคณะ (1992) พบว่าโปรโตพลาสต์ลูกผสมสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้สำเร็จ พืชที่ได้มีโครโมโซม 4 ชุด 2n=4x=36

Niedz (1993) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันของ sweet orange (*C. sinensis* L. Osbeck cv. Hamlin) ด้วยวิธีการห่อหุ้มโปรโตพลาสต์ในแคลเซียมอัลจิเนตบีด (Ca-alginate bead) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ก่อนนำไปวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มในอาหาร CPM1(Citrus Protoplast Medium 1) ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและอาหารรองของสูตร MS ปราศจาก NH_4NO_3 และดัดแปลงวิตามิน กรดอินทรีย์ น้ำตาล และสารเติมอื่นๆ เพื่อความเหมาะสมสำหรับชักนำการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของ sweet orange หลังจากเลี้ยงในอัลจิเนตบีด ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 15-20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พบว่ามีการแบ่งเซลล์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การวางเลี้ยงด้วยความหนาแน่นที่ต่ำกว่าหรือเลี้ยงในอาหารเหลวมีการแบ่งเซลล์ต่ำ โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์โดยตรงขนาด 50 ไมโครเมตร หลังจากวางเลี้ยงในแคลเซียมอัลจิเนตบีด เป็นเวลา 10 วัน เมื่อเอ็มบริออยด์พัฒนามีขนาดโตมากกว่า 500 ไมโครเมตร (ประมาณ 40 วันหลังเลี้ยง) จึงย้ายไปชักนำการงอกในสูตรอาหาร MT เติม GA_3 3 ไมโครโมลาร์ ซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาย้ายไปเลี้ยงในอาหารชักนำรากในสูตรอาหาร MT เติม NAA (∝-naphthaleneacetic acid) 0.05 ไมโครโมลาร์ ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ได้เป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ซึ่งใช้เวลา 7-10 วัน รวมเวลาที่ใช้นับจากเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์จนได้เป็นพืชต้นใหม่ 75-92 วัน

Jumin และ Nito (1995) ชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ชักนำจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของแก้ว (*Muraya paniculata*) ในสูตรอาหาร MT เติมซูโครส 50 กรัมต่อลิตร GA_{4+7} 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลท์ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.7 วางเลี้ยงที่ความหนาแน่น $3-5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร วางเลี้ยงในที่มืดอุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงที่มีแสง 35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ แคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ เมื่อวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MT เติมแลคโตส 50 กรัมต่อลิตร ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากที่กล่าวมาข้างต้นเป็นความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน หรือนิวเซลลาแคลลัสของส้มในขณะที่ไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มเลย ดังนั้นในการศึกษานี้จะได้อธิบายถึงปัจจัยที่มีผลต่อการแยก และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์และดัดแปลงผสมผสานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ระดับความเป็นกรด-ด่าง อายุใบ และเวลาในการอินคูเบทใบในสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและวิธีการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1.วัสดุพืช

นำเมล็ดส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco. var. Shogun) มาแกะและไม่แกะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย คลอร๊อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้สะอาด 3 ครั้ง วางเลี้ยงเมล็ดทั้งสองลักษณะในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร MS , MT
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช BA, ZEA , IAA , NAA, KN 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetatic acid), GA_3
- สารเคมีบัฟเฟอร์ MES
- เอนไซม์ เซลลูเลส จาก *Trichoderma viride* และมาเซอร์โรไซม์อาร์10
- สารเคมีสำหรับย้อมตรวจสอบความมีชีวิต คือ FDA (Fluorescein diacetate)
- แมนนิทอล
- น้ำตาลซูโครส

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่องแก้วและพลาสติกต่าง ๆ คือ พาสเจอร์ปิเปต สไลด์หลุม ฮีมาไซโตมีเตอร์ กรวยกรองพลาสติก กระบอกฉีดยา
- เครื่องมือย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ใบมีด ด้ามมีด ปากคีบ จานเพาะเลี้ยง แก้ว และพลาสติก
- เครื่องเซ็นตริฟิวก์พร้อมหลอด
- ชุดกรองมิลลิพอร์พร้อมกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนสารละลายไฟฟ้า
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- หม้อนึ่งความดันไอ
- เตาอบไมโครเวฟ
- กระบอกตวง ฟลาสค์ บีกเกอร์ ปิเปต ไมโครปิเปต แท่งแก้วคน

2.4 อุปกรณ์อื่น ๆ

-กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตต (inverted microscope) ประกอบกับชุดตรวจสอบฟลูออเรสเซนต์ พร้อมกล้องถ่ายรูป

3. วิธีการ

3.1 การเตรียมเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ เซลลูเลส จาก *Trichoderma viride* และมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าว ละลายในสารละลาย แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์, MES 3 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต 1.7 มิลลิโมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 2.99 มิลลิโมลาร์ ละลายให้เข้ากัน แล้วปรับความเป็นกรด-ด่างสารละลายเท่ากับ 5.6 แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมครอน ที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีการออโตเครฟ แล้วเก็บในหลอดหลอดละ 10 มิลลิลิตร กรณีที่ไม่ใช้ทันทีนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมสารละลายล้างโปรโตพลาสต์

สารละลายที่ใช้ล้างโปรโตพลาสต์ แสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ 2 ละลายให้เข้ากัน เตรียมเป็นสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 การอินคูเบทใบด้วยเอนไซม์

นำใบส้มโชกุนจากต้นกล้าและต้นที่ได้จากไมโครคัตติ้งที่เลี้ยงในหลอดทดลองมาหั่นเป็นฝอยหนัก 1 กรัม อินคูเบท ในสารละลายเอนไซม์คู่ผสมต่าง ๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ที่อุณภูมิ 27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด

3.4 การแยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์

นำสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์และเศษใบซึ่งอินคูเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มากรองผ่านผ้ากรองมิราคลอทขนาดช่อง 77 ไมครอน ซึ่งวางในกรวยกรองพลาสติก รองรับด้วยหลอดเซ็นตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ส่วนบนออก แล้วเติมสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ลงไป ดูดเป่าตะกอนโปรโตพลาสต์ให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 700 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ทำเช่นนี้สองครั้ง เพื่อล้างเอนไซม์ที่ปนอยู่กับโปรโตพลาสต์ออกให้หมด จากนั้นนำไปลอยบนน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์และบริสุทธิ์ ปรากฏอยู่ตรงรอยต่อระหว่างชั้นของน้ำตาลซูโครส และสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ ใช้พาสเจอร์ ไปเปตดูดโปรโตพลาสต์ออกมา แล้วนำไปล้างในสารละลายล้าง โดยการปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำเช่นนี้สองครั้ง ครั้งสุดท้ายล้างด้วยอาหารที่ใช้เลี้ยง ก่อนนำไปนับจำนวน และตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA จากนั้นนำไปเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ต่อไป

3.5 การตรวจนับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ตรวจสอบความมีชีวิตโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายโปรโตพลาสต์ในอัตราส่วนเท่ากัน ดูดเป่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการย้อมสีไปหยดบนสไลด์หลุมจำนวน 2 หยด ปิดด้วยโคฟเวอร์สลิบนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้คลื่นอัลตราไวโอเลตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตมีกิจกรรมของเอสเตอเรสเรืองแสงสีเขียวเหลืองภายใต้คลื่นดังกล่าว สุ่มนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตในแต่ละฟิลด์จำนวน 3 ฟิลด์ต่อซ้ำ เปรียบเทียบกับจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดแล้วคิดเฉลี่ยเป็นเปอร์เซ็นต์ดังสูตร

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

3.6 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ปรับโปรโตพลาสต์ให้มีความหนาแน่นต่างๆในช่วง 1 x 10^5- 6 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารแข็ง และอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซิน และไซโตไคนินร่วมกันในระดับความเข้มข้นต่างๆ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.6 โดยเลี้ยงในจาน พลาสติกปลอดเชื้อขนาด 60 x 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร สำหรับการเลี้ยงในอาหารแข็งใช้วุ้นอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารกึ่งแข็งใช้ไฟต้าเจล 0.17 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เติมอาหารสูตรเดิมที่ลดความเข้มข้นของแมนนิทอล ลงเหลือ 0.5 โมลาร์ลงไปในอาหารเหลว เพื่อรักษาออสโมติคัม และส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์

วิธีการ

1. การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดส้มโชกุน

นำเมล็ดส้มโชกุนแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนละ 100 เมล็ด ส่วนแรกแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ส่วนที่สองไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก แล้วนำเมล็ดทั้งสองส่วนแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที แล้วย้ายไปแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 20, 30 และ 40 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต วางเลี้ยงในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ปนเปื้อน และ อัตราการงอก ของเมล็ดที่แกะและไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก เปรียบเทียบกันในแต่ละเวลาของการแช่ในคลอร็อกซ์

2. การศึกษาผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต่อการสร้างยอดรวม

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 40 วัน หลังจากวางเลี้ยง นำส่วนของลำต้นมาตัดแบ่งเป็น 3 ส่วน ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร โดยแบ่งเป็นลำต้นส่วนปลาย (distal end) ลำต้นส่วนกลาง (middle end) และ ลำต้นส่วนโคน (proximal end) วางเลี้ยงทั้งสามส่วนในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนใบ และความยาวยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

3. การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์

เตรียมสารละลายสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma viride* กับ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 ในสัดส่วนความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1.5:1.5, 2:0.5, 2:1.0 และ 2:1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปรับความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ 5.6 แล้วนำใบที่หั่นฝอยอายุ 45 วัน จากต้นกล้าที่วางเลี้ยงในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัมไปจุ่มแช่ในเอนไซม์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาแยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ ตามวิธีการในข้อ 3.4 ตรวจนับจำนวนด้วย ฮีมาไซโตมีเตอร์ และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละสัดส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3.5 เปรียบเทียบกันโดยในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์โดยใช้แผนการทดลอง CRD (Completely randomized design)

4. การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

เตรียมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ 5 ระดับคือ 5.4, 5.6, 5.8, 6.0 และ 6.2 ในขณะเดียวกันปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายล้าง และอาหารให้มีค่าเดียวกันกับเอนไซม์ นำใบที่หั่นฝอยอายุ 30-60 วัน ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัมต่อปริมาตรเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ไปอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ตามวิธีการในข้อ 3.4 นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในเอนไซม์ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ ตามวิธีการในข้อ 3.5 เปรียบเทียบกันโดยในแต่ละระดับของความเป็นกรด-ด่างใช้แผนการทดลอง CRD

5. การศึกษาอายุใบส้มโชกุนต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

นำใบจากต้นกล้าส้มโชกุนอายุ 30, 35, 45 และ 70 วัน หลังจากงอกของต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลองหนัก 1 กรัมต่อเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วยเซลลูเลส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์และมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายในแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 นำไปอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ ตามวิธีการในข้อ 3.4 นับจำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ที่ได้จากแต่ละอายุ ตามวิธีการข้อ 3.5 เปรียบเทียบกันในแต่ละช่วงอายุโดยใช้แผนการทดลอง CRD

6. การศึกษาเวลาการอินคูเบทใบในเอนไซม์

นำใบจากต้นกล้าส้มโชกุนอายุ 30-60 วัน จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง โดยนับอายุใบจากเมล็ดเริ่มงอกมาหั่นฝอยชั่งน้ำหนัก 1 กรัม นำไปอินคูเบทในเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์และมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 นำไปอินคูเบท บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 5 ชั่วโมง แยกและทำ บริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์และตรวจสอบความมีชีวิต ในแต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลอง CRD

7. การศึกษาแหล่งของชิ้นส่วนใบต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

นำใบจากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 30-60 วัน และใบที่ได้จากการวางเลี้ยงส่วนลำต้นในหลอดทดลองอายุ 2 เดือน มาหั่นฝอยชั่งน้ำหนักอย่างละ 1 กรัม อินคูเบทในเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์และมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 นำไปอินคูเบท บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ในแต่ละแหล่งเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลอง CRD

8. การศึกษาวิธีการเลี้ยงต่อการพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ เป็น 2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดัดแปลงวิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือวางเลี้ยงในอาหารเหลว, อาหารแข็ง และอาหารกึ่งแข็ง อาหารแข็งเติมวุ้นอากาโรสเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารกึ่งแข็งใช้ไฟต้าเจล 0.17 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในจานพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 60 x 15 มิลลิลิตร ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและการแบ่งเซลล์หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

9. การศึกษาความหนาแน่นในการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

นำใบจากต้นกล้าส้มโชกุนอายุ 30-60 วัน ที่เพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลองโดยนับอายุใบจากเมล็ดเริ่มงอก หนัก 1 กรัม นำมาหั่นฝอยแล้วจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์และ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอินคูเบท บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์

นับจำนวนโปรโตพลาสต์และปรับความหนาแน่น เป็น 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 และ 6×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 60 x 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร สังเกตลักษณะโปรโตพลาสต์และการแบ่งเซลล์หลังจากวางเลี้ยงเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่น โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD

10. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

นำใบจากต้นกล้าส้มโชกุนอายุ 30-60 วัน จากต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยนับอายุใบจากเมล็ดเริ่มงอก หนัก 1 กรัม มาหั่นฝอยแล้วจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์และ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกและทำบริสุทธิ์ โปรโตพลาสต์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์และปรับความหนาแน่นเป็น 2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 60 x 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงแสดงในตารางที่ 1 หลังจากเลี้ยงในสูตรอาหาร MS แล้วได้ทดลองวางเลี้ยงในสูตรอาหาร MT ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับสูตร MS แต่เติม GA_3 และสารสกัดจากมอลท์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในสูตรอาหาร MS ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

สูตรที่	IAA	ZEA	GA_3	BA	NAA
	มิลลิกรัมต่อลิตร				
1	0	0	0	-	-
2	0.2	0.2	2.0	-	-
3	0.2	2.0	2.0	-	-
4	0.5	2.0	2.0	-	-
5	1.0	2.0	2.0	-	-
6	2.0	0.2	2.0	-	-
7	2.0	2.0	2.0	-	-
8	-	-	-	0.5	0.5
9	-	-	-	1.0	0.5
10	-	-	-	3.0	0.5
11	-	-	-	5.0	0.5
12	-	-	-	0.5	1.0
13	-	-	-	1.0	1.0
14	-	-	-	3.0	1.0
15	-	-	-	5.0	1.0
16	-	-	-	0.5	3.0
17	-	-	-	1.0	3.0
18	-	-	-	3.0	3.0
19	-	-	-	5.0	3.0
20	-	-	-	0.5	5.0
21	-	-	-	1.0	5.0
22	-	-	-	3.0	5.0
23	-	-	-	5.0	5.0
24	-	-	-	1.0	10.0
25	-	-	-	10.0	1.0

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ GA_3 และสารสกัดจากมอลท์ ที่เติมใน
อาหารสูตร MT ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน

สูตรที่	GA_3	สารสกัดจากมอลท์
	มิลลิกรัมต่อลิตร	
1	0	0
2	0	200
3	0	400
4	0	600
5	0.1	0
6	0.1	200
7	0.1	400
8	0.1	600

วางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 2 วัน ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร

11. การศึกษาโซเดียมเอไซม์ต่อการปนเปื้อนของยีสต์

เติมโซเดียมเอไซม์ความเข้มข้น 50, 100, 150, และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน เติมลงในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น 2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร วางเลี้ยงในสภาพมืด สังเกตการปนเปื้อนของยีสต์ที่เกิดขึ้นทุก ๆ 2 วัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

บทที่ 3

ผล

1.การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดส้มโชกุน

จากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดส้มโชกุนที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก และเมล็ดที่ไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก โดยแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20, 30, 40 นาที พบว่า เวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อนาน 40 นาที ในเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อมากที่สุดคือ 99 เปอร์เซ็นต์ แต่เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำสุดทั้งในเมล็ดที่มีเปลือกหุ้ม (97 เปอร์เซ็นต์) และเมล็ดที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (92 เปอร์เซ็นต์) ส่วนเปอร์เซ็นต์การงอกนั้นพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่เวลา 20 นาทีให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งในเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มและไม่มีเปลือกหุ้ม แต่มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อต่ำสุดคือ 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มและเมล็ดที่ไม่มีเปลือกหุ้ม ตามลำดับ ที่เวลา 30 นาทีในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก เป็นเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อที่สุดเพราะว่ามีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ 98 เปอร์เซ็นต์ และยังมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงคือ 99 เปอร์เซ็นต์ ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดส้มโชกุนที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดและไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาต่างๆ ต่อการปลอดเชื้อและการงอก บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

เวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ (นาที)	ปลอดเชื้อ (%)		การงอก (%)	
	มีเปลือกหุ้ม	ไม่มีเปลือกหุ้ม	มีเปลือกหุ้ม	ไม่มีเปลือกหุ้ม
20	80	90	100	100
30	90	98	99	99
40	91	99	97	92

2. การศึกษาผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต่อการสร้างยอดรวม

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ที่ตัดแบ่งเป็น 3 ส่วนคือลำต้นส่วนปลาย ลำต้นส่วนกลาง และลำต้นส่วนโคน วางเลี้ยงทั้งสามส่วนในอาหารสูตร MT เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการวางเลี้ยงลำต้นส่วนปลายให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมมากที่สุดคือ 98 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือลำต้นส่วนกลางและลำต้นส่วนโคนให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม 64.66 และ 56.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่4) เมื่อพิจารณาถึงจำนวนยอดพบว่า ลำต้นส่วนปลายให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนมากที่สุดคือ 1.77 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือลำต้นส่วนกลางและลำต้นส่วนโคน ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน 1.6 และ 0.98 ยอดตามลำดับ ส่วนจำนวนใบต่อยอด และความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น พบว่าชิ้นส่วนปลายให้จำนวนใบและมีความยาวยอดที่เพิ่มมากที่สุด (ตารางที่ 4 ภาพที่ 1,2)

ตารางที่ 4 ผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต่อการสร้างยอดรวมบนอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

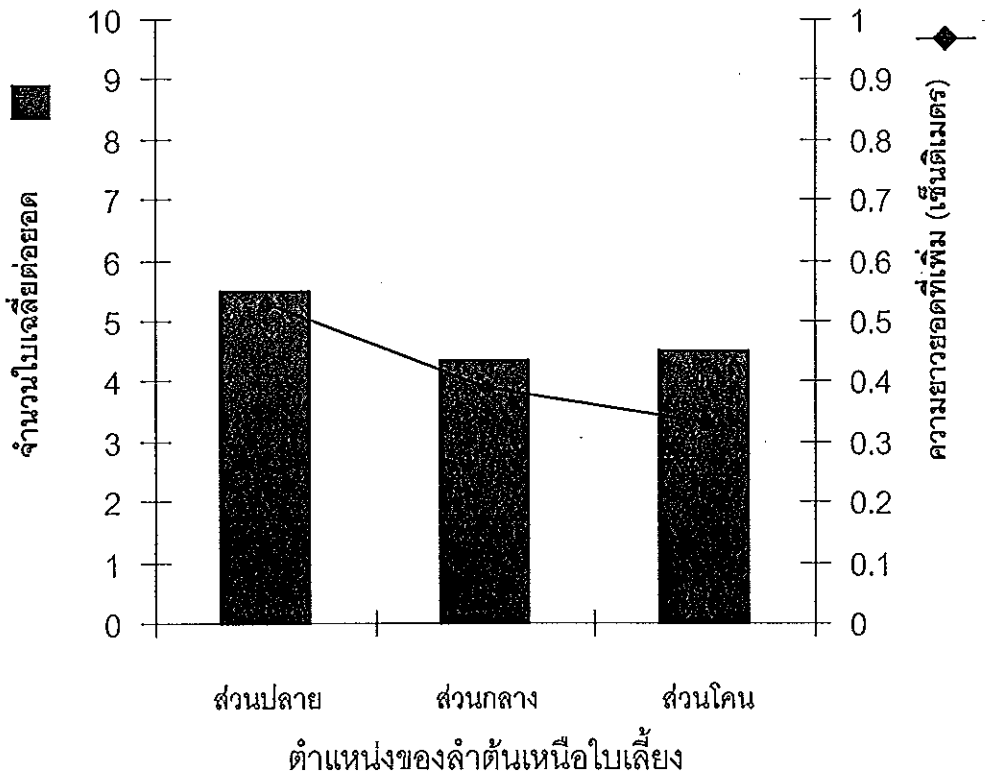
ตำแหน่งชิ้นส่วน	การสร้างยอดรวม (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)
ส่วนปลาย	98.00a	1.77a
	(75.38b)	(1.00b)
ส่วนกลาง	64.66c	1.60a
	(53.55d)	(0.95b)
ส่วนโคน	56.33cd	0.98b
	(33.33e)	(0.80b)
F-test	**	**
C.V.(%)	4.23	10.10

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P=0.01

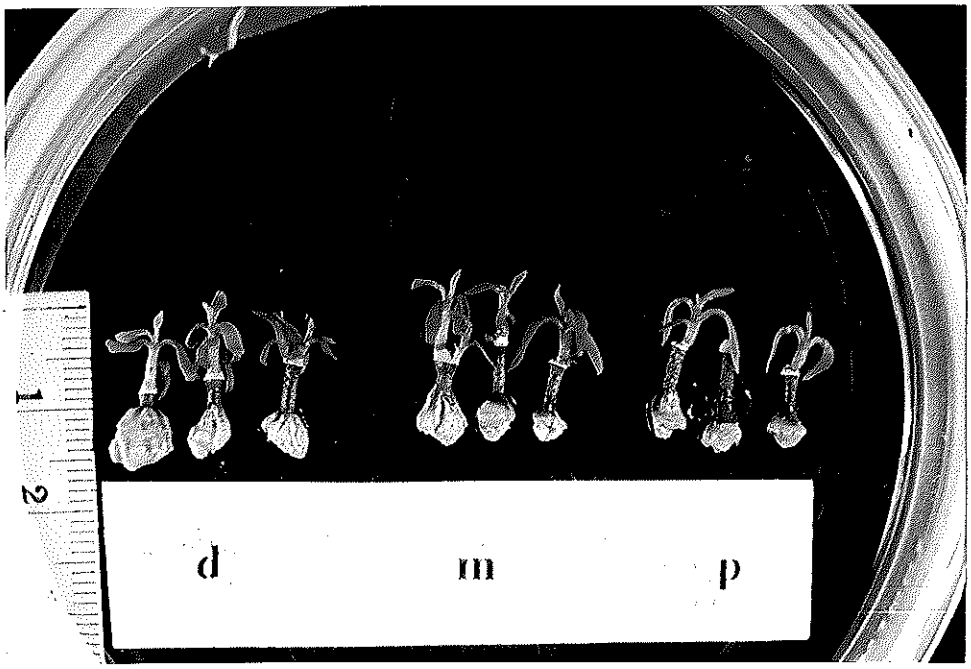
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบ ด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

ค่าในวงเล็บเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม BA

จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ศึกษาในแต่ละหน่วยการทดลอง 15 ยอด ทำ 2 ซ้ำ



ภาพที่ 1 ผลของการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงตำแหน่งต่าง ๆ ต่อจำนวนใบและความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น ในสูตรอาหาร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2 ยอดรวมและจำนวนใบต่อยอดที่ชักนำจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงตำแหน่งต่าง ๆ ในสูตรอาหาร MT เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

d : ลำต้นเหนือใบเลี้ยงส่วนปลาย

m : ลำต้นเหนือใบเลี้ยงส่วนกลาง

p : ลำต้นเหนือใบเลี้ยงส่วนโคน

3.การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์

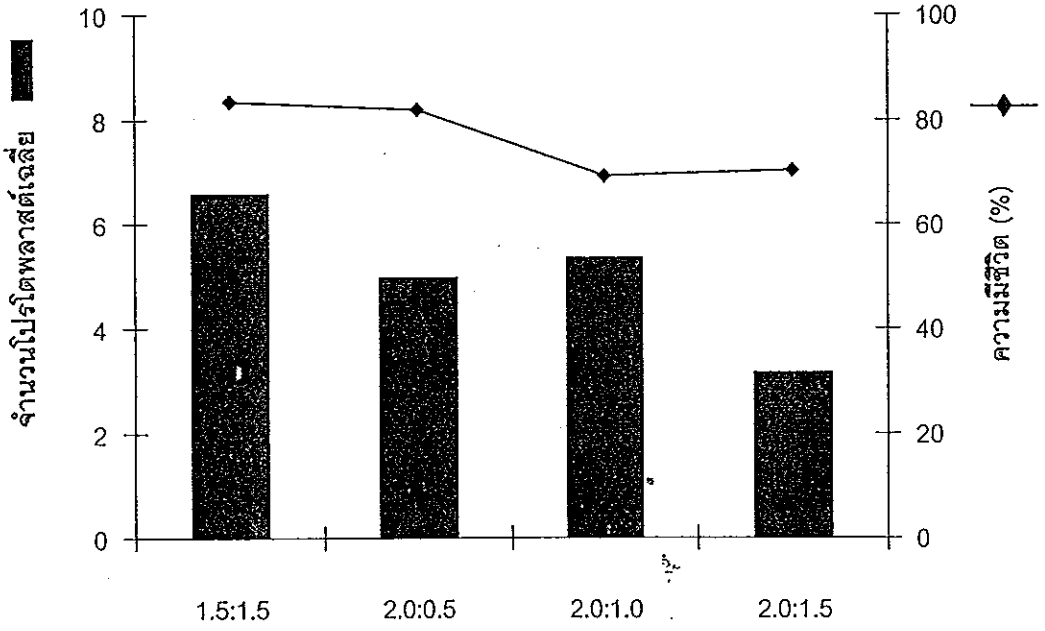
ผลจากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและมาเซอร์โรไซม์อาร์10 ความเข้มข้นต่างๆ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนอายุ 45 วัน พบว่า เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ยสูงสุด 6.59 $x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 83.63 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 ภาพที่ 3) การเพิ่มเซลลูเลสเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอร์โรไซม์อาร์10 เป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลงแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมีความสม่ำเสมอสูง(ภาพที่ 4)สำหรับความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ย้อมสีด้วย FDA (ภาพที่ 5)นั้นพบว่า ทุกความเข้มข้นร่วมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตามความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เท่ากันให้ความมีชีวิตสูงสุดจึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ จากใบอายุ 45 วัน

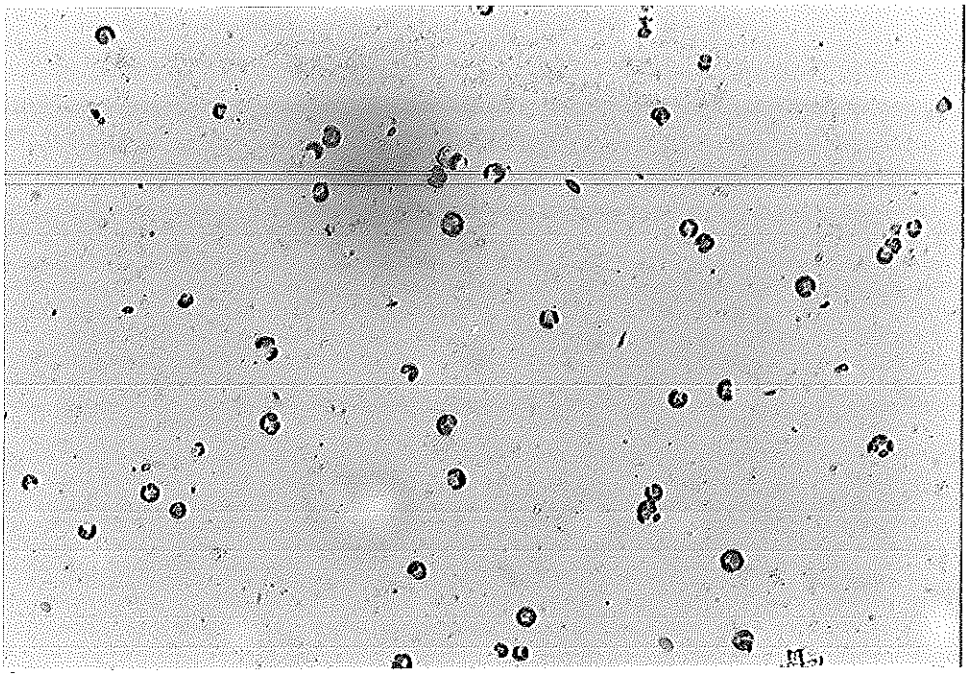
เซลลูเลส	มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย [1] (x 10^5 / กรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)
——— % ———			
1.5	1.5	6.59a	83.63a
2.0	0.5	4.96a	82.08a
2.0	1.0	5.36a	69.24b
2.0	1.5	3.15b	70.29b
F-test		**	**
C.V.(%)		37.19	17.06

ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ P = 0.01 เมื่อตรวจสอบ ด้วยวิธี DMRT

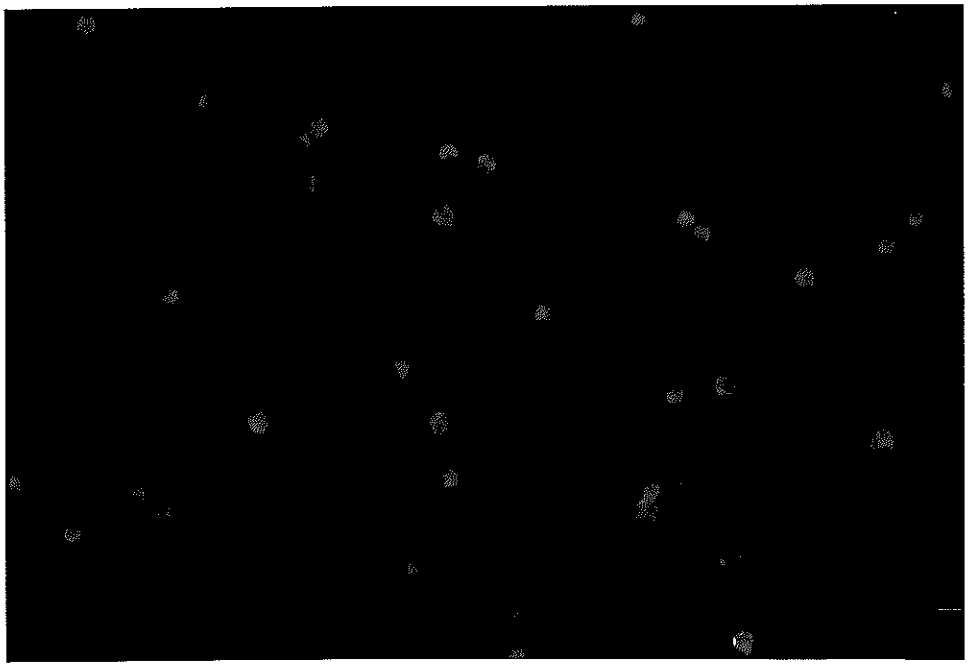
[1]ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ แต่ละเพลทคิดเป็น 1 ซ้ำ



ภาพที่ 3 ผลของเอนไซม์ความเข้มข้นต่าง ๆต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนอายุ 45 วัน (จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย x 10^5 / กรัมน้ำหนักสด)



ภาพที่ 4 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบส้มโชกุนอายุ 45 วัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (X 200)



ภาพที่ 5 โปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงสีเขียวแสดงถึงความมีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA (X 200)

4. การศึกษาความเป็นกรด-ด่างระดับต่าง ๆ ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

จากการอินคูเบทใบในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง ระดับต่างๆ พบว่าระดับที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์คือ 5.6 ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.1×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับอื่นๆ รองลงมาคือระดับความเป็นกรด-ด่าง 6.0, 5.8, 5.4 และ 6.2 ซึ่งให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 6.27×10^5 , 5.97×10^5 ,6.13×10^5 และ 2.52×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ สำหรับความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เป็นไปในทำนองเดียวกับจำนวนโปรโตพลาสต์ กล่าวคือที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ให้ความมีชีวิตสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือความเป็นกรด-ด่าง 5.8, 5.4,6.0 และ 6.2 ให้ความมีชีวิต 75, 65, 61 และ 50.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6 ภาพที่ 6)

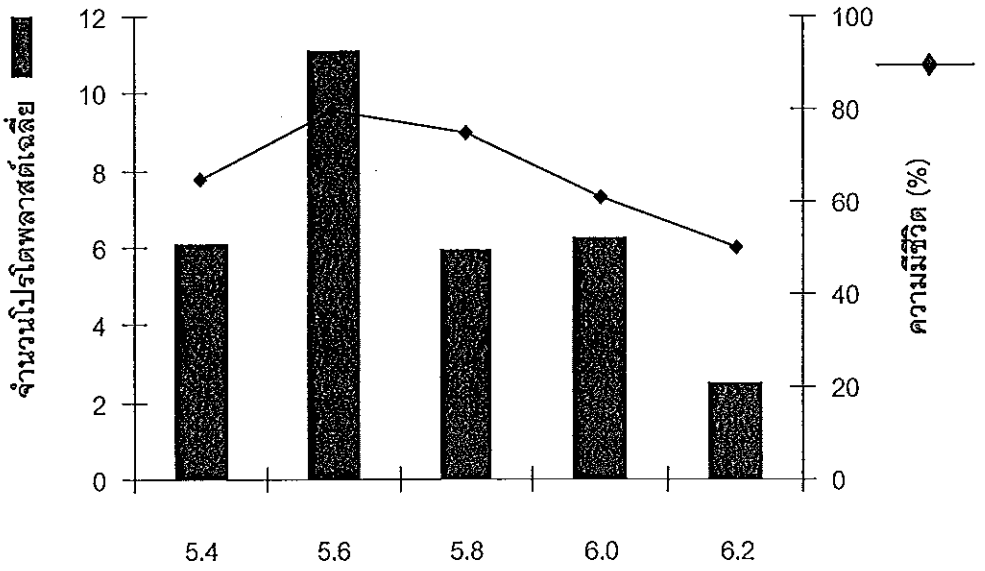
ตารางที่ 6 ผลของความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจาก ใบส้มโชกุนอายุ 30-60 วัน

ความเป็นกรด-ด่าง	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย[1] ($\times 10^5$ /กรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)
5.4	6.13 b	65
5.6	11.11 a	79.5
5.8	5.97 b	75
6.0	6.27 b	61
6.2	2.52 c	50.2
F-test	**	nd
C.V.(%)	39.08	

ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ P = 0.01 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำแต่ละเพลทคิดเป็น 1 ซ้ำ

nd : ไม่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ



ภาพที่ 6 ผลของระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์แยกจากใบอายุ 30-60 วัน ในเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์
(จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย x 10^5 /กรัมน้ำหนักสด)

5. การศึกษาอายุใบส้มโชกุนต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

จากการนำใบส้มโชกุนอายุ 30, 35, 45 และ 70 วันมาแยกโปรโตพลาสต์ ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์พบว่าใบจากต้นกล้าอายุ 35 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 6.82 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับใบอายุ 45 และ 70 วัน ส่วนความมีชีวิตนั้นพบว่า อายุใบ 35 วันให้ความมีชีวิตสูงสุดเช่นกัน รองลงมาคืออายุใบ 45 , 30 และ 70 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 7 ภาพที่ 7)

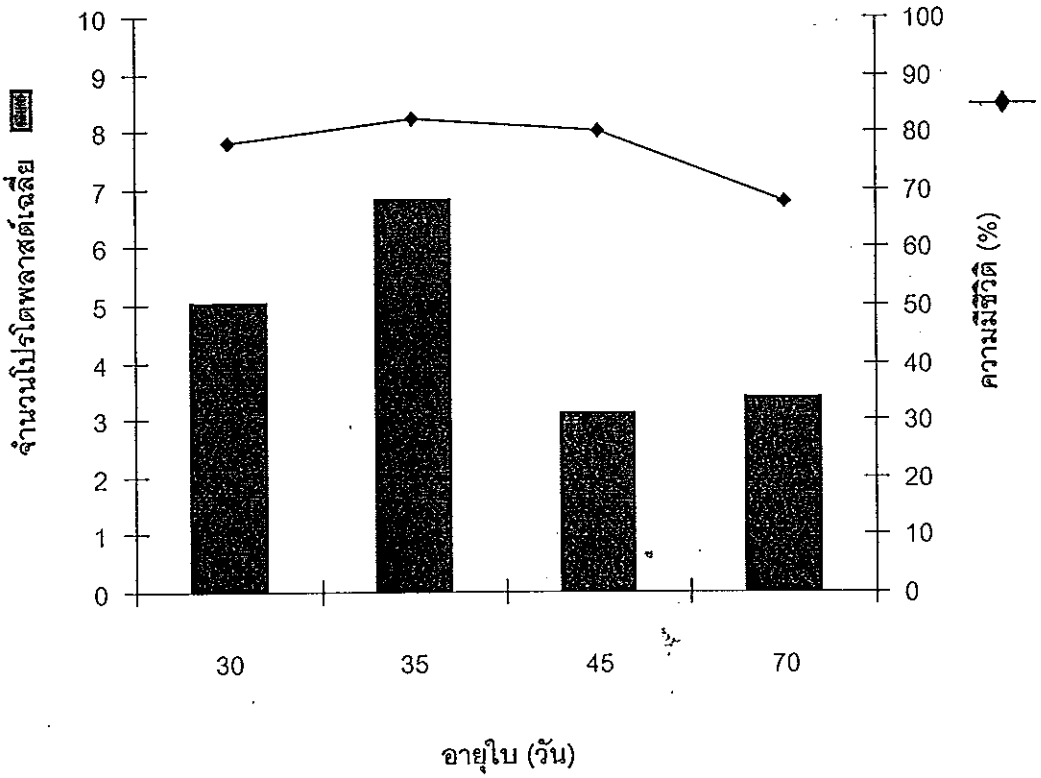
ตารางที่ 7 ผลของอายุใบส้มโชกุนต่อจำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ ที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

อายุใบ (วัน)	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย [1] (x 10^5/ กรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)
30	5.02ab	78
35	6.82a	82
45	3.10b	80
70	3.38b	68
F-test	**	nd
C.V.(%)	39.98	

ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ P = 0.01 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ แต่ละเพลทคิดเป็น 1 ซ้ำ

nd : ไม่วิเคราะห์ทางสถิติ



ภาพที่ 7 ผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย x 10^5 /กรัมน้ำหนักสด)

6. การศึกษาเวลาการอินคูเบทใบในเอนไซม์

ผลจากการอินคูเบทใบส้มโชกุนในเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า การอินคูเบทเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวน 4.53 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด สูงกว่าการอินคูเบท 3 ชั่วโมง ซึ่งให้จำนวน 3.66 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตพบว่า การอินคูเบทที่เวลา 5 ชั่วโมงให้ความมีชีวิตเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่า การอินคูเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 79.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8 ภาพที่ 8)

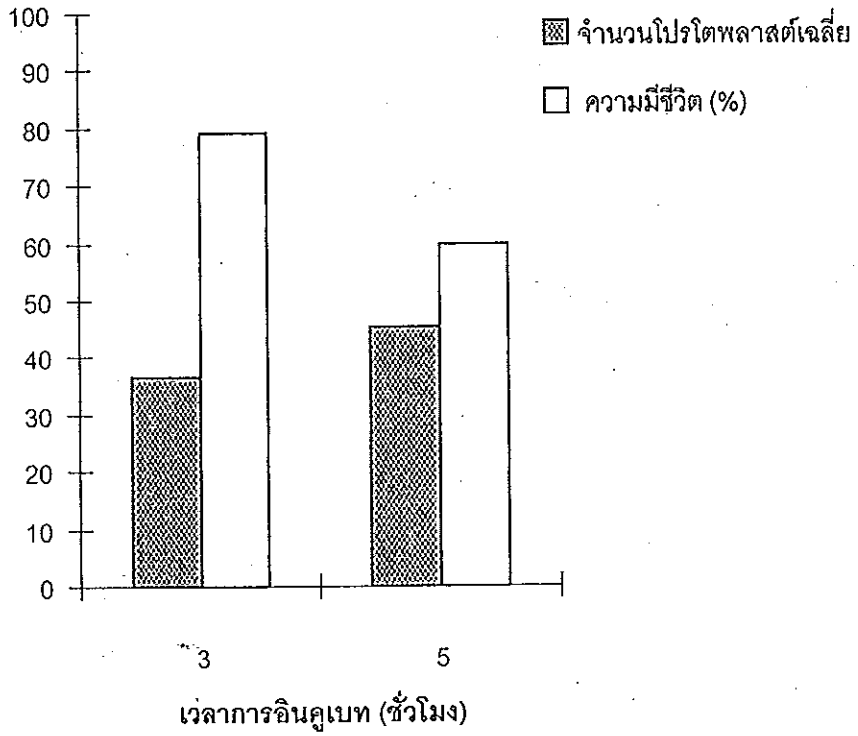
ตารางที่ 8 ผลของเวลาในการอินคูเบทใบส้มโชกุนอายุ 30-60 วันในเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย[1] (x 10^5/ กรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)
3	36.6b	79.2
5	45.3a	60.0
T-test	**	nd
C.V(%)	52.0	

จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ P= 0.01 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำแต่ละเพลทคิดเป็น 1 ซ้ำ

nd : ไม่ได้วิเคราะห์ทางสถิติ



ภาพที่ 8 ผลของเวลาการอินคูเบทใบส้มโชกุนในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอร์โรไซม์อาร์10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย x 10^5 /กรัมน้ำหนักสด)

7. การศึกษาแหล่งของชิ้นส่วนใบต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

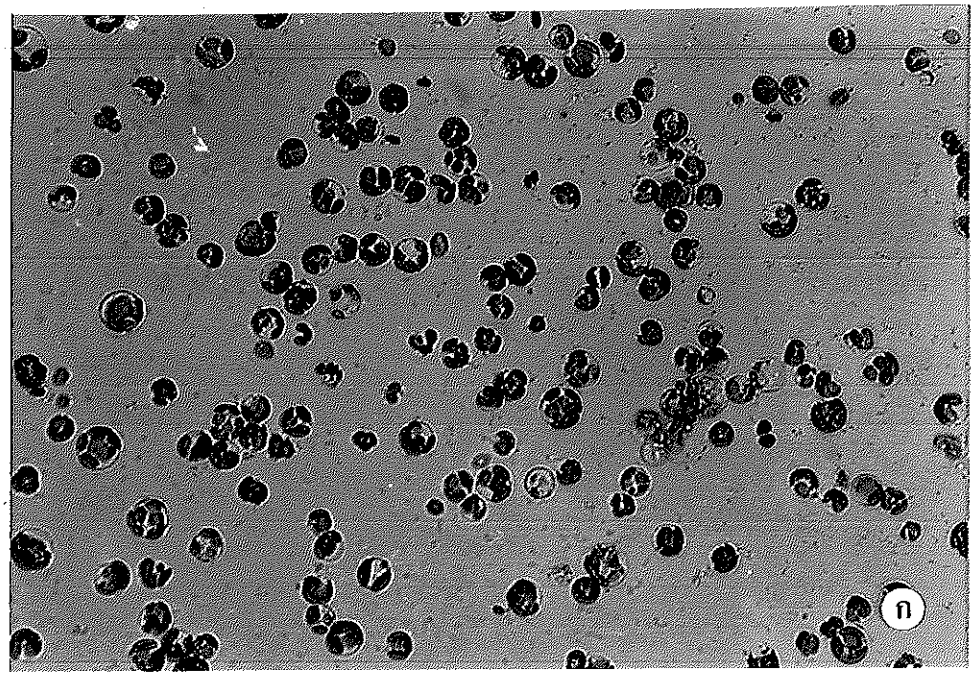
จากการเปรียบเทียบใบจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 30-60 วัน และใบจากการวางเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลาย ในหลอดทดลองอายุ 2 เดือน พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์จากใบที่ได้จากการเพาะเมล็ดให้จำนวน โปรโตพลาสต์ 5.9 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด มากกว่าโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงซึ่งให้โปรโตพลาสต์ 2.2 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบมีคลอโรพลาสต์หนาแน่นกว่า ส่วนโปรโตพลาสต์จากยอดรวมที่เพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีช่องว่างอากาศค่อนข้างมาก คลอโรพลาสต์ไม่เข้มข้นโปรโตพลาสต์แตกเป็นส่วนมากขนาดของโปรโตพลาสต์เล็กกว่าโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้า (ภาพที่9)

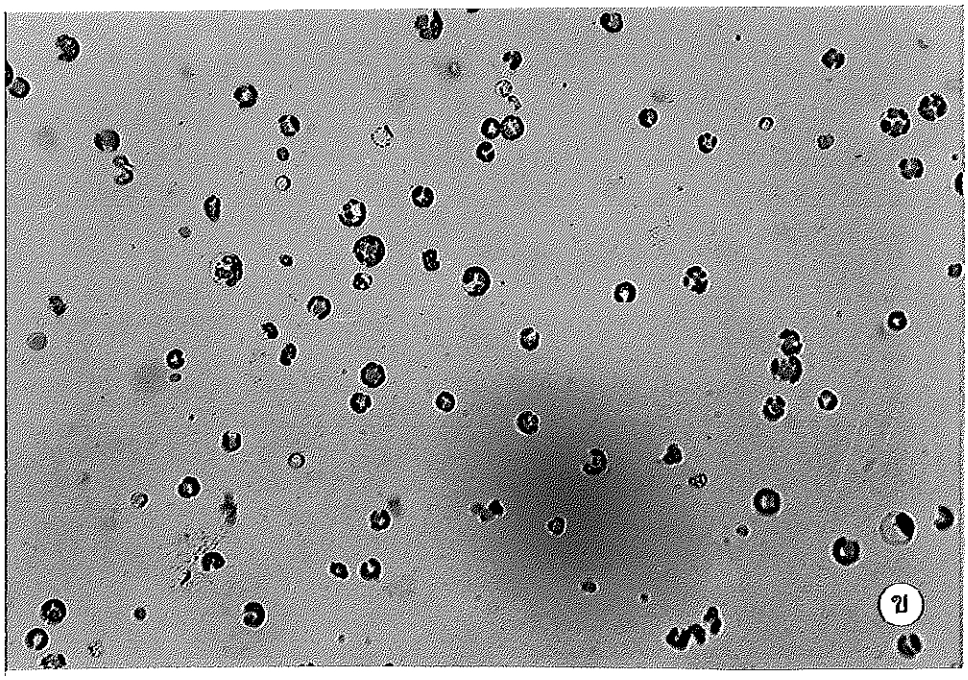
ตารางที่ 9 แหล่งของชิ้นส่วนใบต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

แหล่งของใบ	จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย[1] (x 10^5 โปรโตพลาสต์/ กรัมน้ำหนักสด)
ต้นกล้าจากการเพาะเมล็ด	5.9 a
จากยอดรวมที่เพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง	2.2 b
T-test	*
C.V. (%)	38.42

จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ P = 0.05 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำแต่ละเพลทคิดเป็น 1 ซ้ำ

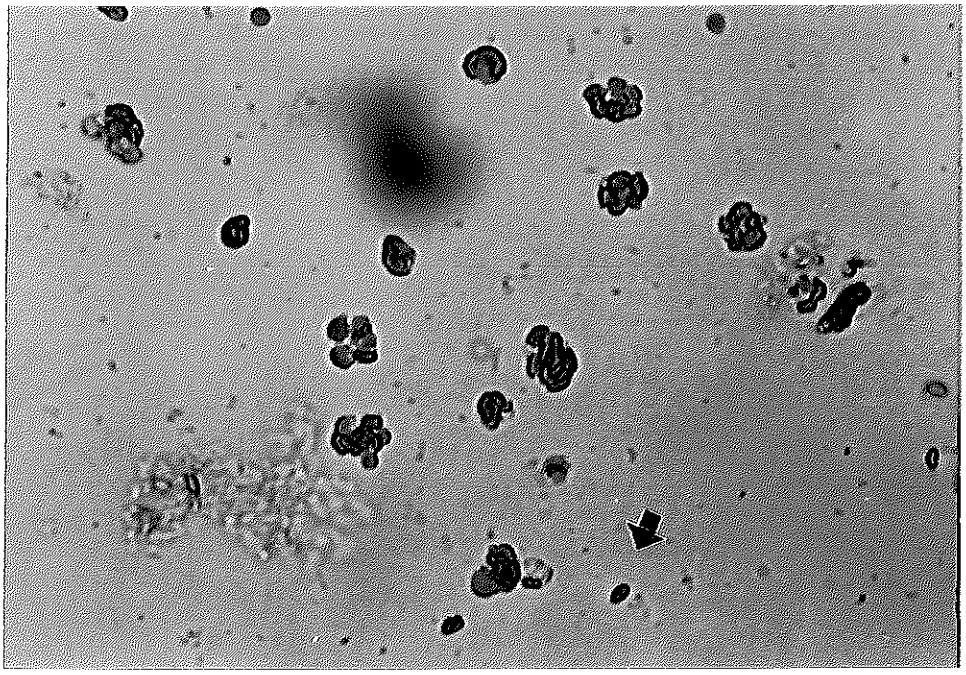




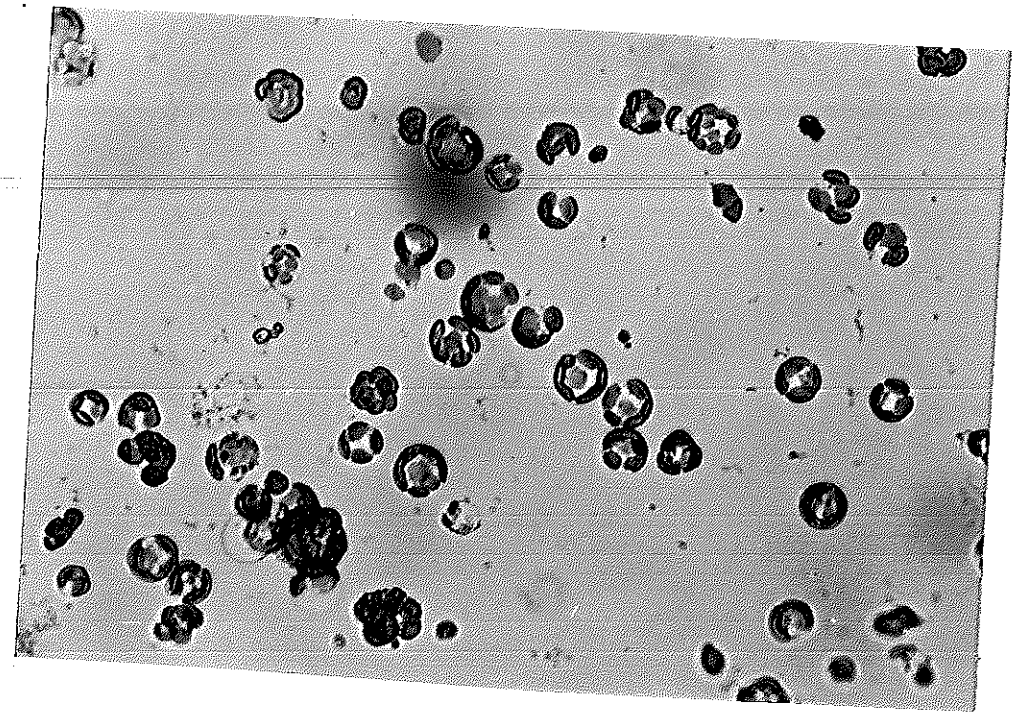
ภาพที่ 9 โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง อายุ 2 เดือน (ข) (X 200)

8. การศึกษาวิธีการเลี้ยงต่อการพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

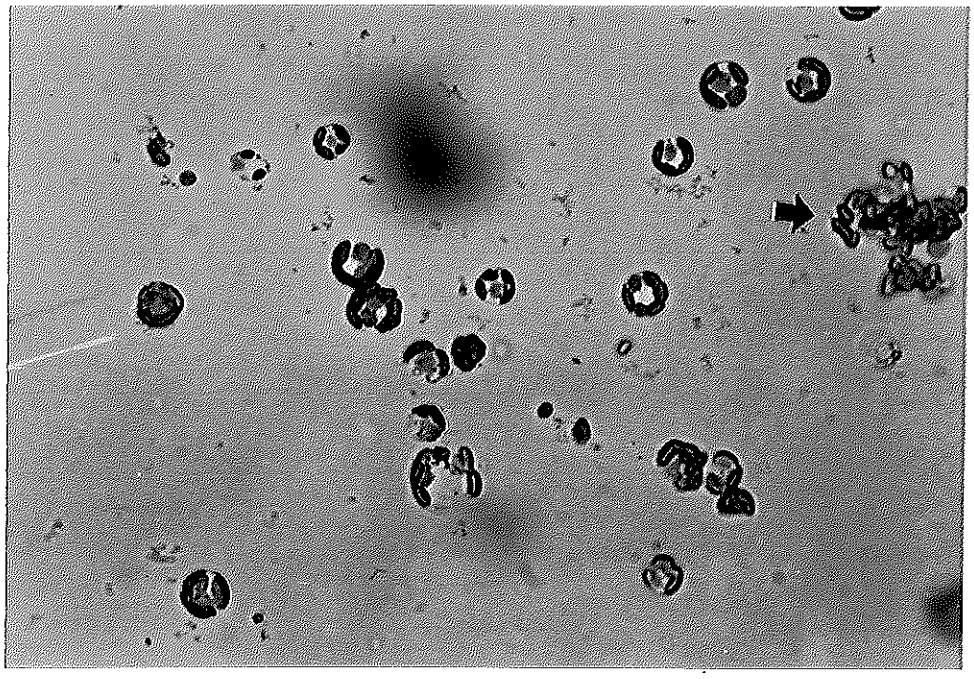
จากการวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว อาหารแข็ง และอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ในสูตรอาหาร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารแข็งหลังจากวางเลี้ยง 1-2 วัน โปรโตพลาสต์แตกมีคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปบนอาหารวุ้น (ภาพที่ 10) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวโปรโตพลาสต์ยังคงมีลักษณะกลม เขียวอยู่ได้นาน 3-4 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์กระจายสม่ำเสมอลอยอยู่ในอาหาร (ภาพที่ 11) ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวพบว่า โปรโตพลาสต์ยังคงมีลักษณะกลม เขียวอยู่ได้นาน 3-4 สัปดาห์เช่นกัน แต่มีโปรโตพลาสต์บางส่วนแตกมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โปรโตพลาสต์เกาะอยู่เป็นกลุ่มๆ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 10 โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 300) (ศรชี้แสดงคลอโรพลาสต์ซึ่งหลุดออกมาจากโปรโตพลาสต์ที่แตก)



ภาพที่ 11 โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 300)



ภาพที่ 12 โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 300) (ศรชี้แสดงโปรโตพลาสต์ที่แตก)

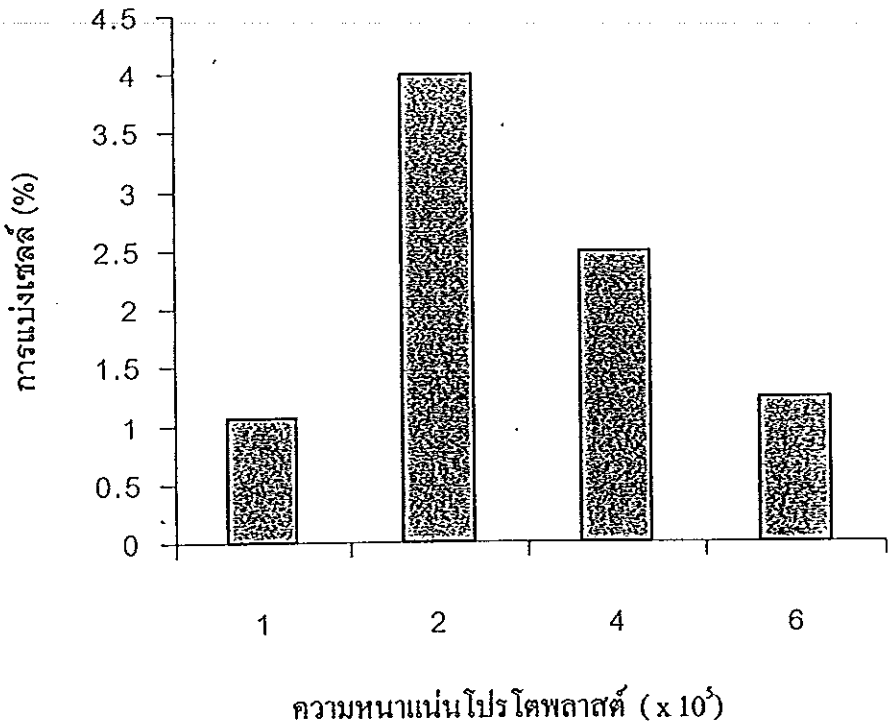
9. การศึกษาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่อความมีชีวิตและการพัฒนาการ

จากการวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS เติม IAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ZEA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความหนาแน่น 1 x 10^5, 2 x 10^5 , 4 x 10^5 และ 6 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ระดับความหนาแน่น 2 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์มากที่สุดคือ 3.98 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่ความหนาแน่น 4x10^5, 6 x 10^5 และ 1 x 10^5 มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 2.48, 1.24 และ 1.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10 ภาพที่ 13)

ตารางที่ 10 ผลของความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ ต่อการแบ่งเซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ความหนาแน่น/มิลลิลิตร	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์[1]
1 x 10^5	1.06
2 x 10^5	3.98
4 x 10^5	2.48
6 x10^5	1.24

[1]ค่าเฉลี่ยจากการวางเลี้ยง 2 เพลท



ภาพที่ 13 ผลของความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆต่อการแบ่งเซลล์หลังจากตรวจสอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ของการเลี้ยง

10. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

จากการวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าการเติม NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 4.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11 ภาพที่ 14) ภายในเวลา 1 สัปดาห์หลังการเลี้ยงและส่วนใหญ่มีการแตกหน่อเกิดขึ้นในช่วง 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ ในทุกสูตรอาหารยกเว้นอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 11 ภาพที่ 15) และการเติม BA หรือ NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่พบการแบ่งเซลล์และแตกหน่อ เซลล์แตกเป็นส่วนมาก (ตารางที่ 11) การเติม ZEA ลงไปในอาหารเหลวส่งผลให้โปรโตพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกประมาณวันที่ 14 หลังการวางเลี้ยง (ภาพที่ 15 ก) ส่วนการใช้ GA_3 ร่วมกับสารสกัดจากมอลท์ พบว่าส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากมอลท์เพิ่มขึ้นโดยมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกประมาณวันที่ 10 หลังการวางเลี้ยงและมีการแตกหน่อเล็กน้อยในช่วง 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

สูตรที่	IAA	ZEA	GA_3	BA	NAA	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ
	มิลลิกรัม/ลิตร					(%)	
1	-	-	-	-	-	0	0
2	0.2	0.2	2.0	-	-	1.0	+
3	0.2	2.0	2.0	-	-	1.2	+
4	0.5	2.0	2.0	-	-	1.0	+
5	1.0	2.0	2.0	-	-	1.6	+
6	2.0	0.2	2.0	-	-	2.1	+
7	2.0	2.0	2.0	-	-	3.2	+
8	-	-	-	0.5	0.5	0.5	+
9	-	-	-	1.0	0.5	1.0	+
10	-	-	-	3.0	0.5	1.2	+
11	-	-	-	5.0	0.5	1.3	+
12	-	-	-	0.5	1.0	2.0	+
13	-	-	-	1.0	1.0	1.1	+
14	-	-	-	3.0	1.0	1.9	+
15	-	-	-	5.0	1.0	1.5	+
16	-	-	-	0.5	3.0	1.8	+
17	-	-	-	1.0	3.0	2.5	+
18	-	-	-	3.0	3.0	1.2	+
19	-	-	-	5.0	3.0	1.7	+
20	-	-	-	0.5	5.0	2.0	+
21	-	-	-	1.0	5.0	4.3	+
22	-	-	-	3.0	5.0	3.8	+
23	-	-	-	5.0	5.0	1.5	+
24	-	-	-	1.0	10.0	0	0
25	-	-	-	10.0	1.0	0	0

(0) ไม่พบการแบ่งเซลล์ หรือแตกหน่อ, (+) มีการแตกหน่อ 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์

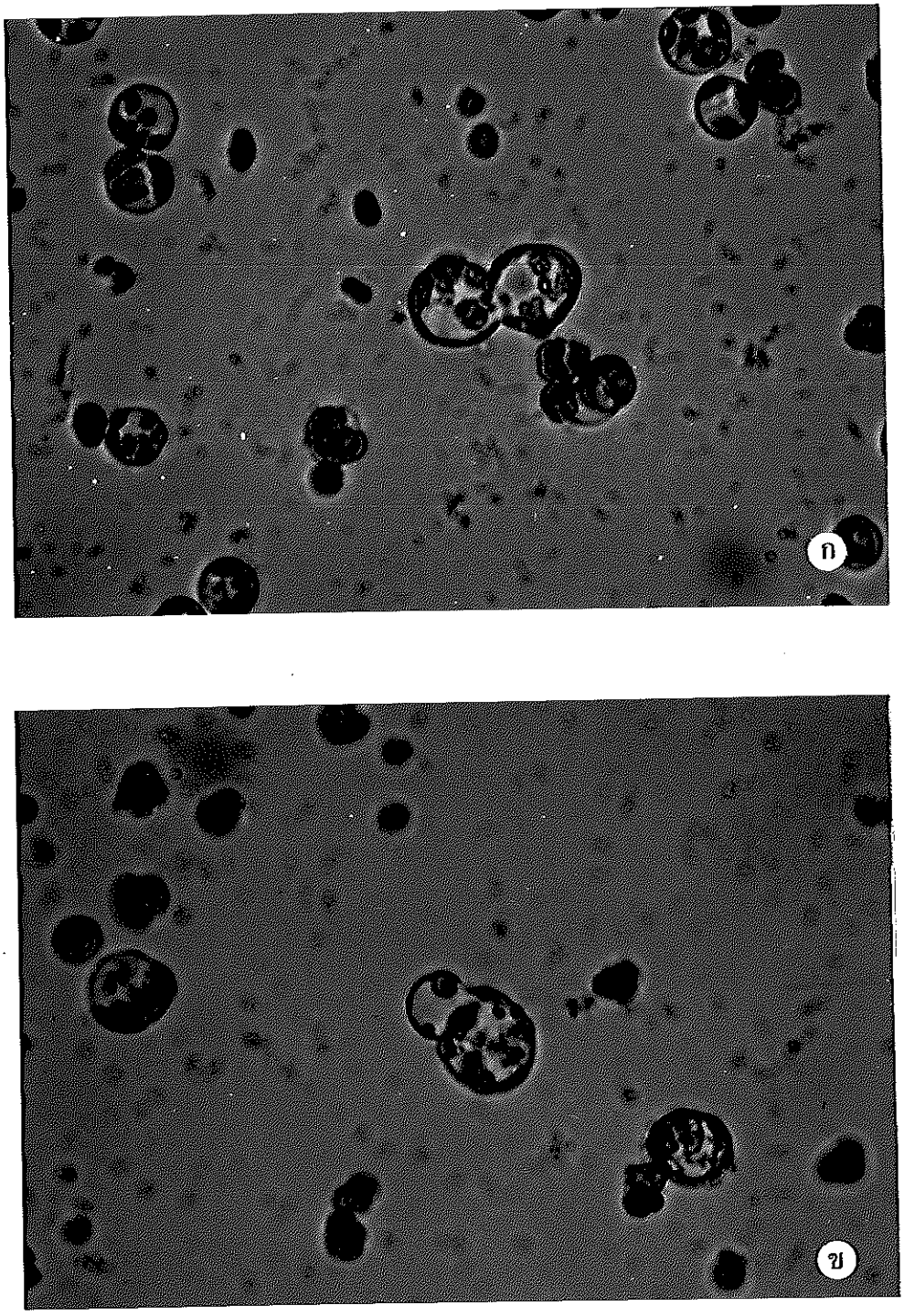
ตารางที่ 12 ผลของความเข้มข้นของ GA_3และสารสกัดจากมอลท์ที่เติมในอาหาร MT ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ

สูตรที่	GA_3	สารสกัดจากมอลท์	การแบ่งเซลล์	การแตกหน่อ
	——มิลลิกรัมต่อลิตร ——			
1	-	-	0	0
2	-	200	+	+
3	-	400	+	+
4	-	600	++	+
5	0.1	-	0	0
6	0.1	200	+	+
7	0.1	400	+	+
8	0.1	600	++	+

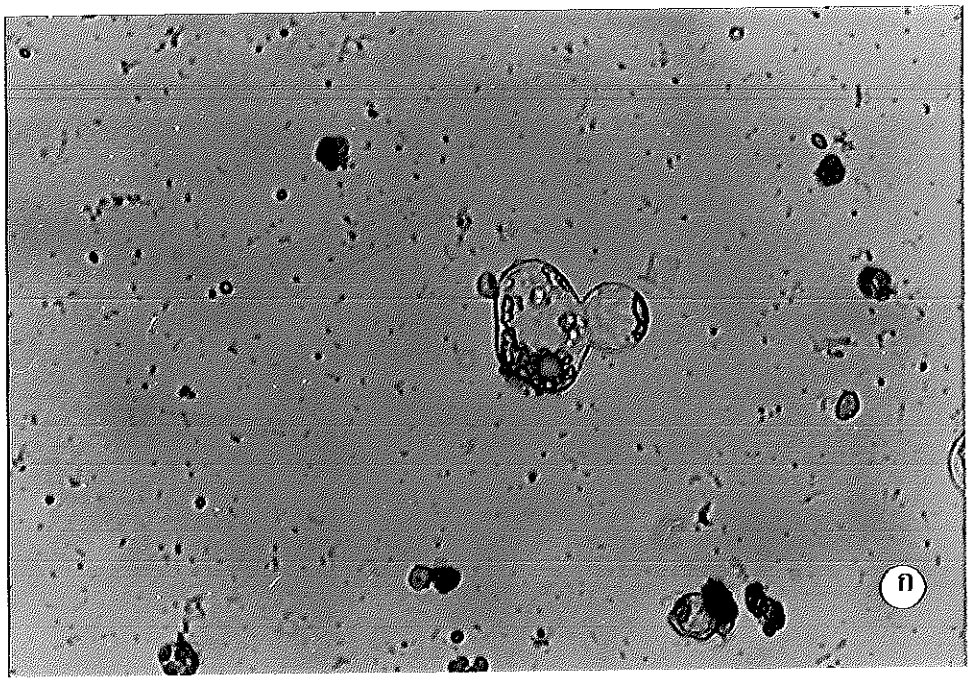
(0) ไม่พบการแบ่งเซลล์ หรือแตกหน่อ , (+) มีการแตกหน่อ/แบ่งเซลล์ 0.5-1.0 %
(++) มีการแตกหน่อ/ แบ่งเซลล์ 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์

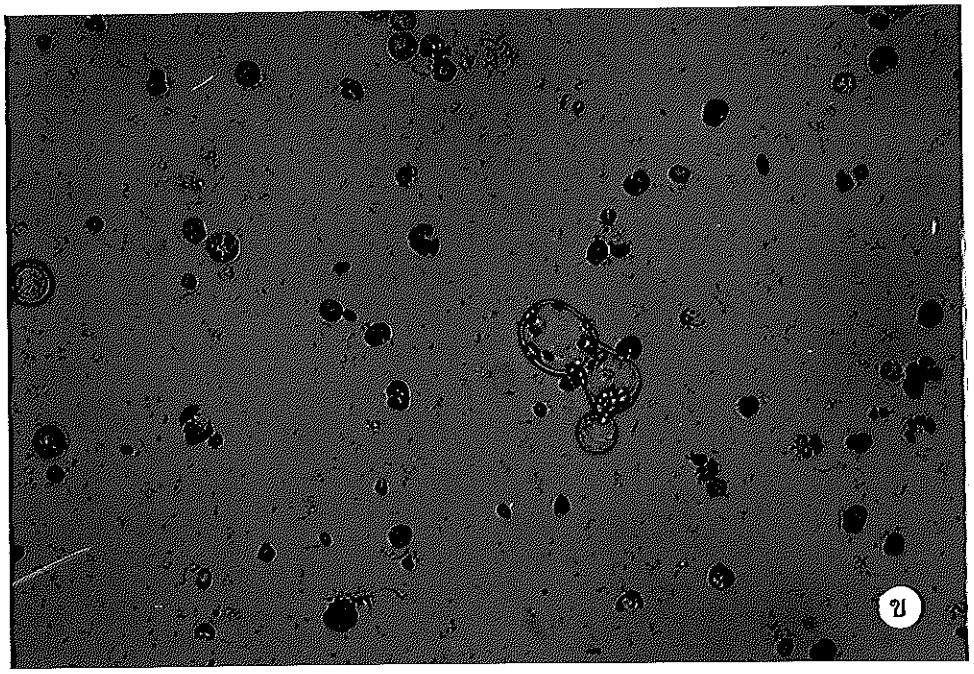
11. การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์ที่มีต่อการปนเปื้อนของยีสต์

ผลจากการเติมโซเดียมเอไซด์ลงในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์ยังมีการปนเปื้อนของยีสต์ซึ่งทำให้โปรโตพลาสต์แตกภายในเวลา 5- 15 วัน



ภาพที่ 14 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS เติม
NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 400)
ก : การแบ่งเซลล์แบบสมมาตร
ข : การแบ่งเซลล์แบบไม่สมมาตร





ภาพที่ 15 การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ ในสูตรอาหาร MS (X400)

ก : เติม IAA 2.0 ZEA 0.2 และGA_3 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยง 14 วัน

ข : เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยง 7 วัน

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุน

โดยทั่วไปเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มนั้นการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาดก่อนการเลี้ยงทำได้ลำบาก โอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์นั้นสูงมาก ทั้งนี้เนื่องจากเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่นมังคุดที่ไม่ได้กำจัดเส้นใยที่หุ้มรอบนอกเมล็ด (vascular tissue) ออกมีโอกาสปนเปื้อนสูงดังนั้นการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดในหลอดทดลองจึงต้องกำจัดเนื้อเยื่อที่หุ้มนอกเมล็ดออก ด้วยการจุ่มแช่เมล็ดในโซเดียมไบคาร์บอเนทความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 20 เปอร์เซ็นต์ (Te-chato, 1998) สธน เสนาสวัสดิ์ (2534) พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดลองกองด้วยคลอร๊อกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาทีเหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อมากที่สุด ความเข้มข้นที่สูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อเพิ่มขึ้นแต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงส่วนความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อลดลงแต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้พบว่าส้มโชกุนที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกเมื่อฟอกฆ่าเชื้อที่เวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูง และมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงเช่นกัน กฤษณา สุดทะสาร (2541) รายงานว่าการฟอกฆ่าเชื้อในเมล็ดข้าวที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดด้วยคลอร๊อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน 20 3-4 หยด นาน 30 นาที สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเมล็ดได้ดีที่สุด แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยกว่าที่เวลา 10 และ 20 นาที อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า เวลาในการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร๊อกซ์ 40 นาที ให้ผลไม่แตกต่างกับ 20 นาทีมากนัก (ตารางที่ 3)

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่จะทำให้ได้ต้นพืชเป็นจำนวนมาก นับเป็นการผลิตพืชในสภาพปลอดเชื้อใช้เป็นแหล่งชิ้นส่วนพืชในการศึกษาอื่นๆ ต่อไปได้ตลอดเวลา โดยเฉพาะการใช้ใบเป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงโอกาสประสบผลสำเร็จในการศึกษาสูงมาก ดังนั้นการศึกษาถึงการชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ของส้มโชกุนในการศึกษานี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการวางเลี้ยงของชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงตำแหน่งต่างๆ ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการวางเลี้ยงตำแหน่งส่วนปลายมีเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมมากที่สุด 98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4 ภาพที่ 1) รองลงมาคือส่วนกลางและส่วนโคน สอดคล้องกับการทดลองของ Sim และคณะ (1989) ที่วางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส่วนปลายในสูตรอาหาร MS เติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ สนธยา หนูด้วง (2541) รายงานการสร้างยอดรวมจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดว่าสูงกว่าลำต้นเหนือใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ที่เป็นเช่นนี้เพราะชิ้นส่วนปลายยอดจากต้นกล้ามีการสะสมอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงจึงส่งเสริมการสร้างยอดได้ดี นอกจากนี้จากการทดลองของ Peres-Molphe-Balch และ Ochoa-Alejo (1997) ใน maxican lime ยังพบว่าการสร้างแผลให้กับชิ้นส่วนก่อนการเลี้ยงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างยอดรวมได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาวิธีการดังกล่าวแต่คาดว่าน่าจะให้ผลในทำนองเดียวกัน ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวมเพื่อการทดลองครั้งต่อไปควรมีการสร้างแผลให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงก่อนการเพาะเลี้ยง

2. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ เพคติเนสและเซลลูเลส กลุ่มเพคติเนสทำหน้าที่ ย่อยมิดเดิลลาเมลลา กลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสใช้ย่อยผนังเซลล์ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) ในการแยกโปรโตพลาสต์มักใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดผสมกันในระดับความเข้มข้นต่างๆ อย่างไรก็ตามในบางพืชใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียว เช่นในการศึกษาของ พัฐวดี ทองสีดำ (2536) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้อะแรนด้า ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ 2 ชนิดรวมกันคือ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 และ เซลลูเลส จาก *Trichoderma viride* ซึ่งความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 3.7×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (ตารางที่ 8) มีรายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโดย Grosser และ Chandler (1987) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอเรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $2-6 \times 10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ใช้เวลาในการอินคูเบทเป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง กฤษณา สุดทะสาร (2541) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบข้าวโดยใช้เอนไซม์ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลส 2 เปอร์เซ็นต์ มาเซอร์โรไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ 2.9×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด การเติมไดรซีเลส ลงไปในอัตราความเข้มข้นต่ำช่วยเพิ่มประสิทธิภาพได้ดียิ่งขึ้นในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบแต่จากการศึกษานี้การใช้ไดรซีเลสในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน พบว่าไม่มีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ มาเซอร์โรไซม์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ อินคูเบทในที่มืดบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม 40 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมงก็เพียงพอในการแยกโปรโตพลาสต์

ความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ในพืชทั่วไปอยู่ในช่วง 5.5-5.8 จากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนคือ 5.6 เช่นเดียวกับ สมปอง เตชะโต (2530) รายงานว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของถั่วฝักยาวด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด ความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่านี้ให้จำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิตลดลง มีรายงานว่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงขึ้นมีผลต่อจำนวนหรือการแบ่งเซลล์ในถั่ว pea (Gamborg *et al.*,

1975) และ ถั่วนั่ง (Bharal and Rashid, 1980 อ้างโดย Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis, 1991) ที่เป็นเช่นนี้เพราะความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำมีการแตกตัวของอนุมูลกรด (H^+) และอนุมูลด่าง (OH^-) ออกมามากเกิดการแลกเปลี่ยนอิออนระหว่างภายในและภายนอกเซลล์มากขึ้นซึ่งส่งผลให้เกิดการรั่วของเซลล์ (Gamborg *et al.*, 1975) อย่างไรก็ตาม พัฐวดี ทองสีดำ (2536) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $3.6x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ในเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 ที่เป็นเช่นนี้เพราะพืชแต่ละชนิดมีความทนทานของความเป็นกรด-ด่างต่างกัน อย่างไรก็ตามในกรณีส้มโชกุนที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.6 ได้จำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิตต่ำ

อายุใบของพืชหรือระยะพัฒนาการทางสรีระวิทยามีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในการศึกษานี้ใช้ใบจากต้นกล้าส้มที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 35 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงอายุอื่นๆ (ตารางที่ 7) จากการศึกษาของ Grosser และ Chandler (1987) ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มพันธุ์ต่างๆ พบว่าความแปรปรวนของจำนวนโปรโตพลาสต์ขึ้นกับสภาพของใบและอายุของใบ สำหรับการทดลองนี้ในส่วนของการใช้ใบจากการวางเลี้ยงส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีจำนวน $2.2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ในขณะที่โปรโตพลาสต์จากใบที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีจำนวน $3.7x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบซึ่งได้จากการเลี้ยงส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีแวคคิวโอล (vacuole) ค่อนข้างใหญ่ มีคลอโรพลาสต์ไม่เข้มข้นเซลล์แตกมาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากใบที่ได้จากการเลี้ยงส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงเป็นใบแก้วส่วนใหญ่ และใบมีสีเขียวเหลือง เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์แตกภายใน 2 สัปดาห์ ดังนั้นในการศึกษาต่อมาจึงใช้ใบจากการเพาะเมล็ด ในกรณีของซัสเพนชันนั้นพบว่าวงจรการแบ่งเซลล์สั้นกว่า จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2534) พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของโกโก้อายุ 6 วัน เหมาะสมที่สุดเพราะช่วงนี้อยู่ในระยะลิเนียเฟส เซลล์มีการเจริญเติบโตแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว มีผนังเซลล์บางไซโตพลาสต์ซึมเข้มข้น และมีแวคคิวโอลเล็กมาก

ระยะการอินคูเบทเป็นเวลานานให้จำนวนโปรโตพลาสต์จำนวนมากแต่โปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาก่อนอยู่ในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลานานทำให้ความมีชีวิตลดลง ดังนั้นการใช้เวลาสั้นช่วยให้ผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้น โดยทั่วไปการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมักจะอินคูเบทข้ามคืน (ประมาณ 24 ชั่วโมง) แต่ในการศึกษานี้การอินคูเบทใบในเอนไซม์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงให้โปรโตพลาสต์สูง $3.7x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามการใช้เวลาการอินคูเบทเป็น 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงกว่า แต่ความมีชีวิตต่ำกว่า ดังนั้นการอินคูเบทใบในเอนไซม์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก็เพียงพอในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน

Dupuis และคณะ (1990) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์ จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของทานตะวันโดยอินคูเบทในเอนไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์ 10 เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ว่าการอินคูเบทเป็นเวลานานขึ้นทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงในอัตราส่วนที่ผกผันกัน ในกรณีที่อินคูเบทเป็นเวลานานข้ามคืนและเพื่อป้องกันความเสียหายกับโปรโตพลาสต์ที่ถูกแยกออกมาก่อน สมปอง เตชะโต (2532) ได้ใช้เทคนิคการอินคูเบทใบอ่อนปาล์มน้ำมันเป็นช่วง 3 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้เวลาใช้เวลาอินคูเบท 8-9 ชั่วโมง แล้วนำมาแยกโปรโตพลาสต์ แล้วใช้เอนไซม์ชุดเดิมทำการทรีตและอินคูเบทใบที่ผ่านการอินคูเบทครั้งแรกไว้ในสภาพเดิมต่ออีก 3-4 ชั่วโมง ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง พบว่าได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนไม่ได้ทำการแยกโปรโตพลาสต์เป็นช่วงเพราะว่าใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมงก็ได้จำนวนมากเพียงพอที่ใช้ในการศึกษาต่อไปได้

ปัจจุบันการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของส้มยังไม่มีรายงานมากนัก เช่นการศึกษาของ Grosser และ Chandler (1987) รายงานการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของส้ม 5 ชนิดคือ sour orange (*C. aurantium* L.), swingle citrumelo (*C. paradisi x Poncirus trifoliata*), carrizo citrange (*C. sinensis x P. trifoliata*), flying dragon (*P. trifoliata* L. Raf.), Chinese box orange (*Severinia buxifolia* Poir Ten.) ในอาหารเหลว สูตร BH3 (citrus leaf protoplast culture medium) ซึ่งเป็นสูตรอาหารดัดแปลงจากสูตรอาหาร MT พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นในบางครั้งแต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ ในขณะที่การศึกษานี้พบว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตรข้างต้น โปรโตพลาสต์สามารถมีการแบ่งเซลล์ได้ถึง 2 เซลล์ภายในเวลา 7 วัน อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Grosser และ Chandler (1972) มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากใบเพื่อใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อสร้างลูกผสมแล้วอาจนำไปเลี้ยงโดยอาศัยเซลล์พี่เลี้ยง (nurse culture) ต่อไป ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลวมีข้อดีคือโมเลกุลของอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ทันทีทำให้โปรโตพลาสต์ไม่ขาดแคลนสารอาหาร และยังช่วยรักษาระดับออสโมติคโพเทนเชียนทีละน้อย นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เกิดใหม่ด้วย (Evans and Cooking, 1997) อ้างโดย กฤษณา สุดทะสาร (2541) ในปัจจุบันมีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มที่แยกได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแคลเซียมอัลจิเนตบีด (Ca-alginate bead) พบว่ามีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นถึง 90 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่การเลี้ยงในอาหารเหลวมีการแบ่งเซลล์เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะแคลเซียมอัลจิเนตบีด จะช่วยป้องกันอันตรายจากโปรตีโอไลติคเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ตายแล้วที่อยู่รอบๆ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (Niedz, 1993) ในทำนองเดียวกับไม้ผลชนิดอื่นๆ เช่น การเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของแอปเปิ้ลในโซเดียมอัลจิเนตบีด (Na-alginate bead) พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้เป็นจำนวนมากในช่วง 29-49 เปอร์เซ็นต์ (Perales and Schieder, 1993) ดังนั้นการ

เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบในแคลเซียม หรือโซเดียมอัลจิเนตบีด น่าจะให้ผลดีเช่นกัน ในการศึกษาการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนครั้งต่อไปควรเลี้ยงในแคลเซียมหรือโซเดียมอัลจิเนตบีดและใช้สูตรอาหารดังกล่าว นอกจากนี้อาจเพิ่มศักยภาพในการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์โดยการรวมโปรโตพลาสต์จากใบและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส แล้วนำไปเลี้ยงในแคลเซียมหรือโซเดียมอัลจิเนตบีดต่อไป

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงก็เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ Niedz (1993) รายงานว่าความหนาแน่นที่มากเกินไปเป็นสาเหตุในการยับยั้งการพัฒนาของโปรโตพลาสต์เนื่องจากมีการปล่อยโปรตีโอไลติคเอนไซม์จากเซลล์ที่ตายอยู่รอบ ๆ ออกมาทำอันตรายต่อเซลล์ที่ปกติ ส่วนการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่น้อยเกินไปก็อาจทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แบ่งตัวและตายในเวลาต่อมา เนื่องจากมีสารพวกเมตาบอไลท์ (metabolite) ที่โปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์ปล่อยออกมามีน้อย ซึ่งสารนี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao and Michayluk, 1974) จากการศึกษาการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มโชกุนในการศึกษานี้พบว่าความหนาแน่น 2 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรมีการแบ่งเซลล์ดีที่สุด สอดคล้องกับ Hidaka และ Kajiura (1988) ซึ่งรายงานว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสที่ความหนาแน่นในช่วง 10^5-10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการสร้างแคลลัสในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของส้มได้ดี อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนยังไม่สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ คงมีการแบ่งเซลล์เพียง 2 เซลล์เท่านั้น

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้นพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ชนิดของอาหารที่เพาะเลี้ยงขึ้นกับพืช โดยทั่วไปความต้องการสารอาหารพื้นฐานของโปรโตพลาสต์จะเหมือนกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยง การดัดแปลงสูตรอาหารโดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิดช่วยเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มักใช้สูตรอาหาร MS เป็นสูตรพื้นฐาน การเติมออกซินและไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และมีการแบ่งตัว (Evans and Bravo, 1983) Shimizu (1985) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ขององุ่นบางพันธุ์มีการแบ่งเซลล์ได้เมื่อเติม 2,4-D เข้มข้น 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.6-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ออกซิน และไซโตไคนินชนิดอื่นไม่มีประสิทธิภาพในการชักนำการแบ่งเซลล์ ความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับพันธุ์ Katsirdakis and Roubelakis-Angelakis (1992) พบว่าต้องใช้ NAA 15x10^{-6} โมลาร์ ความเข้มข้นสูงกว่า 6-BAP ซึ่งใช้ 2.3x10^{-6} โมลาร์ สำหรับการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ขององุ่นพันธุ์ Santanina เนื่องจากโปรโตพลาสต์ต้องการออกซินเพื่อช่วยในการสร้างผนังเซลล์ เช่นเดียวกับการศึกษานี้พบว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหาร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตพลาสต์จากใบมีการแบ่งเซลล์ดีที่สุด ส่วนการ

เติม สารสกัดจากมอลท์ และ GA_3 ในอาหารสูตร MT พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากมอลท์สูง 600 มิลิกรัมต่อลิตร โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 1-3 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Burger และ Hackett (1981) รายงานว่าการเติมสารสกัดจากมอลท์ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากส่วนใบเลี้ยงของส้ม เพิ่มประสิทธิภาพในการแบ่ง เซลล์มากกว่า 2 เท่า อย่างไรก็ตามการเลี้ยงโปรโตพลาสต์มักมีปัญหาในการปนเปื้อนจากยีสต์ ดังนั้นได้ทดลองใช้โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) ซึ่งเป็นสารกำจัดจุลินทรีย์ และป้องกันการปนเปื้อนจากยีสต์ จากการทดลองพบว่าทำให้โปรโตพลาสต์แตกภายใน 5-15 วัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะมีรายงานว่าโซเดียมเอไซด์ไปมีผลทำให้ผนังเซลล์โป่งพองเปลี่ยนโครงสร้างของไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ (Robisson and Schlosser, 1978 อ้างโดย Theodoropoulos and Robelakis-Angelakis, 1992) และจากการทดลองของ Theodoropoulos และ Robelakis-Angelakis (1992) พบว่าโซเดียมเอไซด์มีผลไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของกลูโคสเข้าสู่โปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ดังนั้นการเลือกใช้วัสดุพืชที่ปลอดเชื้อจากหลอดทดลอง และอุปกรณ์ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้ออย่างดีจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันการปนเปื้อนจากยีสต์

บทที่ 5

สรุป

1. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดส้มโชกุนที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 วินาที แล้วแช่ในคลอร๊อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การงอก และปลอดเชื้อดีที่สุด 99 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
2. ลำต้นเหนือใบเลี้ยงส่วนปลายให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนมากที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม 98 เปอร์เซ็นต์ และ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น 1.7 ยอด
3. เอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนคือเซลลูเลสจาก *Trichodema viride* เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ มาเซอร์โรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม
4. ความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 5.6 เหมาะสมในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.1 $x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 79.5 เปอร์เซ็นต์
5. อายุใบที่เหมาะสมในการนำมาแยกโปรโตพลาสต์ได้จากใบอายุ 35 วัน ให้จำนวน 6.8 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มดีกว่าใบช่วงอายุอื่น ๆ
6. เวลาที่เหมาะสมในการอินคูเบทในเอนไซม์คือ 3 ชั่วโมง ให้โปรโตพลาสต์ 3.66 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 79.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มเวลาการอินคูเบท เป็น 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้นแต่ความมีชีวิตลดลง
7. การใช้ใบจากการวางเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงไม่เหมาะสมในการนำมาแยกโปรโตพลาสต์ เพราะมีช่องว่างอากาศมาก คลอโรพลาสต์ไม่เข้มข้น
8. อาหารเหลวเหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุนมากที่สุด
9. ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มโชกุนคือ 2 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร
10. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในสูตรอาหาร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุดภายในเวลา 1 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 4.3 เปอร์เซ็นต์
11. โซเดียมเอไซด์ทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 50 - 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนจากยีสต์ได้

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน สินสุวรรณ และปราณี ฮัมเมอร์ลิ้งค์. 2534. โปรโตพลาสต์ และ Microculture technique. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กฤษณา สุดทะสาร. 2541. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและโปรโตพลาสต์ข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์. 2534 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2536. พืชหลักปักษ์ใต้. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ปิรามิด.

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

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2536. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะนาว. แก่นเกษตร. 21 : 36-48.

พัฐวดี ทองสีดำ. 2536. การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

มงคล แซ่หลิม. 2535. การผลิตส้ม. ภาควิชาพืชศาสตร์. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

มงคล แซ่หลิม และ วิจิตต์ วรรณชิต. 2528. ไม้ผลเมืองร้อน. ภาควิชาพืชศาสตร์. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนธยา หนูด้วง. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุน (*Citrus reticulata Blanco.*) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สมปอง เตชะโต, เจริญ สิงห์ลอ, สาลี ดนัยสร และ อารี กังแฮ. 2532. การใช้โปรโตพลาสต์เพื่อเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. รายงานการสัมมนาทางวิชาการปาล์มน้ำมัน 16-17 พ.ค. 2532. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สมปอง เตชะโต. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. ภาควิชาพืชศาสตร์. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานคริทร์

สธน เสนาสวัสดิ์. 2534. การขยายพันธุ์ลองกองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Burger D.W. and Hackett W.P. 1981. Protoplast culture of several citrus tissues. HortScience 16 : 417

Catherine, B., Maric-Christine, C., Monica, G., Gerard, V. and Yves, C. 1990. Importance of myo-inositol, calcium and ammonium for the viability and division of tomato (*Lycopersicon esculentum)* protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23 : 27-37.

Deng, X. X., Grosser, J. W. and Gmitter, F. G. 1992. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplasts fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar ' Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. Scientia Horticulturae 49 : 55-62.

Dupuis, J.M., Pean, M. and Chagvardieft, P. 1990. Plant donor tissue and isolation proceduer effect on early formation of embryoids from protoplasts of *Helianthus annus* L.. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22 : 183-189.

Esmilda, H. P. and Schieder, O. 1993. Plant regeneration from leaf protoplast of apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 71-76.

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

Gamborg, O.L., Shyluk, J.P. and Kartha, K.K. 1975. Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from the shoot apices of *Pisum sativum* L. Plant Sci. Lett. 4 : 285-289.

Grosser, J.W. and Chandler, J.L. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus poncirus, Citrus x Poncirus* hybrid and *Severinia* for use in somatic hybridization experiment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31 : 253-257.

Hidaka, T. and Kajiura, I. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. Scientia Horticulturae 34 : 85-92.

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

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

Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfafa. Z. Pflanzenphysiol. 96 : 135-141.

Katsirdakis, K. C. and Roubelakis-Angelakis, K. A. 1991. Modified culture condition for increased viability and cell wall synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Sultanina) leaf protoplasts. Plant Cell Reports 28 : 255-260.

Kunitake, H., Kagami, H. and Mii, M. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc). Scientia Horticulturae 47 : 27-33.

Ling, J. T., Nito, N and. Iwamasa, M. 1989. Plant regeneration from protoplasts of calamondin (*Citrus mandurensis* Lour). Scientia Horticulturae 40 : 325-333.

Ling, J. T., Nito, N., Iwamasa, M. and Kunitake, H. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of satsuma. HortScience 25 : 970-972.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 5 : 473-497.

Murashige, T. and Tucker, D. P. H. 1969. Growth factor requirments of citrus tissue culture. Proe. First Intern. Citrus Symp. 3 : 115-1161.

Navarro, L. 1984. Citrus tissue culture. *In* Micropropagation of Selected Rootcrops, Palm, Citrus and Ornamental Species. (ed. Joint FAO/IAEA Food and Agriculture Organization of the United Nation) pp. 113-154 Rome : IAEA.

Niedz, P. R.1993. Culturing embryogenic protoplasts of 'Hamlin' sweet orange in calcium alginate beads. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 19-25.

Normah, M. N., Hamidah, H. and Ghani, F. D. 1997. Micropropagation of *Citrus halimii* - an endangered species of South- East Asia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50 : 225-227.

Peres-Molphe-Balch, E. and Ochoa-Alejo, N. 1997. In vitro plant regeneration of mexican lime and mandarin by direct organogenesis . HortScience 32 : 931-934.

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

Price, G. E. and Earle, E. 1984. Source of orchid protoplasts for fusion experiments. Amer. Orch. Soc. Bull. 53 : 1035-1043.

Shimizu, J-L. 1985. Cell regeneration and division of grape mesophyll protoplasts. J. Plant. Physiol. 119 : 419-424.

Sim , G. E., Goh, C. J. and Loh, C. H. 1989. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco multiple bud formation from shoot and explant in the presence of 6- benzylaminopurine. Plant Science 59 : 203-210.

Spiegel-Roy, P. and Vardi, A. 1984. Citrus. *In* Handbook of Plant Cell Culture. (eds. P.V. Amirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, and Y. Yamada) Vol. 3, pp. 371. New York: Macmillan Publishing Company.

Te-chato, S. 1998. Recent potential in the biotechnology of mangosteen I : Micropropagation . Songkhlanakarin J. Sci. Technol. 20 : 275-284

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

Touruan-Mathius, N. 1992. Protoplasts isolation and culture of *Coffea arabica* L. *In* Biotechnology for Forest Tree Improvement. (eds. R.C. Umaly, I. Umboh, S. S. Tjitrosomo and N. M. Noor) pp. 89-97 Borgor: Seameo Biotrop.

Wenbin, L. and Zhenghua, C. 1983. Protoplast culture and fusion in perennial crops. *In* Handbook of Plant Cell Culture. (eds. Z. Chen, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and M.R. Sondahl) Vol. 6, pp. 92-115 New York : MacGraw-Hill Publishing Company.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่1. องประกอบของอาหารสูตร MS และ MT

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัม/ลิตร) MS	MT
1. ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO	1,650.00	1,650.00
KNO_3	1,900.00	1,900.00
KH_2PO_4	170.00	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	370.00
2. ธาตุอาหารรอง		
KI	0.83	0.83
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CoCl_2 6H_2O$	0.025	0.025
3. ธาตุเหล็ก		
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80
Na_2EDTA	37.30	37.30
4. สารอินทรีย์		
Myo-inosital	100.00	-
Nicotinic acid	0.50	2.462
PyridoxineHCl	0.50	2.467
ThiamineHCl	0.10	10.119
Glycine	2.00	1.953
Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์		
Mannital 0.7 โมลาร์		
pH 5.6		

ภาคผนวกที่ 2. องค์ประกอบของสารละลายล้างโปรโตพลาสต์

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1. ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
2. ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
3. ธาตุเหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
แมนนิทอล 0.7 โมลาร์	
pH 5.6	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว อุมาพร ศรีภักดี

วัน เดือน ปี เกิด 30 สิงหาคม 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2535

สถานที่ทำงาน ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์