บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย (ครรชิต, 2541) และเหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f) เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นกล้วยไม้สกุลหวายไทยแท้ ที่มีแหล่งกำเนิดในผืนป่าแถบเทือกเขาคิชกูฏและเทือกเขาสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ออกดอกปีละหนึ่งครั้ง หายาก และราคาแพง จึงทำให้กล้วยไม้เหลืองจันทบูรถูกลักลอบนำออกจากป่าเพื่อการค้าจนแทบสูญพันธุ์ กล้วยไม้เหลืองจันทบูรเป็นกล้วยไม้สกุลเดียวกับ เอื้องปากนกแก้ว เอื้องเงินแดง เอื้องดอกมะขาม เอื้องคำปอน เป็นต้น โดยปกติกล้วยไม้เหลืองจันทบูรมีลำลูกกล้วยที่มีลักษณะยาว บางต้นอาจยาวถึง 75 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางต้น 1-1.5 เซนติเมตร เมื่อต้นแก่จะมีลักษณะเป็นสีเหลือง ออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงเมษายน ออกดอกตามข้อของลำต้นเป็นช่อๆ ละประมาณ 2-4 ดอก ขนาดดอกโตประมาณ 3.5-5.5 เซนติเมตร ดอกบานทน 3-4 สัปดาห์ กล้วยไม้ชนิดนี้มี 2 พันธุ์ คือพันธุ์ที่มีดอกสีเหลืองล้วน (ภาพที่ 1ก) ออกดอกช่วงแรกจะมีสีเหลืองอ่อนแล้วค่อยๆ เข้มขึ้นจนเป็นสีจำปา ปากมีสีเข้มกว่ากลีบ ที่โคนปากมีขน ซึ่งพันธุ์นี้จะหายาก และพันธุ์ที่มีแต้มสีม่วงแดง 2 แต้ม (ภาพที่ 1ข) ที่บริเวณโคนกลีบปากและโคนปากมีขนเช่นเดียวกัน (อบฉันท์, 2543; สมพร, 2547)

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการขยายพันธุ์ เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นและการแยกโปรโตพลาสต์ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์และเพื่อเป็นประโยชน์ในการปลูกถ่ายข้อมูลทางพันธุกรรม การรวมโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้พืชต้นใหม่ ซึ่งการแยกโปรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนมากนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน (สมปอง, 2536) สำหรับในกล้วยไม้เหลืองจันทบูรยังไม่มีรายงานการแยกโปรโตพลาสต์มาก่อน ดังนั้นในรายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเพื่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป ในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

ก

ข

ภาพที่ 1 พันธุ์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f)

(ก) : พันธุ์ที่มีดอกสีเหลืองล้วน

(ข) : พันธุ์ที่มีแต้มสีม่วงแดง 2 แต้ม

ที่มา : อบฉันท์ (2543)

การตรวจเอกสาร

โปรโตพลาสต์ หมายถึง เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เซลล์พืชทุกชนิดนอกจากมีเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว แต่ละเซลล์เชื่อมกันด้วยมิดเดิลลาเมลลา ซึ่งประกอบด้วยสารพวกเพกติน ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องใช้เอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ เพกติเนส ใช้สำหรับย่อยมิดเดลลาเมลลา กลุ่มเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลสใช้สำหรับย่อยผนังเซลล์ (ประศาสตร์, 2538) โดยมี 2 วิธีใหญ่ๆ คือ โดยวิธีกล วิธีนี้ใช้ใบมีดที่มีความคมเฉือนใบให้มีขนาดเล็กมาก (หั่นฝอย) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูง ทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ได้ แต่วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากขั้นตอนยุ่งยาก และได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย ความมีชีวิตต่ำ และมีเศษเซลล์จำนวนมากยากต่อการศึกษาทางสรีรวิทยา และอีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายนั่นคือ การใช้เอนไซม์ วิธีนี้ค้นพบโดย Cocking (1960) อ้างโดย สมปอง เตชะโต (2539) การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์อาจแยกเป็นสองขั้นตอน หรือใช้ขั้นตอนเดียวโดยการผสมเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ซึ่งเอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระคือ มาเซอร์โรไซม์ เมื่อแต่ละเซลล์หลุดออกมาเป็นอิสระแล้ว ทำการย่อยผนังเซลล์ด้วยเซลลูเลส องค์ประกอบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้โปรโตพลาสต์เป็นจำนวนมาก (สมปอง, 2539) การแยกทำได้โดยนำเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เอนไซม์อาจเป็นชนิดเดียวหรือสองชนิดรวมกันก็ได้ โดยโปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากทุกส่วนของพืช เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และผล หรืออาจแยกได้จากเซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัส แต่เนื้อเยื่อใบ และเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นที่นิยมในการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากทั้งสองแหล่งให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูง และโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ โปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อนำมาเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ภายใน 1-3 วัน หลังจากนั้นแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์และเจริญเป็นแคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ในเวลาต่อมา (คำนูณ, 2539; อารีย์, 2541)

การแยกโปรโตพลาสต์และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ ในปัจจุบันประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด สำหรับการศึกษาการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

1.1 วัสดุพืช

แหล่งของวัสดุพืชโดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 แหล่ง คือ พืชที่ปลูกนอกหลอดทดลอง และพืชที่อยู่ในหลอดทดลองซึ่งรวมทั้งแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น โปรโตพลาสต์ที่แยกจากแหล่งที่ต่างกันมีความต้องการสภาวะต่างๆ ในการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ต่างกันออกไป ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมีข้อดีคือ สามารถหาวัสดุง่าย ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มาก ความมีชีวิตสูงภายใต้สภาพการแยกที่เหมาะสม (Wenbin and Zhenghua, 1983) มีรายงานการใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ในการแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ เช่น การใช้ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสม *Renantanda* Rosalind Cheok (Teo and Neuman, 1978) โปรโตคอร์ม ราก ใบ และกลีบดอก *Cattleya, Dendrobium* รองเท้านารี (*Paphiopedilum*) และฟาแลนนอปซีส (Price and Earle, 1984) ใบของ *Aranda* Noorah Alsagoff (Loh and Rao, 1985) แคลลัสฟาแลนนอปซีส (Sajise and Sagawa, 1988) ใบ *Aranda* Tay Swee Eng และ *A*. Noorah Alsagoff (Koh *et al*., 1988) ใบ ดอก และรากของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium*, *Cattleya*, *Epidendrum*, *Ascocentrum* และแวนด้า (Oshiro and Steinhart, 1991) ใบอ่อนฟาแลนนอปซีส และแวนด้า (คำนูณ, 2540) ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของข้าวโพด (Shillito *et al.*, 1989) เซลล์ซัสเพนชั่นของข้าว Japonica พันธุ์ Nipponbare และพันธุ์ Taipei 309 (Li and Murai, 1990) เซลล์ซัสเพนชั่นของข้าวพันธุ์ Nipponbare (*Oryza sativa* L.) (Nishimura *et al.*, 2001) เซลล์ซัสเพนชั่นของหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* Nash) (Prasertsongskun, 2004) ซึ่งในการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนต่างๆ จะใช้ระยะเวลาในการอินคูเบทแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ นอกจากชิ้นส่วนแล้วขนาดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกก็เช่นเดียวกัน พัฐวดี (2536) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้สกุลอะแรนด้า ว่าเอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กได้มากกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่ เป็นผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่า นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกก็เป็นผลให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์แตกต่างกันไปด้วย (Koh *et al.*, 1988) การเจริญเติบโต อายุของพืช และระยะพัฒนาการของพืชที่นำมาใช้มีผลอย่างมากต่อปริมาณและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ สำหรับแคลลัสและเซลล์แขวนลอยสามารถนำมาแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี (Mizuhiro *et al.*, 2001) และเซลล์ควรอยู่ในระยะ exponential ในระยะนี้เซลล์จะมีผนังเซลล์ที่ค่อนข้างบางมีลักษณะที่เรียกว่า cellulosic จึงต้องการช่วงเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเพคติเนสที่ค่อนข้างสั้น (รังสฤษฏ์, 2541) ในการแยกโปรโตพลาสต์ของพืชไม่นิยมแยกจากเซลล์ที่มีการเจริญในขั้นสอง (secondary growth)

เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีผนังเซลล์หนาเพราะมี secondary wall ที่ประกอบด้วยสารพวกลิกนิน ซูเบอริน และคิวตินซึ่งย่อยยาก (ประศาสตร์, 2538)

1.2 ความดันออสโมติก

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ดังนั้นเซลล์ต้องสัมผัสกับอาหารโดยตรงทำให้เซลล์แตกง่าย ดังนั้นต้องเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่มีความดันออสโมติกที่เหมาะสม ซึ่งความดันออสโมติกภายในและภายนอกเซลล์ต้องสมดุลกัน ถ้าความดันออสโมติกสูงเกินไปทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตของเซลล์เสียหายได้ ส่วนความดันออสโมติกที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตก (Evan and Bravo, 1983) สารเคมีที่นิยมใช้ปรับความดันออสโมติกเรียกว่า ออสโมติคัม ได้แก่ น้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอลและซอร์บิทอล โดยที่ซอร์บิทอลเป็น isomer ของแมนนิทอล ในบางครั้งอาจใช้ผสมกันก็ได้ และน้ำตาลที่ไม่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ได้แก่ กลูโคส และซูโครส โดยการใช้ร่วมกันหรือใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่ที่นิยมมากที่สุดก็คือแมนนิทอล เนื่องจากแมนนิทอลสามารถที่จะเข้าไปภายในเซลล์ของพืชได้ช้ามาก (บุญยืน, 2540) อย่างไรก็ตามสารละลายออสโมติคัมที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์คือแมนนิทอล ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 0.23-0.9 โมลาร์ (คำนูณ, 2539) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับความดันออสโมติกของใบในขณะแยก (Kao and Michaylux, 1975) และขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกด้วย ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบความเข้มข้นของออสโมติกอยู่ในช่วง 0.5-0.7 โมลาร์ (พัฐวดี, 2536; สมปอง, 2538)

1.3 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ มาเซอโรไซม์หรือเพคติเนส ทำหน้าที่ย่อยสารประกอบเพคติน และย่อยสารประกอบที่เชื่อมติดกันระหว่างเซลล์พืชทำให้เซลล์ที่เกาะรวมกันแยกออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเซลลูเลสทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ออกจนเหลือแต่เยื่อหุ้มเซลล์ (สมปอง, 2536) ดังนั้นในการเลือกใช้เอนไซม์ต้องคำนึงถึงชนิดของพืชและชิ้นส่วนที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วย (Hu *et al*., 1998; Teo and Neuman, 1978; สมปอง, 2538; คำนูณ, 2540) นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ผสมยังสามารถทำให้แยกโปรโตพลาสต์ออกมาได้จำนวนมากด้วย (Loh and Rao, 1985) การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์พืชนั้น พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยกลุ่มเซลลูเลสจะมีช่วงระดับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 4.5-5 และมาเซอโรไซม์หรือเพคติเนส 5.5-6.0 (พัฐวดี, 2536) โดย Fitter และ Krikorian (ม.ป.ป.) อ้างโดย พัฐวดี (2536) รายงาน

ว่าถ้าต้องการปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ให้อยู่ในช่วงเดียวกับระดับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือโปรโตพลาสต์ต้องเติมบัฟเฟอร์ เช่น MES [2 (N-morpholino) ethanesulfonic acid] เข้มข้น 3-10 มิลลิโมลาร์ เพื่อปรับช่วงระดับความเป็นกรด-ด่างในการทำงานของเอนไซม์ให้คงที่

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

2.1 อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ การเลี้ยงในอาหารจึงต้องเติมสารออสโมติคัมลงไปด้วยความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับที่เตรียมในสารละลายเอนไซม์ สูตรอาหารที่นิยมใช้โดย ทั่วไปได้แก่สูตร MS (Murashige and Skoog) (Murashige and Skoog, 1962; Evan and Bravo, 1983) และสูตรอาหารอื่นๆ ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งมีผลต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของเซลล์ เช่น VW (Vacin & Went) (Vacin and Went, 1949) ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าวหรือเติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (α-naphthaleneacetic acid) และ KN (Kinetin) ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า (Loh and Rao, 1985) KM8P (Kao and Michaylux 8P) และดัดแปลงใช้ธาตุอาหารหลักของสูตร MS, B5 (Gamborg B-5) และ KC (Knudson C) เติม 2,4-D, NAA และ BA (6- benzyladenine) ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า (Koh *et al*., 1988) แต่โปรโตพลาสต์ก็ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่ Sajise และ Sagawa (1988) ใช้อาหารสูตร VW ดัดแปลงโดยการเติมธาตุอาหารรองของสูตร MS ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสฟาแลนนอปซีส ภายหลังการเพาะเลี้ยงไป 60 วัน สามารถพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ Haicour และคณะ (2004) ใช้อาหารสูตร MS เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วย พบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นโปรโตโคลนได้ ลัดดาวัลย์ (2544) ใช้อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ (thidiazuron) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบมังคุด 6.93 เปอร์เซ็นต์ Furuta และคณะ (2004) ใช้อาหารสูตร 1/2MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบเบญจมาศ พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาไปเป็นโปรโตโคลนได้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงไป 42 วัน

2.2 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องมีจำนวนอย่างน้อย $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จึงจะเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยง (Kao and Michaylux, 1975; พัฐวดี, 2536) Loh และ Rao (1985) และ Koh และคณะ (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้สกุลอะแรนด้า โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^5$ และ $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Sajise และ Sagawa (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนแคลลัสของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซีส โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเป็นโปรโตโคลนได้ Assani และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วย โดยปรับความหนาแน่นก่อนเพาะเลี้ยงเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริออยด์ได้ นอกจากนี้ Haicour และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยวิธีการ embed (ฝังเลี้ยง) โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วย โดยการปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเป็น $2x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สามารถพัฒนาเป็นโปรโตโคลนได้

2.3 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมามักเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยที่อาหารเหลวมีข้อดีคือ ทำให้สะดวกในการทำให้ความดันออสโมติกลดลงและง่ายต่อการย้ายเลี้ยง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถแยกโคโลนีที่มาจากเซลล์เดี่ยวได้ ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่ถูกตรึงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสามารถให้โคลนของเซลล์เดี่ยวได้ ทำให้การนับเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการแตกหน่อถูกต้องมากยิ่งขึ้น แต่เสียเวลามากกว่าการย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว (คำนูณ, 2539) อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปนิยมเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวก่อน เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง (Nagata and Takebe, 1971; Price and Earle, 1984; Loh and Rao, 1985; Koh *et al*., 1988) และในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จำเป็นต้องมีการลดออสโมติคัมทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหาร หรือเติมอาหารเพื่อการพัฒนาการในการแบ่งเซลล์ในระยะต่อไปจนได้แคลลัสและพืชต้นใหม่ Nenz และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของต้นชีค-โอะริ (chicory = เป็นต้นไม้ที่ใช้รากใช้ผสมกาแฟหรือชงรับประทาน) ในอาหารเหลว อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และการฝังเลี้ยงใน Ca-alginate พบว่าการฝังเลี้ยงใน Ca-alginate โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นโปรโตโคลนภายใน 8 สัปดาห์ Haicour และคณะ (2004) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารแข็ง อาหารกึ่ง

แข็งกึ่งเหลว การฝังเลี้ยงในอาหารเหลว เพาะเลี้ยงใน alginate หรือ bead และเพาะเลี้ยงโดยอาศัยเซลล์พี่เลี้ยงจากเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วย ข้าว *Lolium mutiflorum* และ *Triticum monococcum* (Poaceae) เป็นเซลล์พี่เลี้ยง เป็นต้น พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วยเป็นเซลล์พี่เลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นโปรโตคลนได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูร
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการแยกและการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางการค้า