# รายงานการวิจัย

เรื่อง

## การรวมโปรโตพลาสของพืชตระกูลถั่ว : การพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียว โดยวิธีการรวมโปรโตพลาส

**(Protoplast Fusion of legume : Mung bean Development by Protoplast Fusion)**

โดย


นางนงพร สิทธิเจริญชัย

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



QK495.L52 N23 2539

10 ต.ค. 2539

Order Key.....

BIB Key.....



2539

# บทคัดย่อ

จากการศึกษาการแยกโปรโตพลาสจากส่วนของใบ รากและลำต้นของต้นอ่อนถั่วเขียวพันธ์ มอ.1 อู่ทอง2 ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 1 และเชียงใหม่ 60 โดยการใช้น้ำย่อย (Enzyme) 2.5% cellulase R-20, 0.05% pectalyse Y23, และ 1% drilelase ร่วมกับการทำให้บริสุทธิ์ โดยการปั่นแยก 80 และ 90 g ในเวลา 8 นาที พบว่าการปั่นแยก 90 g ในเวลา 8 นาที ให้ผลดีกว่า 80g ในเวลา 8 นาที จำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ในถั่วเขียวพันธ์มอ. 1 สามารถแยกได้ดีในลำต้น ใบ และปลายรากตามลำดับ ในลำต้นแยกได้ถึง $9.07x10^4$/ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ในถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 2 สามารถแยกได้ดีที่สุดในใบ ลำต้นและปลายรากตามลำดับ ในใบแยกได้ถึง $8.8x10^4$/น้ำหนัก 1 กรัม ส่วนในถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ สามารถแยกได้ดีที่สุดในใบ ลำต้นและปลายรากตามลำดับ แต่จำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ยังมีจำนวนน้อย พันธุ์ สจ.2 สามารแยกได้สูงสุด $1.2x10^4$/น้ำหนักสด 1 กรัม ส่วนในพันธุ์เชียงใหม่ 60 แยกได้สูงสุดในใบ $0.18x10^4$/น้ำหนักสด 1 กรัม ความมีชีวิตของโปรโตพลาสที่แยกได้อยู่ ระหว่าง 76-89%

# Abstract

In the protoplasm isolation experiment carried with leave, stem and root tip on mungbean and soybean seedling, PSU.1 , U-thong 2, SJ. 2 and Chiangmai 60, using 2.5 % cellulase R-10, 0.05 % pectolyase Y 23 and 1% drielase and centrifused at 80g and 90g for 8 minutes, found that the used of 90g given a better result. The isolation of PSU. 1 gave a better result from stem, $9.04x10^4$ / 1 gramme of wet basis, leave and root tip respectively. While U-Thong 2 gave a better result of leave extraction, 8.8x104 /gramme of wet basis, stem and root tip respectively. The result from soybean, SJ. 2, shown better result in leave, stem and root tip of maximum extraction of $1.2x10^4$/ gramme of wet basis. In Chiangmai 60, leave extraction gave a better result of $0.18x10^4$/gramme of wet basis. The viability of protoplasm isolation from this experiment was around 76-89%.

สารบาญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| สารบาญ | ค |
| สารบาญตาราง | ง |
| บทนำและวัตถุประสงค์ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 5 |
| ผลการทดลอง | 10 |
| วิจารณ์ | 18 |
| สรุปผลการทดลอง | 19 |
| เอกสารอ้างอิง | 20 |

# สารบาญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้จากใบ, ลำต้น, ราก จากถั่วเขียว (พันธุ์ ม.อ. 1) /x$10^4$/ น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยก 80 g และ 90 g เป็นเวลา 8 นาที | 10 |
| 2. | แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้จากถั่วเขียว (พันธุ์อู่ทอง 2) x$10^4$/ น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่น แยก 80 g และ 90g เป็นเวลา 8 นาที | 12 |
| 3. | แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้จากถั่วเหลือง (พันธุ์ ส.จ.2) x$10^4$/ น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยก 80g และ 90g เป็นเวลา 8 นาที | 14 |
| 4. | แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ในถั่วเหลือง (พันธุ์เชียงใหม่ 60) x $10^4$ น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยก 80g และ 90g เป็นเวลา 8 นาที | 16 |


file viga.doc

# บทนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) เป็นพืชที่นิยมปลูกในช่วงต่อของฤดูการทำนาซึ่งเป็นระยะหน้าแล้ง เพราะเนื่องจากเป็นพืชที่มีอายุสั้น (45 วัน) และยังต้องการน้ำในปริมาณน้อยในการเจริญเติบโต นอกจากนั้นยังเป็นพืชที่ต้องการการดูแลรักษาน้อยกว่าพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง หรือถั่วลิสง

ในบริเวณท้องถิ่นในทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะพื้นที่รับน้ำที่จะก่อให้เกิดทางน้ำสายสั้น ๆ นอกจากนั้นยังมีปริมาณน้ำฝนที่ตกอย่างหนาแน่น ก่อให้เกิดสภาวะน้ำท่วม และจะมีการท่วมขังในพื้นที่อย่างฉับพลัน เช่น ในพื้นที่บริเวณอำเภอสะทิงพระ และจังหวัดพัทลุง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปลูกข้าวมาก นอกจากนี้การจัดรูปการปลูกข้าวซึ่งมีลักษณะเป็นแปลงที่มีคันนา ยังเป็นตัวการบังคับให้น้ำท่วมขังในพื้นที่ที่อยู่เป็นเวลานานอีกด้วย

ถั่วเขียวเป็นพืชทนแล้งได้ดีกว่าถั่วชนิดอื่น แต่ในทางตรงกันข้ามถั่วเขียวไม่สามารถทนสภาพน้ำท่วมขังสลับกับการขาดน้ำได้ ซึ่งเป็นจุดอ่อนของพืชชนิดนี้ นอกจากนี้ผลผลิตต่ำ ซึ่งทำให้เกษตรกรได้รับผลตอบแทนในการปลูกไร่ละ 500-600 บาทเท่านั้น แต่เกษตรกรโดยทั่วไปก็ยังนิยมปลูกถั่วเขียว เนื่องมาจากเสียค่าใช้จ่ายและเวลาในการดูแลรักษาต่ำ และได้รับผลพลอยได้ในการบำรุงดิน เพราะเนื่องจากถั่วเขียวสามารถตรึงธาตุไนโตรเจนจากอากาศให้กับดินได้อีกด้วย

ถั่วเหลือง (*Glycine max*) เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่สามารถปลูกหลังฤดูเก็บเกี่ยวได้ จากลักษณะขนาดลำต้นและกิ่งก้านสาขาที่มีขนาดใหญ่และมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเขียว ซึ่งถ้าถั่วเขียวมีขนาดลำต้นใหญ่ขึ้น และกิ่งก้านสาขามากขึ้น จะทำให้ต้นมีโอกาสที่จะติดฝักได้มากขึ้น จะทำให้เพิ่มผลผลิตได้มากขึ้น เพราะผลผลิตขึ้นอยู่กับจำนวนฝักที่ติด ขนาดของฝัก และน้ำหนักของเมล็ด นอกจากนั้นจำนวนรากขึ้นกับขนาดต้น เมื่อต้นมีขนาดใหญ่ขึ้น จำนวนรากมีมากขึ้นด้วย ทำให้จำนวนปมในการดูดซับไนโตรเจนจากอากาศมาบำรุงดินสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้การมีปริมาตรวัสดุแห้ง (dry matter) สูงขึ้น ยังทำให้มีปริมาณของเศษทรากพืชที่จะสลายตัวเป็นอินทรียวัตถุภายในดินเพิ่มขึ้น จึงช่วยรักษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของดินให้ดีขึ้น และถั่วเหลืองเป็นพืชที่ทนต่อสภาพน้ำท่วมขังได้ดีกว่าถั่วเขียว ซึ่งเป็นลักษณะที่ดี ถ้าสามารถนำเอาลักษณะนี้ไว้ได้ในถั่วเขียว

การก่อให้เกิดถั่วเขียว ซึ่งมีลักษณะทนต่อสภาพน้ำท่วมขังได้ดีขึ้น มีผลผลิตสูงสามารถทำได้โดยการคัดพันธุ์ ซึ่งการรวมโปรโตพลาสตของพืช เป็นวิธีหนึ่งซึ่งจะก่อให้เกิดลูกผสมได้

การทดลองนี้ จึงต้องการศึกษาหาความเป็นไปได้ในการแยกโปรโตพลาสในถั่วเขียว ม.อ.1 และพันธุ์อู่ทอง2 และแยกโปรโตพลาสในถั่วเหลืองพันธุ์ ส.จ.2 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 และศึกษาหาความเป็นไปได้ในการรวมโปรโตพลาสทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน

การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อพืช ปัจจุบันมนุษย์สามารถศึกษาจากเซลเล็ก ๆ ที่ได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชและสามารถเลี้ยงเซลนั้นเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ทุกประการได้ เพราะเซลทุกเซลของพืชมีคุณสมบัติพิเศษที่กลับกลาย (differentiate) เป็นต้นพืชได้

งานวิจัยทดลอง ทางด้านเซลนั้น เริ่มมาจากปี ค.ศ. 1953 งานของ Muir ได้นำเนื้องอก (callus) มาเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าให้เซลแยกจากกันเป็นเซลเดียว ๆ ต่อมา งานของ Muir และคณะ (1954) ก็ประสบความสำเร็จในการแยกเซลเดี่ยว ๆ มาเลี้ยงบนก้อนเนื้องอก (callus) โดยมีกระดาษกรองวางระหว่างก้อนเนื้องอกและเซลเดี่ยว เพื่อให้ก้อนเนื้องอก (callus) เป็นพี่เลี้ยงให้ปัจจัยต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลจากอาหารที่มีอยู่

Nickell (1956) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเซลของถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว ต่อมางานของ Melchers & Bergmann (1959) ได้มีการเลี้ยงเซลแบบต่อเนื่อง โดยการเติมอาหารใหม่ ตลอดเวลาพร้อมทั้งนำเซลที่เลี้ยงได้มาใช้ประโยชน์และพัฒนามาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม

Bergmann (1960) เป็นผู้พัฒนาเทคนิคการแยกเซลเป็นครั้งแรกโดยการกรองเอาเซลออกจากกลุ่มของเซล แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารวุ้น จากเซลเดี่ยว ๆ มีการแบ่งเซลเป็นกลุ่มเซล

Jones (1960) และคณะได้ทำการทดลองเลี้ยงเซลเดี่ยว ๆ ในสภาพของหยดอาหาร (micro-drop) และสามารถติดตามการเจริญของเซลได้ตลอดเวลา

Vasil และ Hildebrandt (1965) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเซลเดี่ยว ๆ และสามารถเลี้ยงเซลเดี่ยวของยาสูบจนพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้

งานทางด้านโปรโตพลาสนั้น เริ่มมีการศึกษาในปี ค.ศ. 1892 ซึ่งเป็นงานของ klercher ได้แยกโปรโตพลาสออกมาโดยวิธีใช้มีดโกนตัดเซลให้ส่วนที่เป็นโปรโตพลาสแยกตัวออกจากส่วนอื่น ๆ ของพืชที่แช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง แต่การแยกโปรโตพลาสครั้งนั้น พบว่ามีจำนวนของโปรโตพลาสที่แยกได้น้อยมาก จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1960 Cocking และคณะได้ทดลองใช้น้ำย่อย (enzyme) cellulase ในการแยกโปรโตพลาสจากส่วนปลายราก โดยใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงช่วยในการแยก เพื่อป้องกันการแตกของโปรโตพลาส ซึ่งได้รับผลสำเร็จและต่อมาก็ประสบความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสของผลมะเขือเทศและสามารถสร้างผนังเซลขึ้นใหม่ได้

Takebe และคณะ (1968) ได้ใช้วิธีกลและการใช้น้ำย่อย (enzyme) ร่วมกันทำให้สามารถแยกโปรโตพลาสจากยาสูบได้เป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่สามารถกระตุ้นให้โปรโตพลาสแบ่งตัวเป็นเนื้องอก (callus) ได้

ต่อมา Nagata et Takebe (1978) ได้ประยุกต์อาหารจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog โดยใช้สารที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า และเพิ่มวิตามินบางชนิดเข้าไป ทำให้โปรโตพลาสแบ่งตัว

เป็นกลุ่มเซลขนาดเล็กได้ ต่อมา Takebe, Labib และ Melchers (1978) ได้ร่วมกันศึกษาและพัฒนาวิธีการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสของยาสูบ จนกระทั่งได้เป็นพืชที่สมบูรณ์ได้

การค้นพบวิธีการรวมตัวของโปรโตพลาสเพื่อให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ ๆ นี้ จึงเป็นแนวทางอันหนึ่งที่นักผสมพันธุ์พืชนำมาใช้ประโยชน์ มีการศึกษาการรวมตัวของโปรโตพลาสระหว่างพืชต่างชนิด (speceis) กัน เช่น ถั่วเหลือง กับยาสูบ (Kao, 1977) แครอทกับข้าวบาร์เลย์ (Dudits et al, 1976) หรือแครอทกับยาสูบ (Gosch and Rienert, 1978) พบว่าลูกผสมนั้นไม่สามารถแบ่งตัวและเจริญเติบโตต่อไปได้

งานทดลองกับพืชที่มีความใกล้ชิดกันทางสายพันธุ์มากขึ้น เช่น มะเขือเทศ กับมันฝรั่ง (Melchers, 1980) ซึ่งเป็นการผสมข้ามสกุล ลูกผสมที่ได้สามารถเจริญเป็นต้นได้และมีลักษณะระหว่างต้นพ่อกับต้นแม่ แต่ลูกผสมที่ได้เป็นหมัน การผสมระหว่างยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *Nicotiana nesophila* ซึ่งเป็นพันธุป่ากับ *Nicotiana tabacum* (Evan et al.,1981) พบว่าลูกผสมที่ได้มีความต้านทานต่อโรคจากเชื้อไวรัส (Virus)

**วิธีการรวม Protoplast**

**1. โดยการใช้สารเคมี**

วิธีการรวมตัวของ protoplast เริ่มจากงานทดลองของ Carlson et al., (1972) โดยใช้โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) เข้มข้นสูง ซึ่งเป็นพิษต่อพืช และทำให้เปอร์เซ็นของการรวมตัว เพิ่มจากการรวมตัวเองตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อย

Kao และ Michayluk (1974) ได้ใช้ polyethylene glycol (PEG) ผสมลงในส่วนผสมของโปรโตพลาสที่ได้จากพืช 2 ชนิด

Vasil et al., (1975) พบว่าการรวมตัวของโปรโตพลาสทำได้ถึง 100% โดยใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1540-6000 และมีความเข้มข้น 10-50%

Glimelius et al., (1978) พบว่าการรวมตัวของโปรโตพลาส (protoplast) อาจเพิ่มขึ้นถ้ามีผสมสารเคมีบางชนิดลงไป เช่น Concanovalin A ลงในสารละลาย PEG ทำให้การเกาะตัวกันของโปรโตพลาสแน่นมากขึ้น และไม่หลุดจากกันในขณะที่ทำการล้างโปรโตพลาส

Haydu et al (1977) พบว่า การใช้สาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) เข้มข้น 15% สามารถเพิ่มการรวมตัวของโปรโตพลาสจาก 3% เป็น 15%

จากศึกษาของ Nagata (1978) พบว่า polyvinyl alcohol (PVA) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 500 จะช่วยให้การรวมตัวของโปรโตพลาสเป็นไปได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ PVA ตัวอื่น ๆ

2. **โดยวิธีทางไฟฟ้า (electric fusion)**

จากการศึกษาของ Senda et al (1979) โดยใช้ microelectrode ที่เป็นแก้ว สอดเข้าไปในส่วนผสมของโปรโตพลาส ใช้กระแสไฟ 5-12 microhm เป็นเวลา $\frac{2}{1000}-\frac{4}{1000}$ วินาที สามารถกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของโปรโตพลาสได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. พันธุ์ที่ใช้ทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ถั่วเขียวพันธุ์ ม.อ1 และพันธุอู่ทอง 2 สำหรับถั่วเหลืองใช้พันธุ์ ส.จ.2 และเชียงใหม่ 60

2. สารเคมี

- สารละลาย CPW:

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 27:2 mg/l |
| $KNO_3$ | 101 mg/l |
| $CaCl_2 . 2H_2O$ | 1480 mg/l |
| $MgSO_4 . 7H_2O$ | 246 mg/l |
| KI | 16 mg/l |
| $CuSO_4 . 5H_2O$ | 0.025 mg/l |
| pH. 5.8 | |

- ใช้อาหารสูตรพื้นฐาน MS. เพาะเลี้ยงเมล็ด
- ใช้น้ำย่อย (enzyme) : 2.5% cellulase R-10
  0.05% pectolyase Y23, 1% driselase
- สารละลายน้ำตาล sucrose
- สารละลายรักษาความดันออสโมซิส (osmosis) : manitol 13%

- สารละลาย SF.

P.E.G. (Polyethylene-glycol) = 30%

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$ | = 66 mM |
| glucose | = 0.4 M |
| pH. | 5.8 |

- สารละลาย SR.

9 ส่วนโดยปริมาตรของ

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$ | 66 mM |
| DMSO (Dimethyl sulfoxide) | 10% |
| glucose | 0.4 M |

ผสมกับ 1 ส่วนโดยปริมาตรของ

| | |
|---|---|
| glycine | 0.3 M |
| pH. = 10.5 | |

3. เครื่องชั่งละเอียด (balance)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (p.H.meter)
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (auloclave)
6. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
7. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
8. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuse)
9. เครื่องกรองจุลินทรีย์ ที่มีที่กรองขนาด 0.22 micron
10. ที่กรองไนลอนที่มีขนาดกรอง 70 และ 110 ไมครอน (micron)
11. หลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuse) พร้อมที่วางหลอด
12. แผ่นแก้วหนาใช้รองเวลาตัดชิ้นส่วนของพืช
13. มีด ปากคีบ
14. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น บีคเก้อร์ จานแก้ว (petri-disk), ปิเปต (pipette),พลาสเจอร์ ปิเปต (pasture pippette), แผ่นสไลด์ พร้อมด้วยแผ่นปิดสไลด์ , แผ่นสไลด์นับจำนวนเซล (Nageotte)
15. พาราฟิล์ม (parafilm)

**วิธีการทดลอง**

ขั้นที่ 1 การเตรียมอาหาร สารละลายรักษาความดันและน้ำย่อย

1. เตรียมอาหารตามสูตรพื้นฐานของ M.S นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ p.H 5.8

2. เตรียมสารละลาย CPW. และ manitol 13% ในขวดที่ 1 เป็นสารละลายรักษาความดัน

3. เตรียมสารละลาย CPW. และ sucrose 25% ปรับ p.H 5.8 เป็นสารละลายน้ำตาลใช้เป็นสารละลายล้างโปรโตพลาส

4. เตรียมสารละลาย CPW. และน้ำย่อยตามสัดส่วนข้างต้น และ manitol 13% ปรับ p.H 5.8 เป็นสารละลายย่อยผนังเซล (cell-wall)

กรองสารละลาย 2,3,4 ตามลำดับก่อนหลังด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์ เพื่อกรองจุลินทรีย์ออกจากสารละลายเก็บใส่ขวดไว้

ขั้นที่ 2 การเตรียมวัสดุ และย่อยผนังเซลพืช

1. นำเมล็ดถั่วแต่ละพันธุ์มาฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 5% เป็นเวลา 5 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปเพาะในอาหารวุ้นสูตรพื้นฐานของ M.S

2. นำต้นกล้าที่ได้ มาแยกเป็นส่วน ๆ ออกเป็นส่วนของใบ, ลำต้น และราก นำแต่ละส่วนมาชั่งน้ำหนัก บันทึกเก็บไว้

3. ในส่วนของใบ ดึงเอพิเดอร์มิสด้านบน (upper epidermis) ออกด้วยปากคีบปลายแหลม จากนั้นตัดชิ้นส่วนของใบออก เป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ประมาณ 0.4 x 0.4 ซม.

4. ส่วนของลำต้น ตัดออกเป็นท่อน ๆ สั้น ๆ ประมาณ 0.4-0.5 ซม.

5. ส่วนของราก นำรากมาตัดเป็นท่อน ๆ สั้น ๆ ประมาณ 0.4-0.5 ซม.

6. แช่เนื้อเยื่อพืชที่ตัดแล้ว ด้วยสารละลายรักษาความดันจนท่วมเนื้อเยื่อพืช โดยแช่แยกกัน เป็นเวลา 30 นาที ในจานแก้ว

7. ดูดสารละลายที่แช่ออกด้วยปิเปต

8. เติมสารละลายน้ำย่อย (enzyme) ในจานแก้วจนท่วมเนื้อเยื่อพืช

9. ปิดฝาจานแก้ว นำไปวางบนชั้นรวมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ขั้นที่ 3 การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

1. กรองสารละลายที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ผ่านเครื่องกรองไนลอนเพื่อแยกโปรโตพลาสออกจากชิ้นส่วนอื่น ๆ ของพืชโดยใช้เครื่องกรองขนาด 70 ไมครอน

2. แยกโปรโตพลาสออกจากน้ำย่อย โดยการนำมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ วางหลอดบนที่วางเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นแยกด้วยแรง 80 g และ 90 g 8 นาที

3. โปรโตพลาสจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ดูดน้ำย่อยออก เติมสารละลายรักษาความดันออสโมซิส นำไปปั่นแยกด้วยแรง 80g และ 90g 8 นาที อีกครั้งหนึ่ง ดูดสารละลายด้านล่างที่มีโปรโตพลาสอยู่เก็บไว้ในหลอด

4. แยกโปรโตพลาสออกจากเศษเซลเล็ก ๆ ที่ถูกย่อยเหลืออยู่ โดยเติมสารละลายน้ำตาล (sucrose) ที่เตรียมไว้แล้วลงไปในหลอด ๆ ละ 9 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร และเติมสารรักษาความดัน 1 ลูกบาศก์เซ็นติเมตรไว้ชั้นบน นำไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 80 g และ 90 g เป็นเวลา 8 นาที จะเห็นชั้นของโปรโตพลาสอยู่ระหว่างชั้นของสารละลายน้ำตาลที่อยู่ด้านล่างและชั้นของสารละลายรักษาความดันออสโมซิสอยู่ด้านบน ส่วนของเศษเซลที่ถูกย่อยตกอยู่ที่ก้นหลอด

5. ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสมาเก็บไว้ หลังจากนั้นนำหลอดเก่าไปปั่นแยกโปรโตพลาสอีก 2 ครั้ง เพื่อแยกโปรโตพลาสออกมาให้หมด

6. ล้างโปรโตพลาสด้วยสารละลายรักษาความดัน 2-3 ครั้ง

ขั้นที่ 4 หาจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้

1. เติมสารละลาย CPW. ในหลอดที่ได้ เพื่อปรับปริมาตรของโปรโตพลาส นับจำนวนของโปรโตพลาสที่ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยสไลด์นับจำนวนเซล (Nageotte) จะได้จำนวนของโปรโตพลาสใน 1 มิลลิลิตร บันทึกข้อมูลที่ได้จากการแยกในใบ ราก และลำต้น

2. หา % ความมีชีวิตของโปรโตพลาสด้วยการย้อมสีนิวทรัลเรด (neutral red) ความเข้มข้น 0.1% ในสารละลายล้างโปรโตพลาส

ขั้นที่ 1 หยดสารละลายที่มีโปรโตพลาสลงบนสไลด์ 1 หยด นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โปรโตพลาสที่มีชีวิตจะมีลักษณะกลม ขอบเซลเรียบ เห็นคลอโรพลาสได้ชัดเจน หาเปอร์เซ็นความมีชีวิตของโปรโตพลาสโดยการนับจำนวน และย้อมสีซ้ำอีกครั้ง

ขั้นที่ 2 สุ่มตัวอย่างสารละลายที่มีโปรโตพลาสอยู่จำนวนหนึ่งในหลอดทดสอบ จากนั้นหยดสีนิวทรัลเรด 0.1% ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้สีซึมเข้าไปภายในโปรโตพลาสจากนั้น หยดลงมาแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนโปรโตพลาสที่ติดสีแดงหาเปอร์เซ็นต์ที่ติดสีแดง เปรียบเทียบกับจำนวนทั้งหมด ก็จะได้เปอร์เซ็นต์ของโปรโตพลาสที่มีชีวิต บันทึกผลการทดลอง

ขั้นที่ 5 การทดลองรวมโปรโตพลาส

1. เตรียมสารละลาย SF และ SB
2. ผสมโปรโตพลาสระหว่างถั่วเขียว และถั่วเหลือง รวม 4 คู่ การทดลองคือระหว่าง
   ถั่วเขียวพันธุ์ มอ.1 กับถั่วเหลือง ส.จ.2
   ถั่วเขียวพันธุ์ มอ 1 กับเชียงใหม่ 60
   ถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 2 กับถั่วเหลือง ส.จ.2
   ถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 2 กับถั่วเหลืองเชียงใหม่60
3. ผสมโปรโตพลาสระหว่างถั่วเขียวและเหลืองในแต่ละคู่การทดลองในหลอดทดสอบโดยใช้ปริมาตร 1:1 ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
4. นำมาปั่นแยกเพื่อให้โปรโตพลาสตกตะกอน แยกเอาเฉพาะโปรโตพลาส ความเข้มข้น $10^6$ เซล/มิลลิลิตร
5. หยดโปรโตพลาสลงในจานแก้ว 4 หยด ในแต่ละจานแก้ว ทิ้งไว้ 5 นาที
6. เติมสารละลาย SR ลงไป 1 หยดในแต่ละหยดของโปรโตพลาส ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้ P.E.G ไปกระตุ้นให้เกิดสัมผัสกันของโปรโตพลาส และเกิดการรวมตัวกัน
7. ล้างด้วยสารละลาย SF 2-3 ครั้ง โดยการหยดลงไปบนหยดของโปรโตพลาส จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงโปรโตพลาส ปิดฝาจานแก้วปิดผนึงด้วยพาราฟิล์ม
8. นำไปตรวจสอบการรวมตัวกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**ผลการทดลอง**

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้จากใบ, ลำต้นและราก $x10^4$/น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยก 80g และ 90g เป็นเวลา 8 นาที ของถั่วเขียวพันธุ์ มอ.1

| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 80g 8 นาที | ใบ | | ลำต้น | | ปลายราก | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชี |
| ครั้งที่ 1 | 7.5 | 83 | 9.2 | 80 | 0.29 | 80 |
| ครั้งที่ 2 | 6.9 | 90 | 8.5 | 90 | 0.65 | 82 |
| ครั้งที่ 3 | 8 | 80 | 9 | 80 | 0.41 | 75 |
| ค่าเฉลี่ย | 7.49 | 84.33 | 8.9 | 83.33 | 0.45 | 79 |
| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 90g 8 นาที | | | | | | |
| ครั้งที่ 1 | 7.5 | 92 | 9.2 | 85 | .60 | 85 |
| ครั้งที่ 2 | 8 | 82 | 9 | 86 | .75 | 82 |
| ครั้งที่ 3 | 8.2 | 75 | 9 | 96 | .70 | 84 |
| ค่าเฉลี่ย | 7.9 | 83 | 9.07 | 89 | 0.68 | 83.66 |

**ผลการทดลองในถั่วเขียวพันธุ์ มอ.1**

1. ค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้จากการใช้ความเร็วหมุนเหวี่ยง 90g. 8 นาที ดีกว่า 80g 8 นาที ในใบ, ลำต้น และราก เพราะเนื่องจากโปรโตพลาสของถั่วเขียวมีขนาดใหญ่
2. เปรียบเทียบจำนวนของโปรโตพลาสที่แยกได้จากส่วนของลำต้น แยกได้มากกว่าในใบ ส่วนในรากนั้นแยกได้ต่ำสุด ซึ่งในการใช้ความเร็วหมุนเหวี่ยง 90g 8 นาที ในน้ำหนักสด 1 กรัม ลำต้นแยกได้ $9.07x10^4$ ในใบแยกได้ $7.49x10^4$ ในรากแยกได้ $0.45x10^4$ และในการแยกโดยใช้ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 80g 8 นาที ในลำต้นแยกได้ $8.9x10^4$ ในใบแยกได้ $7.49x10^4$ ในรากแยกได้ $0.45x10^4$
3. เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตในใบและลำต้น และรากมีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน ทั้งสองของแรงปั่นแยกคือระหว่าง 79-89%

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ในถั่วเขียว (พันธุ์อู่ทอง 2) $x10^4$/น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยกด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 80g และ 90g เป็นเวลา 8 นาที

| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 80g 8 นาที | ใบ | | ลำต้น | | ปลายราก | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต |
| ครั้งที่ 1 | 7.8 | 90 | 7.2 | 82 | 0.41 | 83 |
| ครั้งที่ 2 | 7.2 | 85 | 4.9 | 81 | 0.39 | 72 |
| ครั้งที่ 3 | 7.1 | 92 | 3.2 | 77 | 0.29 | 82 |
| ค่าเฉลี่ย | 7.37 | 89 | 5.1 | 80 | 0.36 | 79 |
| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 90g 8 นาที | | | | | | |
| ครั้งที่ 1 | 8.3 | 83 | 7.8 | 91 | 0.46 | 85 |
| ครั้งที่ 2 | 8.9 | 87 | 4.1 | 93 | 0.38 | 78 |
| ครั้งที่ 3 | 9.2 | 85 | 5.8 | 80 | 0.27 | 83 |
| ค่าเฉลี่ย | 8.8 | 85 | 5.9 | 88 | 0.37 | 82 |

**ผลการทดลองในถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 2**

1. แรงหมุนเหวี่ยงจากการปั่นแยก 90g เป็นเวลา 8 นาที ให้ค่าเฉลี่ยดีกว่าใน 80g
2. ค่าเฉลี่ยของโปรโตพลาสที่แยกได้จากใบมีมากกว่าจากลำต้น และรากต่ำสุด ในความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 90g จากน้ำหนักสด 1 กรัม ในใบแยกได้ $8.8x10^4$ ในลำต้นแยกได้ $5.9x10^4$ และในรากแยกได้ $0.37x10^4$
3. เปอร์เซ็นความมีชีวิตจากจำนวนของโปรโตพลาสที่แยกได้ พบว่าในลำต้นสูงที่สุดคือ 88% (ความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 90g ) และต่ำสุดในราก คือ 79% (ความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 80g)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ในถั่วเหลือง (พันธุ์ ส.จ.2) $x10^4$/น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยกด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 80g และ 90g เป็นเวลา 8 นาที

| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 80g 8 นาที | ใบ | | ลำต้น | | ปลายราก | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต |
| ครั้งที่ 1 | 0.9 | 83 | 0.05 | 76 | 0.20 | 90 |
| ครั้งที่ 2 | 1.1 | 88 | 0.02 | 80 | 0.35 | 86 |
| ครั้งที่ 3 | 0.6 | 76 | 0.04 | 74 | 0.42 | 92 |
| ค่าเฉลี่ย | 0.87 | 82.33 | 0.037 | 76.67 | 0.33 | 89.33 |
| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 90g 8 นาที | | | | | | |
| ครั้งที่ 1 | 1.3 | 85 | 0.1 | 84 | 0.60 | 83 |
| ครั้งที่ 2 | 1.1 | 83 | 0.9 | 80 | 0.59 | 82 |
| ครั้งที่ 3 | 1.2 | 70 | 1.1 | 78 | 0.45 | 75 |
| ค่าเฉลี่ย | 1.2 | 79.33 | 0.7 | 80.67 | 0.55 | 80 |

**ผลการทดลองในถั่วเหลืองพันธุ์ ส.จ. 2**

1. ค่าเลี่ยของโปรโตพลาสที่แยกได้จากการใช้แรงหมุนเหวี่ยง 90g เป็นเวลา 8 นาที ให้ค่าเฉลี่ยที่สูงกว่าการใช้ความเร็วหมุนเหวี่ยง 80g เป็นเวลา 8 นาที ทั้งในใบ, ลำต้น และราก
2. โปรโตพลาสที่แยกได้จากใบสูงกว่าจากรากและลำต้น ในลำต้นแยกได้ต่ำสุดในความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 80g 8 นาที ในรากแยกได้ต่ำสุดในความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 90g 8 นาที
   - ในความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 80 g 8 นาที ให้น้ำหนักสด 1 กรัม ในใบแยกได้สูงสุดคือ $0.87x10^4$ ในลำต้นแยกได้ต่ำสุดคือ $0.037x10^4$
   - ในความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 90g 8 นาที ในใบแยกได้สูงสุดคือ 1.2x10 ส่วนในรากแยกได้ต่ำสุดคือ $0.55x10^4$
3. เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสจะให้ค่าเฉลี่ยที่สูงที่สุดในรากคือ 89.33% และต่ำที่สุดในลำต้นคือ 76.67% ในการหมุนเหวี่ยง 80g สำหรับในการหมุนเหวี่ยง 90g เปอร์เซ็นความมีชีวิตมีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 80%

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ในถั่วเหลือง (พันธุ์เชียงใหม่ 60) $x10^4$/น้ำหนักสด 1 กรัม โดยการปั่นแยกด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 80 และ 90g เป็นเวลา 8 นาที

| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 80g 8 นาที | ใบ | | ลำต้น | | ปลายราก | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต | จำนวนที่แยกได้ ($x10^4$/นน.สด 1 กรัม | %ความมีชีวิต |
| ครั้งที่ 1 | 0.07 | 88 | 0.01 | 91 | 0.03 | 86 |
| ครั้งที่ 2 | 0.09 | 83 | 0.10 | 85 | 0.15 | 89 |
| ครั้งที่ 3 | 0.12 | 90 | 0.04 | 88 | 0.12 | 84 |
| ค่าเฉลี่ย | 0.093 | 87 | 0.05 | 88 | 0.01 | 86.33 |
| ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 90g 8 นาที | | | | | | |
| ครั้งที่ 1 | 0.12 | 86 | 0.09 | 89 | 0.03 | 88 |
| ครั้งที่ 2 | 0.15 | 89 | 0.35 | 82 | 0.05 | 85 |
| ครั้งที่ 3 | 0.27 | 91 | 0.01 | 90 | 0.02 | 88 |
| ค่าเฉลี่ย | 0.18 | 88.67 | 0.15 | 87 | 0.033 | 87 |

**ผลการทดลองในถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60**

1. ค่าเฉลี่ยของโปรโตพลาสที่แยกได้เปรียบเทียบระหว่างการปั่นแยกโดยใช้ความเร็วหมุนเหวียง 80 และ 90g พบว่าการใช้ความเร็วหมุนเหวี่ยง 90g ให้ค่าเฉลี่ยที่สูงกว่า ในใบ ลำต้น และราก
2. ในใบพบว่าค่าเฉลี่ยของโปรโตพลาสที่ได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับในลำต้น และรากต่ำสุด
   - ในน้ำหนักสด 1 กรัม ความเร็วหมุนเหวี่ย 80g 8 นาที ค่าเฉลี่ยของโปรโตพลาสที่แยกได้จากใบสูงที่สุดคือ $0.93x10^4$ และจากรากต่ำที่สุดคือ $0.01x10^4$
   - ในความเร็วหมุนเหวี่ยง 90g 8 นาที ค่าเฉลี่ยที่ได้จากใบสูงสุดคือ $0.18x10^4$ และจากรากต่ำสุดคือ $0.033x10^4$
3. เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันทั้งหมดคือ ประมาณ 86-89 %
4. ผลการทดลองในลำต้นพบว่า มีค่าที่แตกต่างกันสูง ในแต่ละครั้งของการทดลอง

## วิจารณ์

1. การปั่นแยกด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 80 และ 90g เป็นเป็น 8 นาที พบว่า การปั่นแยกด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 90g ให้ผลดีกว่า เพราะเนื่องจากขนาดของโปรโตพลาสมีขนาดใหญ่ การปั่นแยกด้วยความเร็วสูงจะช่วยทำให้การตกตะกอนของโปรโตพลาสดีขึ้น
2. ในการทดลองในถั่วเหลืองจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้ มีค่าเฉลี่ยต่ำ ซึ่งการปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่มากกว่า 90g อาจจะให้ผลดีกว่า เพราะขนาดโปรโตพลาสของถั่วเหลืองมีขนาดใหญ่กว่า ถั่วเขียว พบว่าถั่วเขียวแยกออกมาได้จำนวนมาก
3. ในถั่วเหลืองพบว่า จำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าถั่วเขียว การใช้น้ำย่อย (enzyme) ชนิดนี้เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสจากถั่วเขียวมากกว่า
4. การแยกโปรโตพลาสจากส่วนของลำต้นและใบ จะแยกได้มากกว่าในรากในทุกการทดลอง ในถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง2 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่าการแยกจากส่วนของลำต้น จำนวนที่ได้ในแต่ละครั้งจะมีความแตกต่างกันสูง ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากตำแหน่งของลำต้นจะให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการทดลองในส่วนของลำต้นควรแยกการทดลองเป็นส่วนของ hypocotyl และ epicotyl
5. ในการทดลองรวมโปรโตพลาสระหว่างถั่วเขียว 2 พันธุ์ และถั่วเหลือง 2 พันธุ์ รวม 4 คู่การทดลองนั้น พบว่า มีจำนวนของโปรโตพลาสที่มาจับคู่กันน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากจำนวนโปรโตพลาสที่แยกได้จากถั่วเหลือง ยังมีจำนวนน้อยกว่า $10^6$ /มิลลิลิตร

จึงต้องมีการทดลองซ้ำใหม่ โดยใช้น้ำย่อยตัวอื่นในการแยกโปรโตพลาสจากถั่วเหลือง และการปั่นแยกต้องใช้แรงหมุนเหวี่ยงมากกวก่า 90g เพื่อให้ได้จำนวนของโปรโตพลาสมากขึ้น และทำซ้ำในถั่วเขียวให้ได้ออกมาในวันเดียวกัน เพื่อนำมารวมตัวกันทันที เพราะถ้าเลี้ยงไว้จะทำให้โปรโตพลาสสร้างผนังเซลขึ้นมาใหม่ ไม่สามารถชักนำให้เกิดการรวมตัวกันได้

## สรุปผลการทดลอง

<u>ส่วนการทดลองที่ 1</u> การแยกโปรโตพลาส

ในถั่วเขียวพบว่า การใช้น้ำย่อย (enzyme) 2.5% cellulase R-10 0.05% pectolyase y23, 1% drielase และความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 90g 8 นาที เป็นสภาพที่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี โดยเฉพาะในส่วนของใบและลำต้น ของถั่วเขียวพันธุ์ ม.อ.1 และอู่ทอง 2

ในถั่วเหลืองพันธุ์ ส.จ.2 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 การใช้น้ำย่อย (enzyme) 2.5% cellulase R-10, 0.05% pectolyase y23, 1% drielase และความเร็วของการหมุนเหวี่ยง 90g 8 นาที ยังไม่สามารถแยกโปรโตพลาสได้ดี

<u>ส่วนที่ 2</u> การรวมโปรโตพลาส

ในการรวมตัวของโปรโตพลาส ใน 4 คู่การทดลอง มีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ แต่จะต้องศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสจากถั่วเหลืองให้ได้จำนวนมากขึ้น โดยการทำการทดลองซ้ำใหม่ จึงต้องมีค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น และเนื่องจากการทดลองนี้ได้รับเงินในส่วนการทดลองส่วนที่ 1 เท่านั้น จึงต้องใช้งบประมาณจำกัด และเป็นอุปสรรคอันหนึ่ง ผลการทดลองที่ได้จึงเป็นข้อมูล และเป็นแนวทางให้เกิดความเป็นไปได้ในการรวมโปรโตพลาสครั้งต่อไป

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

## เอกสารอ้างอิง

1. ประสาทพร สมิตะมาน. 2529. โปรโตพลาส เทคนิคการเลี้ยงและการประยุกต์ใช้. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
2. Bigot.C.R. CHAUSSAT. 1980. la multiplication vegetative des plants superieurs. 277 pages.
3. Carlson, P.S.,H.H. Smith and R.D. Dearling. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2292-2294.
4. Carlson, P.S.,H.H. Smith and R.D. Dearling. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2292-2294.
5. Dermaly, Y.1977. Genetique et Amelioration des plants. Institut National de la Recherche Agronomique. 277 p.
6. Glimelius, K., T. Eriksson, R. Grafe and A.F. Muller. 1978. Somatic hybridization of Nitrate reductase deficient mutants of Nicotiana tabacum by protoplast fusion. Physiol. Plant. 44:273-277.
7. Haydu, Z.G. Lazer and D. Dudits, 1977, Increased of requency of polyethylene glycol induced protoplast fusion by dimethyl sulfoxide. Plant Sci. Lett. 10:357-360.
8. Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of Vicia hajastan a cells and protoplasts at a very low population.
9. Kao, K.N. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115:355-367.
10. Margara, J. 1982. Bascs de la Multiplication vegetative. Institut national de la Recherche Agronomique. 262 pages.

file vigan.doc