

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(5)
รายการตาราง	(6)
รายการภาพ	(7)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(8)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	8
2. วิธีการวิจัย	9
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	9
วิธีการศึกษา	18
3. ผล	27
4. วิจัย	48
5. สรุป	59
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	69
ประวัติผู้เขียน	72

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลของชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวน และความมีชีวิตของ โพรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร	28
2 ผลของแหล่งของชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนและความมีชีวิตของ โพรโตพลาสต์	29
3 ผลของอายุใบต่อจำนวน และความมีชีวิตของ โพรโตพลาสต์	31
4 ผลของเวลาการอินคิวบตต่อจำนวนและความมีชีวิตของ โพรโตพลาสต์	33
5 ผลของระดับความเป็นกรด-ด่างต่อจำนวนและความมีชีวิตของ โพรโตพลาสต์	34
6 ผลของออสโมติกัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของ โพรโตพลาสต์	36
7 ผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยง โพรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาการของ โพรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูรหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	37
8 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาการของ โพรโตพลาสต์ที่แยกจากใบหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	38
9 ผลของชนิดของไซโตไคนินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาการของ โพรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ เมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์	39
10 ผลของชนิดของน้ำตาลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาการของ โพรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	41
11 ผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาการของ โพรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	42
12 เปรียบเทียบวิธีการเลี้ยง โพรโตพลาสต์แบบต่างๆ ที่แยกจากใบกล้วยไม้หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	44
13 ผลของวิธีการเพาะเลี้ยง โพรโตพลาสต์แบบบีดหรือดิสค์ (bead or disc culture) หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	45
14 ผลของเซลล์พี่เลี้ยง และวิธีการเลี้ยงต่อพัฒนาการของ โพรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์	46

## รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า	
1	พันธุ์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร ( <i>Dendrobium friedericksianum</i> Rchb.f)	2
2	ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนใบและรากกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเพื่อแยกโปรโตพลาสต์	10
3	ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนโปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเพื่อแยกโปรโตพลาสต์	11
4	ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนใบยาสูบเพื่อแยกโปรโตพลาสต์	12
5	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ชั้นของยาสูบเพื่อแยกโปรโตพลาสต์	14
6	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ชั้นของกุหลาบมอญเพื่อแยกโปรโตพลาสต์	15
7	เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการแบบต่างๆ	25
8	โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์เห็นการเรืองแสงสีเขียว-เหลือง (บาร์ = 50 ไมโครเมตร)	28
9	โปรโตพลาสต์ที่แยกจากแหล่งต่างๆ ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ไอโนซูเกออาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 5.7	30
10	ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุต่างๆ ที่ใช้ชิ้นส่วนใบในการแยกโปรโตพลาสต์	32
11	โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรที่แยกจากใบด้วยเอนไซม์ที่ปรับระดับความเป็นกรดต่างๆ	35
12	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเกิดการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ (สรชี) ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5 \times 10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	47

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	6- benzyladenine
BAP	=	benzylaminopurine
NAA	=	$\alpha$ -naphthaleneacetic acid
KN	=	kinetin
TDZ	=	thidiazuron
FDA	=	fluorescein diacetate
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
MES	=	[(2N-morpholino) ethanesulfonic acid]
MS	=	Murashige and Skoog (Medium)
VW	=	Vacin & Went (Medium)
LS	=	Linsmaier and Skoog (Medium)
KC	=	Knudson C (Medium)
B5	=	Gamborg B-5 (Medium)
KM8P	=	Kao and Michaylux 8P (Medium)