การชักนำพืชต้นใหม่และการแยกโปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัส ของกล็อกซิเนีย

Plantlet Regeneration and Isolation of Protoplasts from Leaves and Callus of Gloxinia

เชาวลิต บุญศรี

Chauvalit Boonsri

Order Key 24863
BIB Key 16820

เลขหมู่ QK725 ธ45
เลขทะเบียน 15422 ฉ.2
11 มิ.ย. 254

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์	การชักนำพืชต้นใหม่และการแยกโปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัสของกล็อกซิเนีย
ผู้เขียน	นายเชาวลิต บุญศรี
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

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

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

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

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

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

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

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	การชักนำพืชต้นใหม่และการแยกโปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัสของกล็อกซิเนีย
ผู้เขียน	นายเชาวลิต บุญศรี
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

การศึกษาชักนำแคลลัสและพืชต้นใหม่จากการวางเลี้ยงใบของกล็อกซิเนียบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ พบว่าอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมสูงสุด 98 ยอดต่อใบ ส่วนการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีขาวอมเหลือง เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำได้ไปเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรต่างๆพบว่า อาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS3) ให้อัตราการเจริญเติบโตแคลลัสสูงสุด 26.77 $\pm$ 4.29 กรัมน้ำหนักสด ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 16 วัน รองลงมาได้แก่ อาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS6) ให้อัตราการเจริญเติบโตแคลลัส 24.70 $\pm$ 8.54 กรัมน้ำหนักสด ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 10.6 ยอด

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบโดยใช้เอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆร่วมกับแมนนิทอลความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5

เปอร์เซ็นต์ละลายในน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7.25 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสพบว่า เอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

Thesis Title	Plantlet Regeneration and Isolation of Protoplasts from Leaves and Callus of Gloxinia
Author	Mr. Chauvalit Boonsri
Major Program	Plant Science
Academic Year	1999

Abstract

A study on callus and plantlet regeneration from leaves of gloxinia on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various growth regulators showed that 1 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) and 1 mg/l benzyladenine (BA) could regenerate shoots with a high frequency of 100%. The average number of shoots per leaf was 98 shoots. In the case of callus formation, a 100% of leaves produced callus on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA, 0.125 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg/l BA and 500 mg/l malt extract. The callus was compact and yellowish-white in color. The callus has the highest fresh weight 26.77 $\pm$ 4.29 gram at 16 days after transfer onto MS supplemented with 0.5 mg/l IAA and 1 mg/l BA (MS3), followed by MS supplemented with 1 mg/l IAA, 0.125 mg/l 2,4-D, 1mg/l BA, 500 mg/l malt extract and 3 mg/l ascorbic acid (MS6) which gave a fresh weight of 24.7 $\pm$ 8.54 gram at 20 days after transfer. A 100% shoot regeneration was obtained on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA, 1 mg/l BA with average of 10.6 shoots.

An isolation of protoplasts from leaves was carried out using various kinds and concentrations of enzymes dissolved in different concentrations of Mannitol. It was shown that 3% cellulase from *Trichoderma viride*, 3 % Macerozyme R-10 and 0.5% Pectolyase Y-23 dissolved in 0.4 M Mannitol resulted the best yield of 7.25 x 10^4 protoplasts per gram fresh weight. In the case of callus, 1.5% cellulase from *Trichoderma viride*, 1.5% Macerozyme R-10, and 0.5% Pectolyase dissolved in 0.4 M Mannitol gave the best yield of protoplasts of 7 x 10^4 protoplasts per gram fresh weight.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแนะนำของรองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูญ กาญจนภูมิ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ ตรวจแก้ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์สมบูรณ์ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกและภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และคอยให้กำลังใจจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

เชาวลิต บุญศรี

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบาญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	10
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	11
วัสดุ อุปกรณ์	11
วิธีการ	13
3. ผล	20
4. วิจารณ์	39
5. สรุป	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้เขียน	53

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่ใช้ศึกษาการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบ	14
2.	สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่ใช้ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส	16
3.	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดรวมและแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบพร้อมก้านใบบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 45 วัน	21
4.	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเติมอื่นๆ ต่อการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 30 วัน	24
5.	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเติมอื่นๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัส	26
6.	อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆเป็นเวลา 20 วัน	28
7.	ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสของกล็อกซิเนียที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS	31
8.	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	33
9.	ผลของเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์กล็อกซิเนียที่แยกจากใบ	34
10.	ผลของชิ้นส่วนต่างๆ ของกล็อกซิเนียต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	36
11.	ผลของเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์กล็อกซิเนียที่แยกจากแคลลัส	37

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	การชักนำยอดรวมกล็อกซิเนียจากการวางเลี้ยงใบพร้อมก้านใบ บนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 45 วัน	22
2.	ลักษณะแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	22
3.	แคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	25
4.	อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน	29
5.	ยอดที่ชักนำได้จากแคลลัสภายหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32
6.	ราก (ศรชี้) ที่ชักนำได้จากแคลลัสภายหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	32
7.	โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล็อกซิเนียเมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และเพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (x125)	35

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
AA	=	ascorbic acid
B5	=	Gamborg medium
BA	=	6-benzyladenine
CH	=	casein hydrolysate
CPW	=	cell protoplast washing
CRD	=	completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
FDA	=	fluorescein diacetate
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
KN	=	kinetin
ME	=	malt extract
MES	=	2-N-morpholinoethane sulfonic acid
MS	=	Murashige and Skoog
MT	=	Murashige and Tucker
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
PVP-10	=	polyvinylpyrrolidone
SAS	=	statistic analysis system
WPM	=	woody plant medium

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล็อกซิเนีย (gloxinia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sinningia speciosa* Benth. and Hook. จัดอยู่ในตระกูล Gesneriaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิล นำเข้ามาทดลองปลูกครั้งแรกในประเทศไทยโดยรองศาสตราจารย์แสงธรรม คมกฤส ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อประมาณปี 2506 (สมเพียร เกษมทรัพย์, 2525) กล็อกซิเนียเป็นไม้ดอกล้มลุก พุ่มต้นสูงประมาณ 15 เซนติเมตร ดอกมีลักษณะเป็นรูประฆัง (bell-shaped) เส้นผ่าศูนย์กลางดอกประมาณ 3 - 5 นิ้ว ขึ้นกับพันธุ์ ก้านดอกอวบยาวชูดอกขึ้นเหนือระดับต้นและใบ จำนวนดอกที่บานแต่ละครั้งมี 1-12 ดอกหรือมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นกับพันธุ์และการดูแลรักษา นอกจากจะมีดอกสวยแล้วกล็อกซิเนียยังมีใบสวยมากอีกด้วย ใบมีลักษณะเป็นรูปไข่ ขอบใบหยัก ใบหนาสีเขียวเข้ม มีขนทั้งด้านท้องใบและหลังใบ ขนาดของใบแตกต่างกันตามพันธุ์ ความสมบูรณ์ของต้น และปริมาณแสงที่ได้รับจึงเหมาะในการทำเป็นไม้กระถาง กล็อกซิเนียมีรากเก็บสะสมอาหาร (tuberous root) จากการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ทำให้ได้กล็อกซิเนียพันธุ์ใหม่ๆ โดยเฉพาะลูกผสมชั่วแรก (F1 hybrid) ที่มีดอกขนาดใหญ่ มีทั้งดอกชั้นเดียว (single) และดอกซ้อน (double) มีทั้งสีเดียวหรือสองสี เช่น ชมพู, แดง, ขาว, ม่วงและน้ำเงิน ในดอกเดียวกัน กล็อกซิเนียสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธีเช่น การเพาะเมล็ด ปักชำยอด ปักชำใบ แยกหน่อและหัว แต่การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดพันธุ์ได้รับความนิยมมากที่สุด (สุธานิธิ์ ยุกตะนันทน์ และคณะ, 2540) เนื่องจากต้นที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอ ดังนั้นผู้ปลูกต้องสั่งซื้อเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศ เพราะลูกผสมชั่วแรกไม่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อไปได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้โดยทำการขยายพันธุ์พืชด้วยชิ้นส่วนขนาดเล็กเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพืชที่ต้องการหรือเพื่อการปรับปรุง (Smith and Norris, 1983) พืชต้นใหม่ที่ได้มีความสม่ำเสมอ และให้ลักษณะตรงตามพันธุ์สูง ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไป เช่น การวางเลี้ยงแผ่นใบและก้านใบ (งานวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา, 2533; อรุณี ม่วงแก้วงาม และ สมปอง เตชะโต, 2535; และ ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2533) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืช ซึ่งใช้

เป็นเครื่องมือพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการผสมพันธุ์เซลล์ร่างกายเช่น การรวมโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด การปลูกถ่ายข้อมูลทางพันธุกรรมผ่านโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยไม่อาศัยเพศ นับเป็นการหลีกเลี่ยงข้อจำกัดที่ไม่สามารถกระทำได้หรือกระทำได้ยากในการผสมพันธุ์พืชต่างชนิดและสกุล ก่อนที่จะมีการนำโปรโตพลาสต์มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงเทคนิคขั้นพื้นฐานต่างๆ เช่น การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ตรวจเอกสาร

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปัจจุบันมีบทบาทอย่างมากทั้งทางด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และด้านการแพทย์ ในด้านการเกษตรกรรมนั้นเทคโนโลยีดังกล่าวนำมาใช้ขยายพันธุ์พืชจำนวนมาก และยังใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุมณฑา พรหมบุญ, 2536) ความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีมากขึ้นเมื่อมีการค้นพบเทคโนโลยี DNA ซึ่งสามารถปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงยีนได้ตามต้องการ วิธีการนี้เรียกว่า พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) โปรโตพลาสต์ที่แยกจากส่วนต่างๆ ของพืชสามารถนำมาใช้เป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยวิธีการข้างต้น อย่างไรก็ตามการประสบผลสำเร็จตามวิธีการข้างต้นต้องอาศัยความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ ดังนั้นสิ่งที่ต้องกระทำในขั้นต้นคือ การเตรียมชิ้นส่วนก่อนนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เพื่อรักษาระดับความดันออสโมติคภายในเซลล์ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ ตลอดจนวิธีการแยกและระยะเวลาที่ใช้นับว่ามีความจำเป็น ปัจจัยที่กล่าวข้างต้นมีผลต่อความมีชีวิต ปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ และความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

1. การขยายพันธุ์กล็อกซิเนียโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

งานวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา (2533) และ อรุณี ม่วงแก้วงาม และสมปอง เตชะโต (2535) รายงานการขยายพันธุ์กล็อกซิเนียโดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบและแผ่นใบบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม IAA (indole-3-acetic acid) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN (kinetin) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ชิ้นส่วนก้านใบให้ความสามารถในการชักนำยอดรวม 96.10 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชิ้นส่วนแผ่นใบซึ่งมีความสามารถในการชักนำยอดรวม 94.20 เปอร์เซ็นต์ ประศาสตร์ เกื้อมณี (2533) ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบและแผ่นใบบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS เติม BAP (6-benzylaminopurine) เข้มข้น 3 ppm ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1 ppm และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงประมาณ 1 เดือนเกิดต้นขึ้นจำนวนมากบนแผ่นใบและก้านใบ

2. การชักนำการสร้างแคลลัสและการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่แบ่งตัวและเพิ่มปริมาณโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสมี 2 แบบ คือ แคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น และแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ จากการศึกษาการชักนำแคลลัสของกล็อกซิเนียโดย Wuttisit และ Kanchanapoom (1996) บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1, 1.5, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ พบว่า ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน เกิดแคลลัสบริเวณชิ้นส่วนใบ มีสีเหลืองอมเขียว แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ มีอัตราการเจริญเติบโตช้า เมื่อทำการวางเลี้ยงต่อไปแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด งานวิจัยและพัฒนาวิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา (2533) รายงานการชักนำแคลลัสของกล็อกซิเนียจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP เข้มข้น 0.1, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีเขียวใสในระยะแรก จากนั้นมีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.1, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีเขียวเข้ม โดยเฉพาะสูตรอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้นสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ชักนำได้มีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นโดยไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ส่วนพืชอื่นๆที่จัดอยู่ในตระกูล Gesneriaceae มีรายงานการชักนำแคลลัสเช่น การชักนำแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆของอัฟริกันไวโอเล็ต โดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร B5 (Gamborg, *et al.*, 1968) เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เคซีนไฮโดรไลเซต เข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร นำแคลลัสที่ชักนำได้ไปเพิ่มปริมาณโดยย้ายเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากเคซีนไฮโดรไลเซต จากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วประมาณ 5 เท่าภายหลังการย้ายเลี้ยงประมาณ 10 วัน เซลล์ซัสเพนชันอายุ 4 วันภายหลังการย้ายเลี้ยงใช้เป็นวัสดุในการแยกโปรโตพลาสต์จำนวนมากเพื่อการศึกษาต่อไป (Hoshino *et al.*, 1995) ในพืชอื่นๆ มีรายงานการชักนำแคลลัสและเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันดังนี้ การชักนำแคลลัสกาแฟโดยการวางเลี้ยงรากบนอาหารสูตร B5 เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, KN เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ Difco agar เข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร pH 5.8 จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำเซลล์ซัสเพนชันโดยใช้แคลลัส หนัก 6 - 8 กรัม เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 ปริมาตร 100

มิลลิลิตรทำการย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์เมื่อได้เซลล์ซัสเพนชันเป็นจำนวนมากจึงนำไปใช้แยกโปรโตพลาสต์ ต่อไป (Grezes *et al.*, 1994) การชักนำแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงของ *Acacia catechu* ใช้อาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium) เติมซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ KN เข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ NAA (1-napthaleneacitic acid) เข้มข้น 21.5 ไมโครโมลาร์ และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 18.4 ไมโครโมลาร์ เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลของแคลลัส วางเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร WPM เติมซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ KN เข้มข้น 13.9 ไมโครโมลาร์ NAA เข้มข้น 2.7 ไมโครโมลาร์ และ L-proline เข้มข้น 3.5 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำต้นอ่อน (somatic embryo) (Rout *et al.*, 1995) Kumar (1992) รายงานการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบของต้นลำเพย (*Thevetia peruviana*) บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ และ KN เข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำแคลลัสที่ชักนำได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ และ KN เข้มข้น 5.95 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 30 - 45 วัน สามารถชักนำยอดรวมได้ 93 $\pm$ 8 ยอดต่อแคลลัส Kuijpers และคณะ (1996) รายงานการชักนำ embryogenic callus ได้ 40 เปอร์เซ็นต์จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบของแตงกวาที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 14 ไมโครโมลาร์ หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเหลือ 4.5 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้การชักนำ embryogenic callus ลดลง Lou และคณะ (1996) วางเลี้ยงแผ่นใบและใบเลี้ยงของแตงกวาบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ และซูโครสเข้มข้น 131 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดยอดเพียงอย่างเดียว หากเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 263 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดยอดและต้นอ่อน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 394 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดต้นอ่อนเพียงอย่างเดียว Fabienne (1992) ชักนำแคลลัสสตรอเบอรี่พันธุ์ป่า (*Fragaria vesca* L.) จากการวางเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1.11 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D เข้มข้น 3.39 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์และ 2,4-D เข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ แคลลัสที่ชักนำเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ มีสีเหลืองอ่อน ทำการเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้โดยการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ นำแคลลัสไปชักนำยอดรวมโดยวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมสารสกัดจากผนังเซลล์ (wall hydrolysate)

3. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชแต่ไม่นิยมแยกจากเซลล์ที่มีอายุมาก เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีผนังเซลล์หนามี secondary wall ที่ประกอบด้วย ลิกนิน ซูเบอลิน, และ คิวติน ซึ่งย่อยยาก เซลล์เหล่านี้พบในชิ้นส่วนพืชที่มีอายุมากไม่เหมาะแก่การนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) การเลือกใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสม ได้แก่ แผ่นใบ ใบเลี้ยง เอนโดสเปิร์มและแคลลัส โดยเฉพาะแคลลัสควรเลือกใช้ในระยะการเจริญเติบโตแบบเส้นตรง เช่นภายหลังการย้ายเลี้ยง 2 สัปดาห์ เวลาหลังการย้ายเลี้ยงมีผลมากต่อการแยกโปรโตพลาสต์เนื่องจากแคลลัสที่ผ่านการย้ายเลี้ยงเป็นเวลายาวนานส่งเสริมการสะสมของสารเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสตลอดจนสารลิกนิน ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลงนอกจากนั้นยังพบว่าการรวมตัวของเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์ที่หนาแน่นสูง ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงด้วย โดยทั่วไปแล้วหลังจากทำการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 2 - 4 วัน เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวแบบไมโทซีสที่เรียกว่า mitotic index สูงและมีการสะสมของสารต่างๆ บริเวณผนังเซลล์ต่ำ ชิ้นส่วนอื่นๆ ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น Winkelmann (1993) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากยอดอ่อนของอัฟริกันไวโอเล็ต ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเรส เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ หรือเพคติเนส เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พัฐวดี ทองสีดำ (2535) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของกล้วยไม้ซึ่งได้จากการนำตากล้วยไม้สกุลอะแรนด้า วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW (Vacin and Went, 1949) เป็นเวลานาน 2 - 3 เดือนจากนั้นนำใบอ่อนกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์และเมสอย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ pH 4 โดยใช้ใบกล้วยไม้ 1 กรัมน้ำหนักสดต่อสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมงได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 3.6 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Yang (1994) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากช่อดอกของกะหล่ำดอก โดยการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลส RS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในสภาพมืด เป็นเวลา 7 - 10 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 2 - 4 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด Man-Ho และ Sang-Gu (1994) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากกลีบดอกพิทูเนีย (*Petunia hybrida*)

ส่วน Yan-Xiu และคณะ (1995) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงที่พัฒนาเต็มที่แล้ว อายุ 7 - 13 วัน ของโสน (*Sesbania bispinosa*) Belarmino และคณะ (1994) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากส่วนของลำต้นและก้านใบมันเทศ (*Ipomoea batatas*) วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา (2537) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และ Shimizu และคณะ (1996) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของไอริส (*Iris germanica* L.) นอกจากการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์แล้ว ในพืชบางชนิดที่แยกโปรโตพลาสต์ได้ยากจำเป็นต้องมีการเตรียมชิ้นส่วนพืชก่อนนำไปใช้

4. การเตรียมชิ้นส่วนพืช

การเตรียมชิ้นส่วนพืชก่อนการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง จำเป็นต้องมีการเตรียมชิ้นส่วนพืชให้เหมาะสม Jumin และ Nito (1995) ทำการตัดชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของแก้ว (*Murraya paniculata*) ยาว 2 - 4 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MT (Murashige and Tucker, 1969) เติมซูโครสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้างแคลลัส จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปเตรียมเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MT เติมแลคโตสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 17.7 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 6 วัน แล้วจึงนำแคลลัสไปแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์ซึ่งละลายด้วยอาหารสูตร MT ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบเกลืออนินทรีย์ลงครึ่งหนึ่ง อินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 3 - 5 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Jane และ Sink (1988) รายงานการชักนำแคลลัสจากพิทูเนีย (*Petunia alpicola*) โดยวางเลี้ยงส่วนปลายยอดยาว 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS เติม zeatin เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นำแคลลัสที่ได้ภายหลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันไปเตรียมเลี้ยงในสารละลาย CPW (cell protoplast washing) ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.8 โมลาร์ เพื่อรักษาความดันออสโมติคภายในเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแคลลัสไปแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ อินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 35 รอบต่อนาที ในสภาพมืด นาน 17 - 19 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์ได้ 2 - 3 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด Anthony และคณะ (1995) รายงานการเตรียมเลี้ยงโดยนำใบยอดมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz cv. *M. Thai* 8) ตัดใบตามขวาง

ให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย CPW เติมแมนนิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ระดับ pH 5.8 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลาย CPW ทิ้งเติมสารละลายเอนไซม์ อินคูเบทในสภาพมืดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์ได้ 1.985×10^7 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด Narasimhulu และคณะ (1993) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยงของ *Brassica nigra* โดยหั่นเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 3 - 5 มิลลิเมตรในสารละลาย แมนนิทอลเข้มข้น 7.2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ R-10 เข้มข้น 0.5 - 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.01 - 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอลเข้มข้น 7.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด ข้ามคืน สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ $0.4 - 0.5 \times 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

5. ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์โดยทั่วไปนิยมใช้ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่จะย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์หลุดออกมาเป็นอิสระง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ เอนไซม์พวกนี้คือ มาเซอโรไซม์ เมื่อแต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระแล้วเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งจะทำการย่อยผนังเซลล์เพื่อเอาผนังเซลล์ออก เอนไซม์พวกนี้คือ เซลลูเลส องค์ประกอบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายออสโมติคัม ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเชิงเดี่ยว หรือเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นพอเหมาะจะช่วยให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจำนวนมาก ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งสองชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมจำเป็นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด (สมปอง เตชะโต, 2532) Ochatt (1993) รายงานชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนรากของลูกผสม *Weigla* x *florida* cv. Bristol Ruby โดยการนำรากหนัก 100 มิลลิกรัมน้ำหนักสด มาอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย ไมซีเลส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส หรือ เฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์, แมนนิทอลเข้มข้น 13 เปอร์เซ็นต์ PVP-10 (polyvinylpyrrolidone) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์และ MES (2-N-morpholinoethane sulfonic acid) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ให้โปรโตพลาสต์ 1.38×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 87.6 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีชิ้นส่วนใบหนัก 500 มิลลิกรัมน้ำหนักสด อินคูเบทในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ R-10 เข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23

เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 13 เปอร์เซ็นต์ PVP-10 เข้มข้น1 เปอร์เซ็นต์และ MES เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH 5.6 ให้โปรโตพลาสต์ได้ 3.85 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ความมีชีวิต 96.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชิ้นส่วนของลำต้นต้องทำการอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะ RS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอลเข้มข้น 13 เปอร์เซ็นต์ PVP-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ให้โปรโตพลาสต์ได้ 5.10 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ความมีชีวิต 88 เปอร์เซ็นต์ Iona และ Lindsay (1993) นำปลายยอดของ lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)ไปอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูไลซิน เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์, เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และแคลเซียมไนเตรทเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อินคูเบทหนึ่งคืน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แยกโปรโตพลาสต์ได้ 5.4 - 5.7 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 92 เปอร์เซ็นต์ จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2534) ทำการแยกโปรโตพลาสต์โกโก้ (*Theobroma cacao* L.) จากเซลล์ซัสเพนชันอายุ 6 วัน ภายหลังการย้ายเลี้ยง ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย ไดรซีเลส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ MES เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH 5 อินคูเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า จากการใช้เซลล์ซัสเพนชันหนัก 0.25 กรัมน้ำหนักสดต่อสารละลายเอนไซม์ 20 มิลลิลิตรสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 4.5 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ความมีชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากกล็อกซิเนียมีปัญหาในการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ตามที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่ การชักนำแคลลัสและการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบและแคลลัส

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการชักนำแคลลัสและอัตราการเจริญเติบโต
2. ชักนำการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงใบและแคลลัส
3. ศึกษาชนิด ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และระยะเวลาการอินคูเบท ต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ และแคลลัสของกล็อกซิเนีย

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุพืช

ใช้ต้นกล้ากล็อกซิเนียที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งได้จากการวางเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำการเกิดยอดรวม จากนั้นทำการย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน โดยวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 1 ปี จากนั้นนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเพื่อชักนำพืชต้นใหม่ แคลลัส และใช้แยกโปรโตพลาสต์ต่อไป

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องคนสารระบบแม่เหล็ก
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
4. ตู้อบไมโครเวฟ
5. หม้อนึ่งความดันไอ
6. ไมโครปิเปต
7. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
8. ตู้อบฆ่าเชื้อ
9. เครื่องเขย่า
10. เครื่องมือผ่าตัด เช่น ปากคีบ มีดผ่าตัด
11. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ
12. กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ดและฟลูออเรสเซนต์
13. เครื่องเซนตริฟิวก์
14. เครื่องกรองพร้อมกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร
15. เครื่องดูดสูญญากาศ (vacuum infiltration)
16. ผ้ากรองมิราคลอทขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร

17. เครื่องแก้วและพลาสติก เช่น จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-9 เซ็นติเมตร ฟลาสก์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร พาสเจอร์ปิเปต กรวยกรองพลาสติก หลอดปั่น
18. สไลด์นับเซลล์

เอนไซม์และสารเคมีที่ใช้

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS
2. สารละลาย CPW
3. เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์คือ
   - เซลลูเลส, ไดรซีเรส มาเซอโรไซม์ และฟังเซลเลส (Yakult Honsha Co. LTD.)
   - เพคโตไลเอส (Kikkoman Corporation)
4. สารละลายแอสคอร์บิคทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้วใช้เติมในอาหาร
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น IAA, 2,4-D, NAA, BA, KN,
6. สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน เคซีนไฮโดรไลเซต และสารสกัดจากมอลต์
7. สารเคมีบัฟเฟอร์ MES
8. สารเคมีสำหรับปรับความดันออสโมติค คือ น้ำตาลแมนนิทอล
9. สารเคมีตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ คือ ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (fluorescein diacetate, FDA)
10. สารละลายทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์คือซูโครสเข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ

1. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำยอดรวม แคลลัสและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัส

1.1 การชักนำยอดรวม

คัดเลือกใบกล็อกซิเนีย โดยใช้ใบคู่ที่ 2-4 วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรใช้เพียงลำพังหรือใช้ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละชนิดใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 การชักนำแคลลัส

คัดเลือกใบกล็อกซิเนีย โดยใช้ใบคู่ที่ 2-4 วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ IAA หรือ NAA หรือ 2,4-D แต่ละชนิดใช้ร่วมกับ BA หรือ KN และสารประกอบอินทรีย์เช่น เคซีนไฮโดรไลเซต หรือ สารสกัดจากมอลต์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่ใช้ศึกษาการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบ

Auxin (มก/ล)			Cytokinin (มก/ล)		Organic Compound (มก/ล)	
IAA	NAA	2,4-D	KN	BA	CH	ME
-	-	1.0	-	-	200	-
1.0	-	0.50	5.0	-	-	-
1.0	-	0.25	5.0	-	-	500
1.0	-	0.50	5.0	-	200	-
1.0	-	0.50	5.0	-	-	500
1.0	1.0	0.50	-	-	-	-
1.0	1.0	1.0	-	-	200	-
1.0	1.0	1.0	-	-	-	500
1.0	-	0.50	-	1.0	-	-
1.0	-	0.50	-	1.0	200	-
1.0	-	0.25	-	1.0	-	250
1.0	-	0.125	-	1.0	-	500
1.0	-	0.25	-	1.0	-	500
1.0	-	0.5	-	1.0	-	500
1.0	-	0.5	-	1.0	-	1000

วางเลี้ยง 2 ใบต่อขวด ในขวดขนาด 5 x 9 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ ทำการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส และการชักนำยอดรวมภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำซ้ำละ 4 ขวด ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ในโปรแกรม SAS

1.3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเติมอื่นๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำได้จากการศึกษาที่ 1.2 วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินคือ IAA และ 2,4-D ร่วมกับ KN หรือ BA และสารเติมอื่นๆ คือ สารสกัดจากมอลต์ หรือ กรดแอสคอร์บิค วางเลี้ยง 1 แคลลัสต่อขวด ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ ทำการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำซ้ำละ 4 ขวด ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ในโปรแกรม SAS

2. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสและการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส

2.1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส

นำแคลลัสซึ่งได้จากการชักนำโดยการวางเลี้ยงใบพร้อมก้านใบในการศึกษาแรกมาทำการเพิ่มปริมาณ และศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่ใช้ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)				สารเติมอื่นๆ (มก/ล)	
	IAA	2,4-D	KN	BA	ME	AA
MS1	0.5	-	5.0	-	-	-
MS2	1.0	-	5.0	-	-	-
MS3	0.5	-	-	1.0	-	-
MS4	1.0	-	-	1.0	-	-
MS5	1.0	0.125	-	1.0	500	-
MS6	1.0	0.125	-	1.0	500	3.0
MS7	1.0	0.250	-	1.0	-	-
MS8	1.0	0.250	-	1.0	-	3.0
MS9	1.0	0.500	-	1.0	-	3.0
MS10	1.0	1.000	-	1.0	-	3.0

วางเลี้ยงแคลลัส (น้ำหนัก 1-2 กรัม) จำนวน 1 แคลลัสต่อขวด บรรจุอาหาร 10 มิลลิลิตร ในสภาพการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน เก็บข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสโดยการชั่งน้ำหนักทุก 4 วัน เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 5 ซ้ำซ้ำละ 2 ขวด ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ในโปรแกรม SAS

2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA และ 2,4-D ร่วมกับ KN หรือ BA เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 5 ซ้ำซ้ำละ 10 ขวด ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ในโปรแกรม SAS

3. การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และน้ำตาลแมนนิทอลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ

นำแผ่นใบที่ได้จากการวางเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ หนัก 1 กรัมน้ำหนักสดมาหั่นฝอยแล้วแช่ในสารละลาย CPW ซึ่งเติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 โมลาร์ ปรับ pH 5.8 วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ในสภาพมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลาย CPW ทิ้งแล้วเติมสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์, มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และเพคโตไลเอส Y–23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายเอนไซม์ดังกล่าวในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้นเท่ากับสารละลาย CPW ปรับ pH 5.8 หลังจากจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชในเอนไซม์แล้ว นำไปเข้าเครื่องดูดสูญญากาศเป็นเวลา 5 นาที นำไปอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกโปรโตพลาสต์ โดยการกรองด้วยผ้ากรองมิราคลอทขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร นำสารละลายที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดสารละลายเอนไซม์ออก เติมสารละลาย CPW ซึ่งมีความเข้มข้นของแมนนิทอลเท่ากับเอนไซม์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ด้วยการลอยสารละลายโปรโตพลาสต์บนน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดโปรโตพลาสต์ซึ่งลอยอยู่ตอนกลางระหว่างน้ำตาลแมนนิทอลและน้ำตาลซูโครสนำไปทำการตรวจนับจำนวนด้วยสไลด์นับเซลล์ และตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยการย้อมด้วย FDA คำนวนหาจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และน้ำตาลแมนนิทอลที่ใช้เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 2 ซ้ำแต่ละซ้ำตรวจนับ 2 ครั้ง ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ในโปรแกรม SAS

3.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบโดยหั่นฝอยใบจำนวน 1 กรัมน้ำหนักสด แช่ในสารละลาย CPW ซึ่งเติมแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปรับ pH 5.8 วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ในสภาพมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลาย CPW ทิ้งแล้วเติมสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เซลลูเลสชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเรส ความเข้มข้น 0.1 - 2 เปอร์เซ็นต์, มาเซอโรไซม์ R-10 ความเข้มข้น 0.5 - 3 เปอร์เซ็นต์, และเพคโตไลเอส Y-23 ความเข้มข้น 0.5 - 2 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์ที่กล่าวข้างต้นใช้เพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกัน สารละลายเอนไซม์ทุกความเข้มข้นเติม MES เข้มข้น 3 - 5 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ละลายเอนไซม์ดังกล่าวในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปรับ pH 5.8 หลังจากจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชในเอนไซม์แต่ละชนิดแล้ว นำไปเข้าเครื่องดูดสูญญากาศเป็นเวลา 5 นาที นำไปอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 -100 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการเดียวกับการศึกษา 3.1 ตรวจนับหาจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และน้ำตาลแมนนิทอลที่ใช้เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 2 ซ้ำแต่ละซ้ำตรวจนับ 2 ครั้ง ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ในโปรแกรม SAS

3.3 การศึกษาแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อการแยกโปรโตพลาสต์

การศึกษาชิ้นส่วนต่างๆ ของกล็อกซิเนียที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ โดยเลือกใช้ชิ้นส่วนต่างๆ คือ แผ่นใบ ก้านใบและลำต้น จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทำการอินคูเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษา 3.1 เปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วนที่ศึกษา

3.4 การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ที่ได้จากการทดลองที่ 2 อายุ 30 วันภายหลังการย้ายเลี้ยง มาทำการแยกโปรโตพลาสต์ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ คือ เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) และเซลลูเลส RS เข้มข้น 1.5 – 3 เปอร์เซ็นต์แต่ละชนิดใช้ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 – 2 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 – 1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเรส เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ ฟังเซลเลส เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 และ 0.8 โมลาร์ อินคูเบทเป็นเวลา 5, 7 และ 12 ชั่วโมงจากนั้นทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษา 3.1 เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดรวม แคลลัสและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัส

1.1 การชักนำยอดรวม

จากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบพร้อมก้านใบกล็อกซิเนียบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ IAA และ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ KN ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน พบว่า เกิดการชักนำยอดรวมสูงสุด 97 ยอด เปอร์เซ็นต์ใบที่สร้างยอด 100 เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวม 89.8 ยอด เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3, รูปที่ 1) เมื่อเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารทั้งสองสูตร พบว่า ไม่สามารถชักนำยอดรวมแต่สามารถชักนำการสร้างแคลลัสแทน แคลลัสเกิดขึ้นภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน บริเวณก้านใบและเส้นกลางใบก่อนจากนั้นจึงเพิ่มปริมาณขึ้นจนตลอดทั้งใบ ลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (ตารางที่ 3, รูปที่ 2)

Central Library
Prince of Songkla Univ

ตารางที่ 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดรวมและแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบพร้อมก้านใบบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 45 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต(มก/ล)	เปอร์เซ็นต์ใบที่สร้างยอด	จำนวนยอดต่อภาชนะ	เปอร์เซ็นต์ใบที่สร้างแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
IAA(1)+BA(1)	100	97[a]	0[b]	-
IAA(1)+KN(5)	100	89.80[a]	0[b]	-
IAA(1)+2,4-D(0.5)+BA(1)	0	0[b]	70[a]	friable
IAA(1)+2,4-D(0.5)+KN(5)	0	0[b]	60[a]	friable
F-test		**	**	
CV (%)		9.42	38.46	

** แตกต่างทางสถิติที่ P = 0.01

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดและการสร้างแคลลัสที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 1 การชักนำยอดรวมกล็อกซิเนียจากการวางเลี้ยงใบพร้อมก้านใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 45 วัน

รูปที่ 2 ลักษณะแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

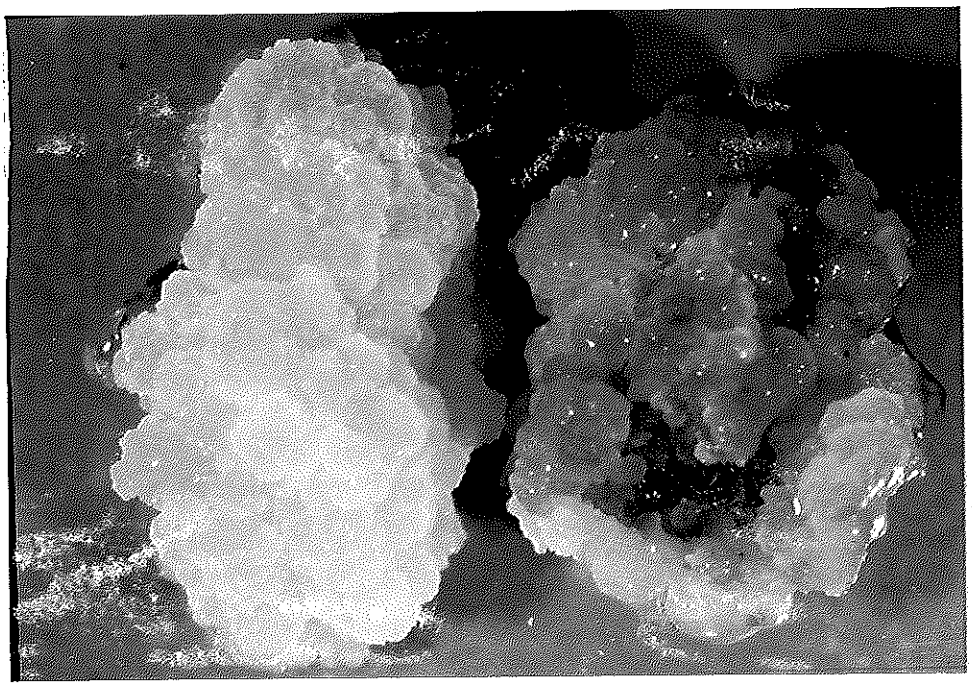
1.2 การชักนำแคลลัส

เพื่อศึกษาการชักนำแคลลัสได้ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบพร้อมก้านใบกล็อกซิเนียบนอาหารแข็ง สูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ IAA หรือ NAA หรือ 2,4-D แต่ละชนิดใช้ร่วมกับ BA หรือ KN และสารเติมอื่นๆ คือ เคซีนไฮโดรไลเซตหรือ สารสกัดจากมอลต์ (ตารางที่ 1) พบว่าสูตรอาหารเติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ สารสกัดจากมอลต์เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ชักนำได้มีสีขาวอมเหลืองมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (ตารางที่ 4, รูปที่ 3) การเติมสารสกัดจากมอลต์ส่งผลให้มีการสร้างแคลลัสได้ดีกว่าเคซีนไฮโดรไลเซต ซึ่งพบว่าชักนำแคลลัสได้น้อยมากหรือไม่สร้างเลย การใช้ออกซินร่วมกัน 3 ชนิดคือ IAA, NAA หรือ 2,4-D ใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันโดยไม่มีไซโทไคนิน ไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัสแม้ว่าจะเติมสารสกัดจากมอลต์ หรือเคซีนไฮโดรไลเซตก็ตาม การใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมให้แคลลัสมีสีน้ำตาล

เมื่อตรวจสอบลักษณะแคลลัสพบว่า การเติมไซโทไคนินในรูป BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ มีสีขาวอมเหลือง มีการเพิ่มปริมาณได้ดีสามารถที่จะชักนำเซลล์ซัสเพนชันได้ในขณะที่ KN ให้แคลลัสสีน้ำตาล ทำนองเดียวกับ เคซีนไฮโดรไลเซต ที่เติมลงไปทำให้แคลลัสมีสีน้ำตาล การเพิ่มปริมาณไม่ดี (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเติมอื่นๆต่อการชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 30 วัน

ออกซิน (มก/ล)			ไซโทไคนิน (มก/ล)		สารเติมอื่นๆ (มก/ล)		การสร้างแคลลัส (%)	สีแคลลัส
IAA	NAA	2,4-D	KN	BA	CH	ME		
-	-	1.0	-	-	200	-	0	-
1.0	-	0.5	5.0	-	-	-	64.04 ± 3.74	ขาวอมน้ำตาล
1.0	-	0.25	5.0	-	-	500	49.58 ± 6.05	ขาวอมเหลือง
1.0	-	0.5	5.0	-	200	-	10.00 ± 10.00	ขาวอมน้ำตาล
1.0	-	0.5	5.0	-	-	500	53.17 ± 7.05	ขาวอมเหลือง
1.0	1.0	0.5	-	-	-	-	27.50 ± 16.26	ขาวอมน้ำตาล
1.0	1.0	1.0	-	-	200	-	0	-
1.0	1.0	1.0	-	-	-	500	0	-
1.0	-	0.5	-	1.0	-	-	25.59 ± 18.90	ขาวอมเหลือง
1.0	-	0.5	-	1.0	200	-	0	-
1.0	-	0.25	-	1.0	-	250	85.79 ± 5.92	ขาวอมเหลือง
1.0	-	0.125	-	1.0	-	500	100.00 ± 0.00	ขาวอมเหลือง
1.0	-	0.25	-	1.0	-	500	83.38 ± 4.45	ขาวอมเหลือง
1.0	-	0.5	-	1.0	-	500	45.17 ± 9.88	ขาวอมเหลือง
1.0	-	0.5	-	1.0	-	1000	43.00 ± 7.30	ขาวอมน้ำตาล



รูปที่ 3 แคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยการวางเลี้ยงใบในอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

1.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารเติมอื่นๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ของแคลลัส

เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัส นำแคลลัสที่ได้จากการชักนำบนอาหารแข็งสูตรMS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ และสารเติมอื่นๆ (ตารางที่ 5) โดยทำการวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน พบว่า การรอดตายของแคลลัสสูงสุดเฉลี่ย 88.89 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเติมอื่นๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ของแคลลัส

ออกซิน (มก/ล)		ไซโทไคนิน (มก/ล)		สารเติมอื่นๆ (ก/ล)		เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตาย (เฉลี่ย)
IAA	2,4-D	KN	BA	ME	AA	
1.0	0.125	-	1.0	-	-	88.89
1.0	0.25	-	1.0	-	-	88.89
1.0	0.5	-	1.0	-	3.2	82.24
1.0	0.5	5.0	-	0.5	-	36.24
1.0	1.0	-	1.0	-	3.2	79.17

การย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม หรือเติม 2,4-D ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า (0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน การใช้กรดแอสคอร์บิคให้ผลดีกว่า สารสกัดจากมอลต์ ในกรณีที่ใช้กรดแอสคอร์บิคต้องใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ หากสูงทำให้อัตราการตายของแคลลัสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5)

2. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสและการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส

2.1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบมาทำการเพิ่มปริมาณและศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเติมอื่นๆ ตรวจสอบน้ำหนักสดทุก 4 วัน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบว่า อาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS3) ให้แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 16 วัน (26.77 $\pm$ 4.29 กรัม) หลังจากนั้นการเจริญเติบโตเริ่มลดลง อาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS8) อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเพิ่มขึ้นสูงสุดภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน หลังจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตจึงลดลง ส่วนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS6) ให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การเจริญเติบโตเริ่มลดลงภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 16 วัน (ตารางที่ 6, รูปที่ 4) ส่วนอาหารสูตรอื่นๆส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงภายหลังจากการวางเลี้ยง

ตารางที่ 6 อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม) ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย (กรัม)	ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)				
		4	8	12	16	20
MS1	1.09	10.01 ± 1.37	8.85 ± 1.23	9.63 ± 1.93	9.07 ± 2.60	11.68 ± 3.58
MS2	1.85	17.86 ± 3.00	11.62 ± 2.93	9.28 ± 2.85	6.60 ± 2.56	4.42 ± 3.71
MS3	1.92	14.15 ± 2.01	21.31 ± 3.52	25.94 ± 3.74	26.77 ± 4.29	26.64 ± 5.45
MS4	1.90	7.29 ± 2.53	6.52 ± 4.10	7.08 ± 4.96	8.03 ± 6.73	1.85 ± 4.50
MS5	1.08	7.81 ± 1.49	15.51 ± 2.53	13.89 ± 2.81	15.97 ± 4.75	12.39 ± 3.33
MS6	2.00	3.82 ± 1.65	10.07 ± 3.97	15.89 ± 5.73	23.18 ± 8.44	24.70 ± 8.54
MS7	1.46	0.85 ± 2.18	8.57 ± 2.51	13.18 ± 3.10	13.60 ± 4.73	9.10 ± 3.64
MS8	1.86	9.21 ± 3.40	18.65 ± 3.51	24.15 ± 4.16	14.87 ± 4.25	13.17 ± 3.79
MS9	1.37	1.94 ± 1.24	3.19 ± 1.83	-0.44 ± 2.30	-3.33 ± 3.17	-4.02 ± 2.97
MS10	1.49	1.08 ± 0.87	6.48 ± 1.25	9.56 ± 1.71	6.48 ± 2.74	7.40 ± 4.04

MS1 = MS + 0.5 mg/l IAA + 5.0 mg/l KN

MS2 = MS + 1.0 mg/l IAA + 5.0 mg/l KN

MS3 = MS + 0.5 mg/l IAA + 1.0 mg/l BA

MS4 = MS + 1.0 mg/l IAA + 1.0 mg/l BA

MS5 = MS + 1.0 mg/l IAA + 0.125 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 500 mg/l ME

MS6 = MS + 1.0 mg/l IAA + 0.125 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 500 mg/l ME + 3.0 mg/l AA

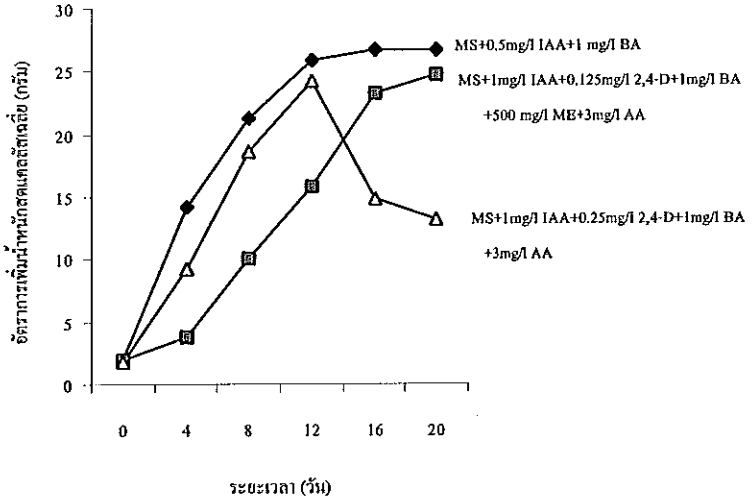
MS7 = MS + 1.0 mg/l IAA + 0.25 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA

MS8 = MS + 1.0 mg/l IAA + 0.25 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 3.0 mg/l AA

MS9 = MS + 1.0 mg/l IAA + 0.50 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 3.0 mg/l AA

MS10 = MS + 1.0 mg/l IAA + 1.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 3.0 mg/l AA

จากการตรวจสอบน้ำหนักสดของแคลลัสทุกๆ 4 วัน เป็นเวลา 20 วัน (จากตารางที่ 6) พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสมีเพียง 3 สูตร (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน

จากรูปแสดงอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสพบว่า อาหารที่เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS3) และอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

(MS6) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 16 วันจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตเริ่มลดลง ส่วนอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS8) ให้แคลลัสที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน จากนั้นอัตราการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้นจึงควรทำการย้ายเลี้ยงแคลลัสทุกๆ 12-16 วัน

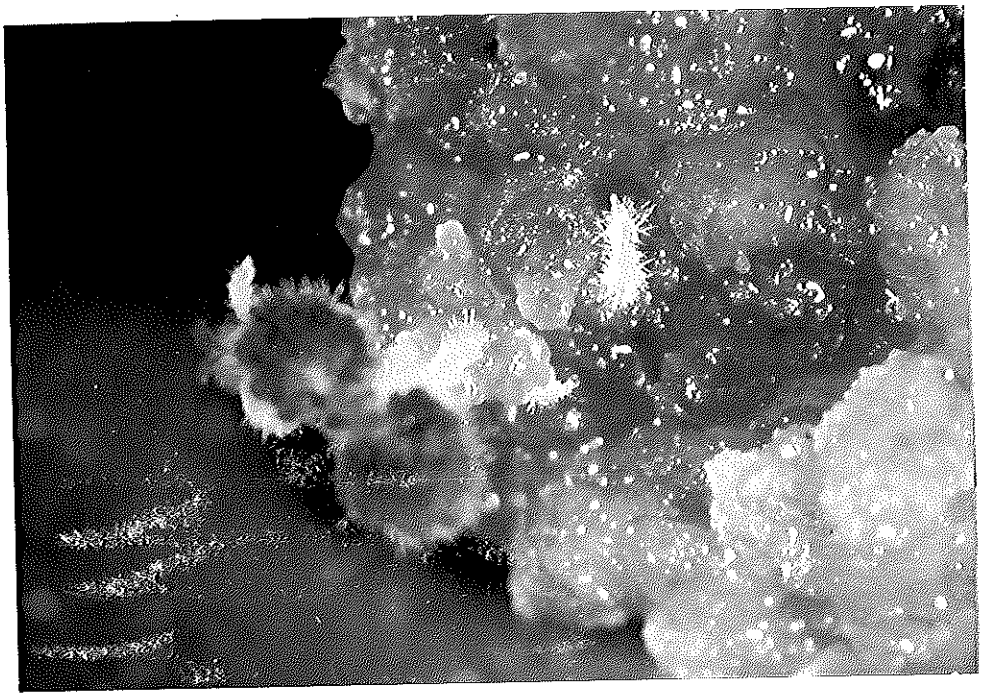
2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ สารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ในสภาพที่มีแสง ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน พบว่า อาหารเติม IAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้เพียงสูตรเดียว แคลลัสทั้งหมดที่วางเลี้ยงให้การสร้างยอดได้จำนวนยอดเฉลี่ย 10.6 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 7) และเกิดรากเฉลี่ย 13.8 รากต่อแคลลัส (รูปที่ 5) พัฒนาการของยอดจากแคลลัสเกิดหลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ส่วนอาหารเติม IAA ร่วมกับ KN สามารถชักนำรากได้เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 7 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัสของกล็อกซิเนียที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

ออกซิน (มก/ล)		ไซโทไคนิน (มก/ล)		จำนวนแคลลัสที่วางเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์สร้างยอด	จำนวนยอด (เฉลี่ย)	จำนวนราก (เฉลี่ย)
IAA	2,4-D	KN	BA				
0.5	-	-	1.0	10	0	0	0
1.0	-	-	1.0	10	100	10.6	13.8
1.0	0.125	-	1.0	10	0	0	0
1.0	0.25	-	1.0	10	0	0	0
0.5	-	5.0	-	10	0	0	>100
1.0	-	5.0	-	10	0	0	>100

การสร้างรากในอาหารเติม KN นั้นมีจำนวนมาก (มากกว่า 100 รากต่อแคลลัส) รากที่เกิดมีลักษณะอวบ ฉ่ำน้ำ และมีขน ไม่เหมือนรากทั่วไปที่ชักนำจากแคลลัส (รูปที่ 6) มีสีน้ำตาลคล้ายรากลอย



รูปที่ 5 ยอดที่ชักนำได้จากแคลลัสภายหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 6 ราก (ศรชี้) ที่ชักนำได้จากแคลลัสภายหลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และน้ำตาลแมนนิทอลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ

การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของกล็อกซิเนียโดยเลือกใช้ใบคู่ที่ 2-4 ด้วยเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และเพคโตไลเอส เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายเอนไซม์ดังกล่าวในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 โมลาร์ พบว่า น้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์เท่านั้นที่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวน 2.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ความมีชีวิต 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้น 0.3, 0.5, 0.6 และ 0.7 โมลาร์ แยกโปรโตพลาสต์ได้น้อยไม่สามารถแยกทำบริสุทธิ์และนับจำนวนได้ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

แมนนิทอล (โมลาร์)	จำนวนโปรโตพลาสต์ (ต่อกรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)	หมายเหตุ
0.3	*	0	
0.4	2.25×10^4	33.33	มีเศษเซลล์มาก
0.5	*	0	
0.6	*	0	
0.7	*	0	

* = จำนวนโปรโตพลาสต์มีน้อยไม่สามารถนับได้

3.2 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ พบว่า เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และเพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 35.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และเพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 4.5×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 42.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์อื่นๆแยกโปรโตพลาสต์ได้น้อยไม่สามารถแยกทำบริสุทธิ์และนับจำนวนได้ (ตารางที่ 9) โปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะกลม เต่ง มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน มีคลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 7)

ตารางที่ 9 ผลของเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์กล็อกซิเนียที่แยกจากใบ

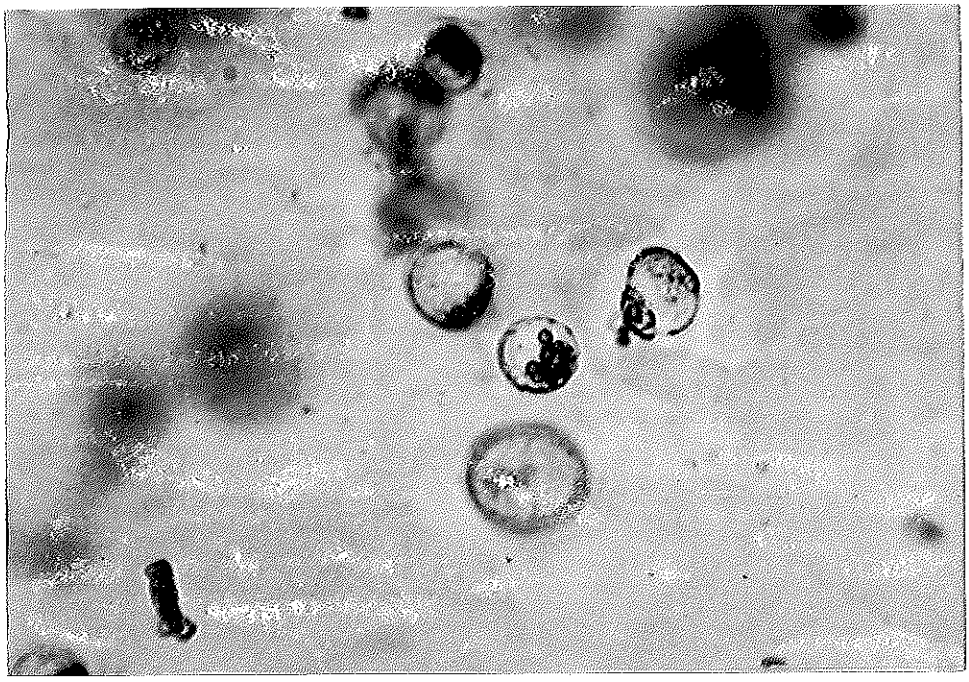
เอนไซม์ (%)						จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด	ความมีชีวิต (%)
Cellulase			Macerozyme	Pectolyase	Driselase		
TV	R-10	RS	R-10	Y-23			
3.0	-	-	1.0	0.5	-	*	
3.0	-	-	2.0	0.5	-	4.5×10^4	42.00
3.0	-	-	3.0	0.5	-	7.25×10^4	35.28
-	3.0	-	0.5	0.5	-	*	
-	-	2.0	2.0	0.5	2.0	*	
-	-	3.0	3.0	1.0	-	*	

- = ไม่เติม ไม่ใช้ และไม่ตรวจสอบ

* = จำนวนโปรโตพลาสต์มีน้อยไม่สามารถนับได้

TV = *Trichoderma viride*

เอนไซม์ทุกระดับความเข้มข้นละลายในแมนนิทอล 0.4 โมลาร์



รูปที่ 7 โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล็อกซิเนียเมื่อใช้เอนไซม์ เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และเพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (x 125)

3.3 ผลของชิ้นส่วนต่างๆ ของกล็อกซิเนียที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์

จากการใช้ชิ้นส่วนต่างๆของกล็อกซิเนียมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทำการอินคูเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ชิ้นส่วนแผ่นใบเท่านั้นที่สามารถทำการแยกโปรโตพลาสต์ได้ 3.25 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนชิ้นส่วนก้านใบและลำต้นสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนน้อย ไม่สามารถแยกทำบริสุทธิ์และนับจำนวนได้ (ตารางที่ 10) อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบมีเศษเซลล์ผสมอยู่มาก โดยเฉพาะขนที่เป็นองค์ประกอบของใบ

ตารางที่ 10 ผลของชิ้นส่วนต่างๆ ของกล็อกซิเนียต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ชิ้นส่วนพืช	จำนวนโปรโตพลาสต์ (ต่อกรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)
แผ่นใบ	3.25 x 10^4	30.75
ก้านใบ	*	0
ลำต้น	*	0

* = จำนวนโปรโตพลาสต์มีน้อยไม่สามารถนับได้

3.4 การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส

การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสซึ่งชักนำได้จากการวางเลี้ยงใบเป็นเวลา 30 วัน พบว่า การใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส RS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์และน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.8 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เท่ากับสารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส RS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตามการใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นออสโมติคัม 0.7 โมลาร์ ให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงกว่า (65.50 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 11 ผลของเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์กลีอกซิเนียที่แยกจากแคลลัส

เอนไซม์ (%)					แมนนิทอล (โมลาร์)	ระยะเวลาอินคูเบท (ชั่วโมง)	จำนวนโปรโตพลาสต์ (ต่อกรัมน้ำหนักสด)	ความมีชีวิต (%)
C	M R-10	P Y-23	D	F				
RS3.0	-	-	-	-	0.7	12	0	-
RS3.0	1.5	-	-	-	0.7	12	0	-
TV3.0	1.5	0.5	-	-	0.8	7	2 x 10^4	39.00
RS1.5	1.5	0.5	-	-	0.8	7	7 x 10^4	45.00
RS1.5	1.5	1.0	-	-	0.8	7	1.5 x 10^4	42.50
RS1.5	2.0	0.5	-	-	0.8	7	2 x 10^4	43.25
RS1.5	1.5	0.5	-	-	0.7	5	7 x 10^4	65.50
RS1.5	1.5	0.5	0.1	-	0.7	5	1.5 x 10^4	62.50
RS2.0	1.5	0.5	-	0.5	0.7	7	4.5 x 10^4	58.00
RS3.0	1.5	0.5	-	-	0.7	7	0	-

C = cellulase, M R-10 = macerozyme R-10, P Y-23 = pectolyase Y-23, D = driselase,

F = funcelase

การใช้เซลลูเลส RS เข้มข้นเกิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ว่าใช้เดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกับมาเซอโรไซม์ R-10 และเพคโตไลเอส Y-23 มีผลทำให้ปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ลดลงหรือแยกไม่ได้เลย การใช้ระยะเวลาในการอินคูเบท 5 หรือ 7 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้แต่มีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดรวมและแคลลัส

1.1 การชักนำยอดรวมและแคลลัส

การวางเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล็อกซิเนียเพื่อชักนำการเกิดยอดรวมพบว่า IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดรวมได้ ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สอดคล้องกับการทดลองของงานวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา (2533), อรุณี ม่วงแก้วงาม และ สมปอง เตชะโต (2535), Wuttisit และ Kanchanapoom (1996) และ ประศาสตร์ เกื้อมณี (2533) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า BA ให้จำนวนยอดสูงกว่า (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus densiflorus.*) ซึ่งพบว่า BA ให้จำนวนยอดรวมดีกว่า KN (Benmoussa *et al.*, 1996) แต่เมื่อเติม 2,4-D ลงในอาหารทั้งสองสูตรมีผลต่อการชักนำแคลลัสได้เพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับการทดลองของงานวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา (2533). และ Wuttisit และ Kanchanapoom (1996) ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ (Remotti and Loffler, 1995) แคลลัสเกิดขึ้นภายหลังการวางเลี้ยงใบเป็นเวลา 10 วัน ในระยะแรกเกิดเฉพาะก้านใบและเส้นกลางใบหลังจากนั้นจึงเกิดขึ้นทั่วทั้งใบ ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ มีสีขาวอมเหลือง แต่เมื่อทำการวางเลี้ยงต่อไปแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด เนื่องจาก 2,4-D ความเข้มข้นสูงทำให้เนื้อเยื่อมีการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น เป็นผลให้มีการสร้างสารประกอบพวกฟีโนล (phenolic compound) ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นและสารประกอบเหล่านี้จะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ฟีโนลิกออกซิเดส เกิดเป็นโพลิเมอร์สีน้ำตาลหรือดำ (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์, 2532) การป้องกันการเกิดสีน้ำตาลของแคลลัสโดยย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารใหม่สูตรเดิม หรือทำการวางเลี้ยงในสภาพมืด ตลอดจนการเติมกรดแอสคอร์บิค ลงในอาหารในการศึกษานี้ไม่สามารถป้องกันการตายของแคลลัสได้ แตกต่างกับการทดลองของ Rout และคณะ (1995) ซึ่งพบว่า การเติมกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 18.4 ไมโครโมลาร์ลงในอาหารสูตร MS หรือ WPM ที่ใช้เลี้ยงแคลลัสของ *Acacia catechu* สามารถป้องกันการเกิดสีน้ำตาลของแคลลัสได้แม้ว่ามีการใช้ 2,4-D ร่วมด้วยในระดับความเข้มข้นต่ำ

การชักนำแคลลัสของกล็อกซิเนียนอกจากการเติม 2,4-D แล้วการเติมสารประกอบอินทรีย์บางชนิด เช่น เคซีนไฮโดรไลเซต ซึ่งเป็นแหล่งช่วยเพิ่มสารประกอบที่มีไนโตรเจนและวิตามิน ช่วยในการชักนำแคลลัสได้เช่นกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Hoshino และคณะ (1995) Remotti และ Loffler (1995) นอกจากนี้การเติมสารสกัดจากมอลต์ ให้ผลส่งเสริมการสร้างแคลลัสเช่นเดียวกับการศึกษาของ Jumin และ Nito (1996) อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้พบว่า การเติมสารสกัดจากมอลต์ส่งเสริมการชักนำแคลลัสได้ดีกว่าเคซีนไฮโดรไลเซต เนื่องจากการชักนำแคลลัสของพืชแต่ละชนิดต้องการสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกัน

1.2 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสและการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส

การเจริญเติบโตของแคลลัสโดยการนำแคลลัสที่ชักนำได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ จำนวน 10 สูตรพบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมเพียง 3 สูตรเท่านั้น ได้แก่ MS3 (เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) MS6 (เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูตร MS8 (เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 6, รูปที่ 4) แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงสุดภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 16 วัน หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของแคลลัสเริ่มลดลง ดังนั้นในการเลี้ยงแคลลัสจึงควรทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 16 วันเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส

การเติม 2,4-D ลงในอาหารไม่ควรใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดมีน้ำตาลของแคลลัสได้ การเติม 2,4-D และสารสกัดจากมอลต์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส (อาหารสูตร MS3) แต่มีความจำเป็นในการชักนำแคลลัสซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hoshino และคณะ (1995) Remotti และ Loffler (1995) และ Jumin และ Nito (1996)

การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส พบว่า เกิดยอดรวมเฉพาะแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ยอดรวมพัฒนาภายหลังการวางเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 10 วัน แสดงให้เห็นว่า BA มีผลต่อการชักนำยอดรวมจากแคลลัสได้ดีกว่า KN สอดคล้องกับ Benmoussa และคณะ (1996) ซึ่งทำการทดลองชักนำยอดรวมจากแคลลัสของ sweet potato (*Ipomoea batatas*) จำนวนยอดรวมจาก

แคลลัสที่ชักนำได้ในการศึกษานี้ 10.6 ยอดต่อแคลลัส ซึ่งสูงกว่ารายงานการทดลองของ Wuttisit และ Kanchanapoom (1996) ซึ่งสามารถชักนำยอดรวมได้เฉลี่ยเพียง 3.5 ยอดต่อแคลลัสภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่เติม KN มีการพัฒนาของรากแต่เพียงอย่างเดียว แตกต่างกับการทดลองของงานวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา (2533) ซึ่งพบว่า การวางเลี้ยงก้านใบบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการพัฒนาของแคลลัสและเกิดรากยาว 1-2 มิลลิลิตร จำนวน 3-5 รากต่อแคลลัส รากมีลักษณะเป็นปุยสีขาว แต่เมื่อใช้ NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ สีเหลืองและแคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดเฉลี่ย 5 ยอดต่อแคลลัส

2. การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์และน้ำตาลแมนนิทอลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์สามารถกระทำได้ 2 วิธี คือ วิธีกล (mechanical isolation) และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นระดับออสโมติคัมของสารละลายเอนไซม์มีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีผนังเซลล์ การเลือกระดับออสโมติคัมที่เหมาะสมเป็นการป้องกันไม่ให้โปรโตพลาสต์เกิดความเสียหายในระหว่างทำการย่อยผนังเซลล์ ระดับออสโมติคัมที่สูงหรือต่ำเกินไปมีผลเสียคือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์เสียหาย ซึ่งมีผลต่อความมีชีวิตและปริมาณของโปรโตพลาสต์ ดังนั้นการทดลองนี้สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์เป็นตัวทำละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และเพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบได้โปรโตพลาสต์จำนวน 7.25 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (ตารางที่ 8) ส่วนแมนนิทอลความเข้มข้นอื่นๆไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ เนื่องจากน้ำตาลแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นไม่เหมาะสมทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกกระจายเป็นชิ้นเล็กๆ (Ruesink, 1971) การนำชิ้นส่วนพืชที่จะแยกโปรโตพลาสต์ไปแช่ในสารละลายออสโมติคัมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นระยะเวลาหนึ่งก่อน แล้วนำไปแยกโปรโตพลาสต์ ทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่แข็งแรงและมีจำนวนมากเพิ่มขึ้นด้วยสอดคล้องกับการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของพิทูเนีย (Jane and Sink, 1988) การแยกโปรโตพลาสต์จากใบยอดมันสำปะหลัง (Anthony *et al.*, 1995)

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล็อกซิเนียพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมคือ 0.4 โมลาร์และสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมประกอบด้วย เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และเพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 7.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดซึ่งแตกต่างกับการทดลองของมยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) ทำการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล็อกซิเนียโดยใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสเพียงอย่างเดียว ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนปลายยอดของอัฟริกันไวโอเล็ตซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับกล็อกซิเนียจากการทดลองของ Winkemann (1993) โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ให้ผลดี ในขณะที่การศึกษานี้ไดรซีเลสไม่ส่งเสริมการแยกโปรโตพลาสต์

การเลือกใช้ชิ้นส่วนต่างของกล็อกซิเนียในการศึกษานี้พบว่า ใบเท่านั้นที่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ ส่วนชิ้นส่วนก้านใบ และลำต้นไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เหมาะสมเฉพาะใช้แยกโปรโตพลาสต์จากใบเท่านั้น ส่วนชิ้นส่วนอื่นๆอาจต้องใช้สารละลายเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Ochatt (1993) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนราก ใบและลำต้นของลูกผสม *Weigla* x *florida* cv. Bristol Ruby โดยเลือกใช้สารละลายเอนไซม์ที่แตกต่างกันตามชนิดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสซึ่งได้จากการวางเลี้ยงใบพบว่า เซลลูเลส RS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ อินคูเบทเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์ได้ 7×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 65.50 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาแยกโปรโตพลาสต์จากใบใช้ค่าออสโมติคัม 0.4 โมลาร์ พบว่า มีเศษเซลล์ที่แตกเป็นจำนวนมากทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าออสโมติคัมที่ใช้ต่ำเกินไปมีผลทำให้เกิดการแพร่ของน้ำเข้าสู่โปรโตพลาสต์มากจนโปรโตพลาสต์แตก (Dan and Stephen, 1991) ดังนั้นการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสจึงเลือกใช้ค่าออสโมติคัมที่สูงขึ้นคือ 0.7 โมลาร์ มีผลทำให้สามารถลดระยะเวลาในการอินคูเบทให้น้อยลง ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้เพิ่มขึ้น

บทที่ 5

สรุป

1. การชักนำการเกิดยอดรวม ทำการวางเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 97 ยอดต่อใบ ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

2. การชักนำแคลลัส วางเลี้ยงใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลต์เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ชักนำได้มีสีขาวอมเหลือง มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ

3. การเพิ่มปริมาณแคลลัส วางเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำได้บนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS3) แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงสุดภายหลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 16 วัน จากการนั้นการเจริญเติบโตเริ่มลดลง

4. การชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัส นำแคลลัสที่ชักนำได้ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 10.6 ยอดต่อแคลลัส

5. ความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ คือ 0.4 โมลาร์

6. สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบประกอบด้วย เซลลูเลส (*Trichoderma viride*) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ อินคูเบทเป็นเวลา 7 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 7.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

7. ชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของกล็อกซิเนีย คือ ชิ้นส่วนใบ

8. สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส ประกอบด้วย เซลลูเลส RS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์และแมนนิทอลเข้มข้น 0.8 โมลาร์ และสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส RS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เพคโตไลเอส Y-23

เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวน 7×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

เอกสารอ้างอิง

งานวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา. 2533. การขยายพันธุ์กล็อกซิเนียโดยการเพาะเลี้ยงก้านใบ. รายงานโครงการวิจัยฝ่ายวางแผนและพัฒนา วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา.

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์. 2534. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2533. การชักนำให้เกิด somatic embryo จากแผ่นใบของต้น gloxinia (*Sinningia speciosa*) การประชุมวิชาการสาขาพืชครั้งที่ 28. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 222-225.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

พัฐวดี ทองสีดำ. 2535. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มยุรี วุฒิสิทธิ์. 2539. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล็อกซิเนีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิไลลักษณ์ ชินะจิตรและสุธาทิพย์ การรักษา. 2537. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มะเขือเทศ. แก่นเกษตร 22 : 133-138.

สุธานิธิ์ ยุกตะนันท์, อุไร จิรมงคลการ และ วชิรพงศ์ หวลบุตตา. 2540. กล็อกซิเนีย. ไม้ดอกแสนสวย หน้า 32-33. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

สมปอง เตชะโต. 2532. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2525. กล็อกซิเนีย. ไม้ดอกกระถาง หน้า 45-154. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรวิทยา.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2525. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา พรหมบุญ. 2536. พันธุศาสตร์ที่เป็นพื้นฐานของเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 1 : 48-52.

อรุณี ม่วงแก้วงาม และ สมปอง เตชะโต. 2535. การขยายพันธุ์กล็อกซิเนียโดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. แก่นเกษตร 20 : 336-342.

Anthony, P., Davey, M. R., Power, J. B. and Lowe, W. C. 1995. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23 : 393-395.

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

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

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

Fabienne, B. F. 1992. The influence of some natural cell-wall derived precursors on organogenesis and differentiation of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28 : 91-96.

Francesco, C., Pasquale, F. D. and Francesco, G. C. 1994. Somatic embryogenesis from styles of lemom (*Citrus limon*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37 : 209-211.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirement for suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research 50 : 151-158.

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

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

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

Iona, E. W. O. and Lindsay, G. C. 1993. Protoplasts to plant of Gentianaceae regeneration of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) is affected by calcium ion preconditioning, osmolality and pH of the culture media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 31-37.

Jane, F. and Sink, K. C.,1988. Plantlet regeneration from protoplast of *Petunia alpicola*. HortScience 23 : 393-395.

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

Kuijpers, A. M., Bouman, H. and Klerk, G. J. 1996. Increase of embryogenic callus formation in cucumber by initial culture on high concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46 : 81-83.

Kumar, U. 1992. Somatic embryogenesis and high frequency plantlet regeneration in callus culture of *Thevetia peruviana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31 : 47-50.

Lou, H., Obara-Okeyo, P., Tamaki, M. and Kako, S. 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. Journal of Horticulture Science 71 : 497-502.

Man-Ho, O. and Sang-Gu, K. 1994. Plant regeneration from petal protoplast culture of *Petunia hybrida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 275-283.

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

Murashige, T. and Tucker, D. H. P. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. 1st Citrus Symp. 3 : 155-1161.

Nakamura, M. and Macada, M. 1994. Isolation and culture of protoplasts from young sporophytes of *Salvinia natans* aseptically obtained by co-culture of female and male gametophytes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 237-242.

Narasimhulu, S. B., Kirti, P. B., Prakash, S. and Chopra, V. L. 1993. Rapid and hight frequency shoot regeneration from hypocotyl protoplasts of *Brassica nigra.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32 : 35-39.

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

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

Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* a multipurpose leguminous tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42 : 283-285.

Ruesink, A. W. 1971. The plasmamembrane of *Avena.* coleoptile protoplast. Plant Physiol 47 : 192-195.

Shimizu, K., Yabuya, T. and Adachi, T. 1996. Plant regeneration from protoplasts of *Iris germanica* L. Euphytica 89 : 223-227.

Smith, R. H. and Norris, R. E. 1983. *In vitro* propagation of African violet chimeras. HortScience 18 : 436-437.

Winkelmann, T. 1993. Protoplast regeneration of African violet. African Violet 46 : 50-52.

Wuttisit, M. and Kanchanapoom, K. 1996. Tissue culture propagation of gloxinia. Suranaree J. Sci. Technol 3 : 63-67.

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

Yang, Z. N., Xu, Z. H. and Wei, Z. M. 1994. Cauliflower inflorescence protoplast culture and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 191-195.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. องค์ประกอบของอาหารสูตร MS ที่ใช้ในการวางเลี้ยงใบกล็อกซิเนีย

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1. ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	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
$ZnSO_47H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
3. ธาตุเหล็ก	
$FeSO_47H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCL	0.50
ThiamineHCL	0.10

ตารางผนวกที่ 2. สารละลาย CPW (cell protoplast washing)

องค์ประกอบ	ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$MnSO_4.H_2O$	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
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
Mannitol	72,868.00 (0.4 M)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายเชาวลิต บุญศรี
วัน เดือน ปีเกิด	1 มกราคม 2501
อาชีพ	รับราชการ ตำแหน่งอาจารย์ 2 ระดับ 6
สถานที่ทำงาน	วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสตูล
	อ.ควนกาหลง จ. สตูล 91130
	โทรฯ (074)-791013

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทษ.บ. (พืชศาสตร์)	สถาบันเทคโนโลยีทางการเกษตรแม่โจ้	2524