การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า

Isolation and Culture of *Aranda* Protoplasts

พัฐวดี ทองสีด่า

Patwadee Tongseedam

QK496.064 W63 1532 ฉบ.2
เลขทะเบียน 032744
5 ก.ค. 2536

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2536

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า

ผู้เขียน นางสาวพัฐวดี ทองสีดำ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ จิตรภักดี)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ จิตรภักดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า
ผู้เขียน นางสาวพัฐวดี ทองสีดำ
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2535

บทคัดย่อ

ตากล้วยไม้อะแรนด้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW (Vacin and Went,1949) สามารถพัฒนาเป็นรูปโดมหลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน และเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้เมื่อฉีกใบที่หุ้มตาพร้อมทั้งตัดยอดออก แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1-2 เดือน โปรโตคอร์มดังกล่าวพัฒนาเป็นต้นกล้วยไม้ได้ภายใน 2-3 เดือน หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW อีกครั้ง

นำใบอ่อนกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาแยกโปรโตพลาสต์ ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์และเมสอย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4 โดยใช้ใบกล้วยไม้น้ำหนักสด 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย $3.6x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ได้ศึกษาจำนวนเริ่มต้น, วิธีการเลี้ยงและชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร NT (Nagata and Takebe,1970) ที่มี 2,4-D (2,4-dichloro phenoxyacetic acid) กับ BA (N^6-benzyladenine) อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอล 0.4 โมลาร์ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปไม่พบการแบ่งเซลล์

Thesis Title Isolation and Culture of *Aranda* Protoplasts.

Author Miss Patwadee Tongseedam

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1992

Abstract

A dome-shaped *Aranda* bud was obtained when cultured on VW (Vacin and Went,1949) agar medium for 1 month. After removing the leaves and the apex from the bulging bud and transferring it to liquid culture medium, protocorm-like bodies were developed within 1-2 months. When these protocorm-like bodies were transferred onto the same agar medium, complete plantlets occurred within 2-3 months.

Protoplasts were isolated from the young leaves of cultured *Aranda* plantlets. One gram fresh weight of the young leaves was digested with 10 ml of enzyme solution containing 2 % (w/v) Cellulase "ONOZUKA R-10", 0.7 M sorbitol,10mM $CaCl_2.2H_2O$, 10mM MES (2 [N-Morpholinolethanesulfonic acid) and the final pH was adjusted to 4. The mixture of leaves and enzyme solution was incubated at 30° C for 7 hours on a gyrotary shaker with an agitation speed of 40 rpm. The average yield of isolated protoplasts was $3.6x10^5$ protoplasts/ml. The protoplast culture was investigated according to the different types of initial densities, culture techniques,and types of media. The best result found was $1x10^5$ initial protoplasts/ml cultured in liquid

or semisolid NT (Nagata and Takebe,1970) medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid),1 mg/l BA (N^6-benzyladenine) and 0.4 M sorbitol under dark condition. After 3 days in culture, wall formation was clearly visible as monitored by the fluorescent brightener (Calcoflour White); however, cell division and further growth of protoplasts were not evident.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีก็ด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อคิดอันเป็นประโยชน์ ช่วยในการจัดหาเอกสารประกอบการวิจัยเป็นจำนวนมาก อีกทั้งช่วยในการแก้ปัญหาตลอดจนอุปสรรคต่างๆอย่างใกล้ชิดและเอาใจใส่ตลอดเวลา ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ จิตรภักดี กรรมการที่ปรึกษาและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำและตรวจแก้ข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ขอขอบคุณคุณดาวนภา ม่วงศรี ที่ให้กำลังใจในการศึกษา ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการวิจัย

พัฐวดี ทองสีดำ

สารบาญ

	หน้า
รายการตาราง	ฉ
รายการรูป	ช
บทนำ	1
การสำรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	26
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	27
ผลการทดลอง	38
บทวิจารณ์	63
บทสรุป	78
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	91

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์กล้วยไม้	20
2	จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ที่ระดับออสโม-ลาริตี้ 0.5,0.7 และ 0.9 โมลาร์ ของสารละลายซอร์บิทอล	42
3	จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ที่สภาวะการอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส	49
4	จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ที่สภาวะการอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที และไม่มีการเขย่า	49
5	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ช่วงพีเอชต่างๆ ของเอนไซม์เซลลูเลสและไดรซีเลส เข้มข้นอย่างละ 2 เปอร์เซ็นต์	51
6	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 5,7, 9 และ 11 ชั่วโมง	52
7	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแหล่งโปรโตพลาสต์ต่างๆ คือ ราก ใบและโปรโตคอร์ม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง	54
8	จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่แยกได้จากใบที่มีขนาดต่างกัน ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง	54

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของลำต้นกล้วยไม้ที่มีรูปทรงแบบโมโนโพเดียม	5
2	ลักษณะของลำต้นกล้วยไม้ที่มีรูปทรงแบบซิมโพเดียม	6
3	ส่วนต่างๆของดอกกล้วยไม้	9
4	ตากล้วยไม้อะแรนด้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 1 เดือน พัฒนาเป็นรูปโคม	39
5	โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว	39
6	โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นกล้วยไม้	40
7	ต้นกล้วยไม้ที่โตสมบูรณ์ สำหรับใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์	40
8	เซลล์ใบกล้วยไม้เกิดพลาสโมไลซีส (x165)	43
9	โปรโตพลาสต์ที่หดในสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ (x165)	43
10	โปรโตพลาสต์ในสารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ มีลักษณะกลมและขนาดต่างๆกัน (x125)	44
11	โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์กระจายเต็มเซลล์ (x165)	46
12	โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์รวมตัวกันเป็นกลุ่มอยู่กลางเซลล์ (x165)	46
13	โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ (x165)	47
14	โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์อยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (x165)	47
15	โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีคลอโรพลาสต์ (x125)	48
16	เซลล์ที่สะสมผลึกรูปเข็มอยู่ภายใน (x165)	48
17	โปรโตพลาสต์ที่ย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ เห็นการเรืองแสงสีเหลืองเขียว ซึ่งเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (x125)	56

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
18	โปรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (x165)	61
19	โปรโตพลาสต์ในรูปที่ 18 เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอร์ไวท์แล้วดูด้วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ เห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงแหวนรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (x165)	61

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในป่าแถบร้อนชื้น แหล่งกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่ง คือลาตินอเมริกากับเอเชียแปซิฟิก ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีกล้วยไม้อยู่ในป่าธรรมชาติไม่ต่ำกว่า 1,000 ชนิดทั้งประเภทที่พบอยู่บนต้นไม้ บนพื้นผิวของภูเขาและบนพื้นดิน (มาลินี อนุพันธ์สกุล, ม.ป.ป.) การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ในประเทศไทยระยะแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อความสวยงาม และเป็นงานอดิเรก การขยายพันธุ์และการขยายพื้นที่ปลูกค่อนข้างช้า เนื่องจากขาดความรู้ในการปลูกเลี้ยง แต่ต่อมากล้วยไม้สามารถทำรายได้ให้แก่ผู้ปลูกเลี้ยงมาก เพราะเป็นที่นิยมของตลาดต่างประเทศ ประกอบกับได้มีการพัฒนาเทคนิคในการขยายพันธุ์ให้สามารถเติบโตได้รวดเร็วและใช้เวลาน้อยในการปลูกเลี้ยง เพื่อให้ได้ช่อดอกจำนวนมากพอในเชิงพาณิชย์ การส่งออกจึงมีปริมาณและมูลค่าสูงมีการขยายพื้นที่ปลูกออกไปอย่างรวดเร็ว แหล่งที่ปลูกกล้วยไม้มากได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสาคร และเชียงใหม่ กล้วยไม้ที่ตลาดต่างประเทศต้องการนั้นต้องมีสีสวยสด ฟอร์มดอกดีและบานทนไม่น้อยกว่า 15 วัน รูปแบบที่ส่งออกมี 3 ลักษณะได้แก่ ช่อเดี่ยว ไม้กำและดอกเดี่ยว สีที่ต้องการคือ สีชมพู เหลือง ม่วงแดง ขาวและขาวปากแดง ก้านและดอกไม่ห่างกันมากนัก (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2531)

กล้วยไม้นับว่าเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ทั้งชนิดที่เป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก ประเทศไทยส่งกล้วยไม้ตัดดอกเป็นสินค้าออกที่ทำรายได้ให้ประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท ตลาดที่สำคัญได้แก่ เยอรมัน เนเธอร์-แลนด์ สวิตเซอร์แลนด์ และอิตาลี

เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาดและการขยายการแข่งขันในตลาดต่างประเทศของกล้วยไม้ตัดดอก การเพิ่มจำนวนพันธุ์อย่างรวดเร็วและการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้จึงเป็นสิ่งจำเป็น การขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่ต้องการโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นวิธีการที่ได้ผลพอเพียง และทำสำเร็จกันมานานแล้ว (Teo and Neumann, 1978) แต่การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เทคนิคใหม่ ๆ

ยังมีการศึกษากันน้อย ในสภาพธรรมชาติการสร้างกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ ๆ ที่รวมลักษณะดีต่าง ๆ เอาไว้นั้น ใช้วิธีผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual hybridization) แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดคือ สามารถผสมได้ระหว่างสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันหรือระหว่างสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันเท่านั้น นอกจากนี้ในการผสมพันธุ์กันระยะพร้อมที่จะผสม (receptive) ของเรณูกับเซลล์ไข่ต้องมีความสัมพันธ์กันด้วย สิ่งกีดขวางทางสปีชีส์ (species barriers) เหล่านี้จึงเป็นตัวจำกัดในการนำวิธีผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Evans and Bravo, 1983) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็เป็นวิธีที่ดีอีกวิธีหนึ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชหรือการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ๆ การสร้างพืชลูกผสมพันธุ์ใหม่ๆโดยอาศัยโปรโตพลาสต์นั้น ทำได้โดยใช้เทคนิคการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ซึ่งสามารถนำเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลมารวมกันเกิด somatic cell hybridization ได้ลูกผสม (somatic hybrids) ขึ้นมา เมื่อชักนำลูกผสมนี้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ขึ้นมาก็จะได้พืชพันธุ์ใหม่ (Bajaj, 1977) วิธีนี้เป็นการกำจัดปัญหาเรื่องสิ่งกีดขวางทางสปีชีส์ได้ดี

สำหรับการสร้างกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ ๆ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทำได้โดยใช้โปรโตพลาสต์จากต้นกล้วยไม้ที่มีลักษณะดีเด่นตามต้องการเช่น ดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกหนา ฟอร์มดอกดี สีสวย ของแต่ละสายพันธุ์มารวมกัน จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่รวมตัวกันแล้วไปเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ และมีการแบ่งตัวกลายเป็นแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (Evans and Bravo, 1983) การรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์นั้นอาจใช้สารเคมีคือ PEG (polyethylene glycol) (Kao and Michayluk, 1974) หรือใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวขึ้น (Veinken, *et al.*, 1981)

ข้อดีอีกประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือสามารถขยายพันธุ์พืชได้จากการนำชิ้นส่วนเล็กๆของพืชมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ แล้วทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้มีการเจริญเป็นต้นต่อไป โดยที่พืชต้นเดิมยังคงมีชีวิตอยู่ วิธีนี้เหมาะมากสำหรับการขยายพันธุ์พืชที่มีจำนวนน้อย เช่นกล้วยไม้ป่าที่

หายากหรือพืชที่เกือบจะสูญพันธุ์แล้ว

นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาประยุกต์ใช้กับโปรโตพลาสต์ได้อีกด้วย เช่นการตัดต่อยีน การนำยีนที่ต้องการ (desired gene) ใส่เข้าไปในโปรโตพลาสต์โดยวิธีต่าง ๆ เช่น microinjection แล้วนำโปรโตพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงต่อไปเมื่อได้ต้นใหม่ขึ้นมา ต้นที่ได้ (transformed plant) ก็จะแสดงลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม

ดังนั้นการศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้จะเป็นก้าวแรกของการนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ต่อไป

การทดลองครั้งนี้ได้เลือกเอาต้นกล้วยไม้อะแรนด้าเป็นพืชตัวอย่างในการศึกษาเนื่องจากอะแรนด้าเป็นพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมระหว่างอะแรคนิส (*Arachnis*) กับแวนด้า (*Vanda*) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศที่ปลูกเลี้ยงอะแรนด้ากันมากได้แก่ สิงคโปร์ มาเลย์เซียและไทย จึงนับว่าเป็นกล้วยไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญ

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ออคิเดซีอี้ (Orchidaceae) มีขอบเขตคลุมพืชไว้หลายร้อยสกุล จึงเกิดความแตกต่างภายในวงศ์อย่างกว้างขวาง พืชทั่วไปในวงศ์นี้มีลักษณะต้นที่เป็นข้อ (node) บริเวณเหนือข้อและติดอยู่กับข้อจะมีตา ซึ่งตานี้อาจเจริญเป็นหน่ออ่อน กิ่งอ่อนหรือช่อดอก หรือส่วนที่เป็นข้อนี้อาจจะมีใบและกาบใบ ระหว่างข้อแต่ละข้อเรียกว่าปล้อง (internode) ส่วนของใบมีเส้นใบขนานกันตามความยาวของใบ

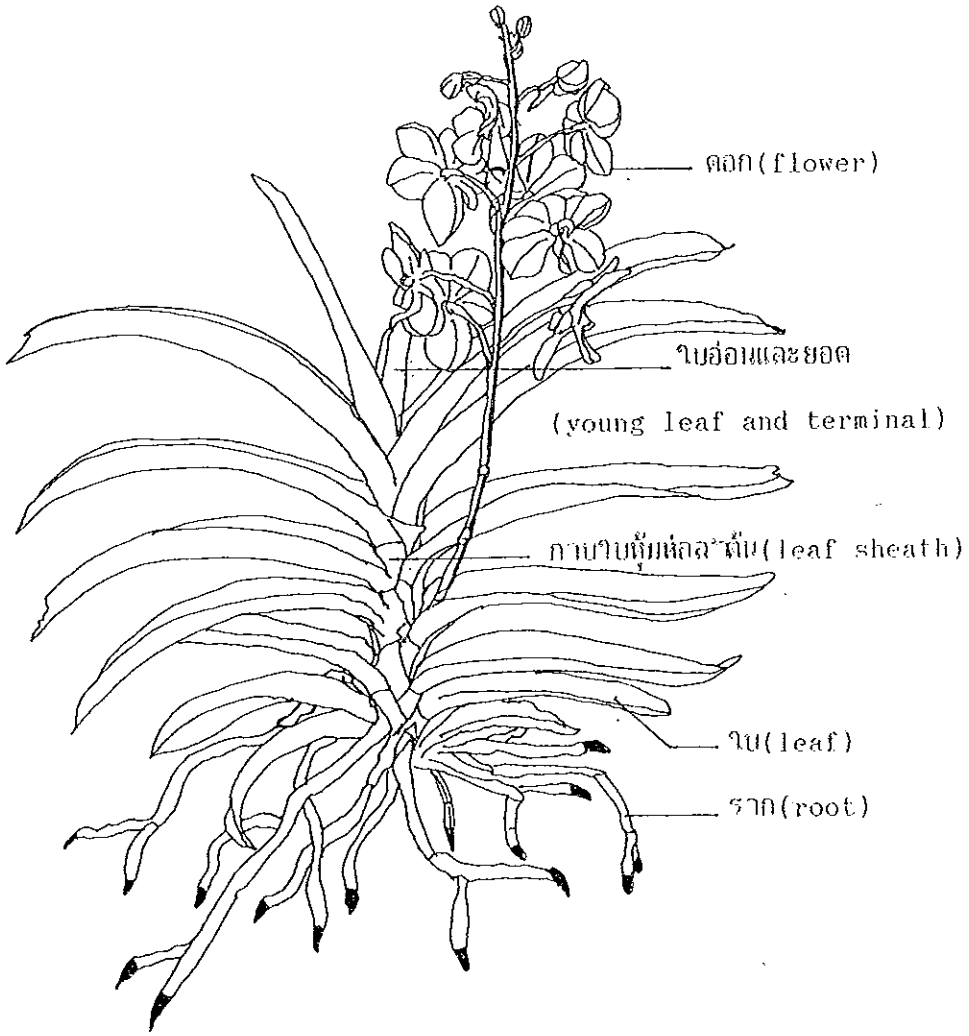
ลำต้นและราก

เนื่องด้วยเป็นพืชวงศ์ใหญ่ เป็นผลให้ลักษณะของกล้วยไม้มีความแตกต่างเห็นได้ชัด โดยทั่วไปแล้วลำต้นของกล้วยไม้ไม่มีแก่นไม้ จึงพบว่าเนื้อในของลำต้นเสมอกันไม่มีการแบ่งออกเป็นเนื้อไม้และส่วนเปลือกไม้ในการแบ่งแยกลำต้นของกล้วยไม้แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. ลำต้นกล้วยไม้ที่มีลักษณะเป็นลำต้นปกติหรือโมโนโพเดี้ยม (monopodium) ลำต้นกล้วยไม้ประเภทนี้สังเกตเห็นได้จากต้นกล้วยไม้สกุลแวนด้า มีลำต้นปกติเป็นข้อและปล้องเช่นเดียวกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป ส่วนที่อยู่เหนือข้อเป็นส่วนที่เกิดตาซึ่งอาจแตกเป็นหน่ออ่อน กิ่งอ่อน หรือช่อดอกก็ได้ (รูปที่ 1)

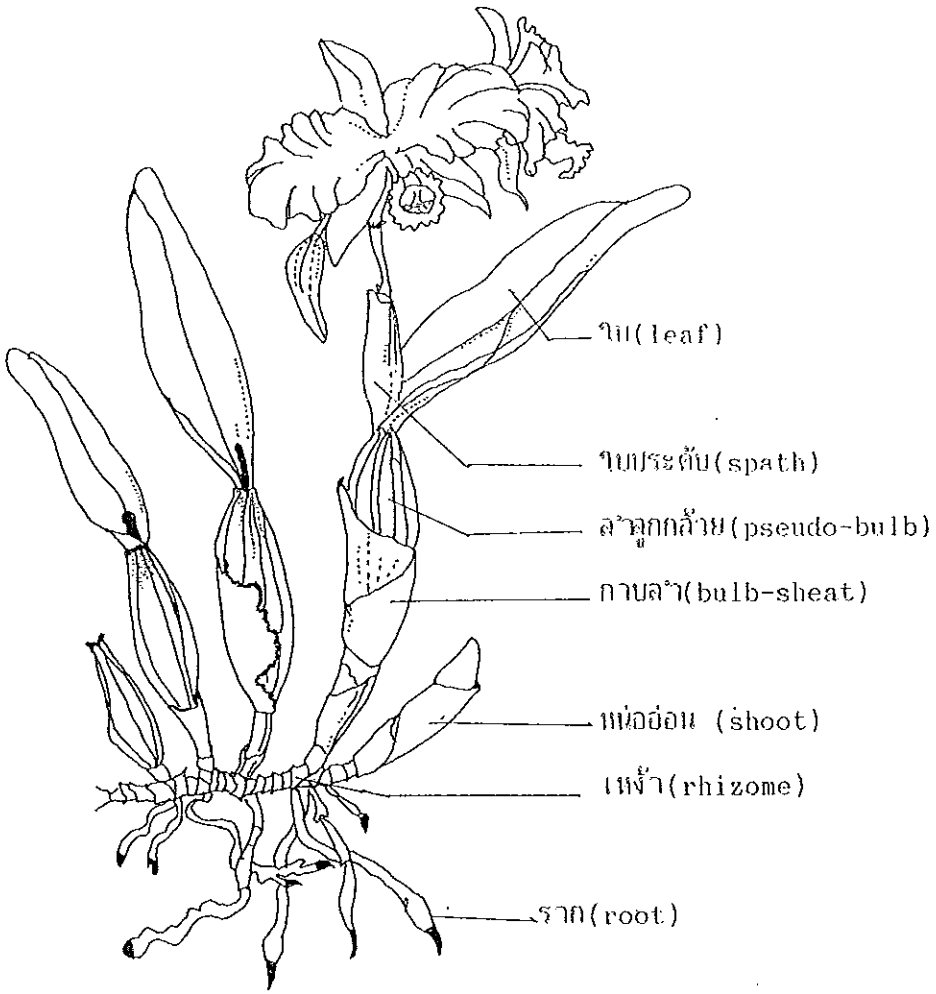
2. ลำต้นกล้วยไม้ประเภทที่ไม่มีลักษณะเป็นลำต้นปกติ หรือซิมโพเดี้ยม (sympodium) เป็นกล้วยไม้ที่ลำต้นเปลี่ยนสภาพผิดเพี้ยนไปจากลำต้นปกติ แต่ทำหน้าที่แบบลำต้น มีตาที่สามารถแตกหน่อและแทงช่อดอกออกมาจากส่วนนี้ได้ ดังเช่นกล้วยไม้ในสกุลคัทลียา, สกุลเด็นโดรเบี้ยม (สกุลหวาย), สกุลเอพิเด็นดรั้ม, สกุลซิมบิเดี้ยม (รูปที่ 2)

ส่วนลำต้นที่แท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้คือ ส่วนที่อยู่ราบกับพื้นหรือเครื่องปลูกซึ่งมีข้อและปล้องเรียกว่าเหง้า (rhizome) เจริญไปตามแนวนอน และส่วนที่ชูใบขึ้นจากเหง้าเป็นเพียงส่วนที่ทำหน้าที่คล้ายก้านใบมีชื่อเรียกเฉพาะว่าลำลูกกล้วย (pseudo-bulb) ซึ่งมีข้อ ปล้อง และตา ลำลูกกล้วยออกดอก



รูปที่ 1 ลักษณะลำต้นกล้วยไม้ที่มีรูปทรงแบบโมโนโพเดียม

(ระพี สาคริก, 2530)



รูปที่ 2 ลักษณะลำต้นกล้วยไม้ที่มีรูปทรงแบบซิมโพเดียม

(ระพี สาคริก, 2530)

แล้วจะไม่เจริญเติบโตต่อไปอีก จึงไม่เป็นลำต้นที่แท้จริงเพราะไม่มีการแตกยอดใหม่

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีระบบรากแบบรากฝอย ไม่มีรากแก้วเช่นเดียวกับขิง ข่า และอ้อยเป็นต้น ยังมีกล้วยไม้อีกหลายชนิดที่มีระบบรากเป็นรากอากาศหรือยึดเกาะอยู่ตามคาคบไม้ก็ได้

ใบกล้วยไม้

ความแตกต่างของใบกล้วยไม้ก็เช่นเดียวกับความแตกต่างของลำต้น ทั้งนี้เพราะเป็นพืชสกุลใหญ่นั่นเอง กล้วยไม้บางชนิดมีใบเป็นรูปทรงกระบอกเช่น แวนด้าใบกลม หรือบางชนิดมีลักษณะแบน ยาว และมีหน้าตัดเป็นรูปตัววี (V) เช่น แวนด้าใบแบน กล้วยไม้บางชนิดมีใบหนาเก็บน้ำและอาหารไว้ในใบได้ดี สภาพผิวใบที่กร้านแข็งแสดงถึงความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม บางชนิดใบลดขนาดเล็กลงเป็นเพียงเกล็ดหรือกาบหุ้มลำต้น การเรียงตัวของใบสลับกัน หรือทับเวียนกัน สีของใบส่วนมากเป็นสีเขียวสด แต่บางชนิดอาจเป็นสีม่วงคล้ำ หรือมีลวดลาย

ช่อดอก

ช่อดอกของกล้วยไม้ คือส่วนที่เป็นที่ตั้งของดอก มีลักษณะแตกต่างกันไปแล้วแต่สกุลและชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดมีดอกเดียว บางชนิดเป็นช่อเดี่ยวหรือแตกแขนงแยกกิ่งออกไป ตั้งตรง โค้งหรือห้อยลงมา กล้วยไม้บางชนิดมีก้านช่อสั้นมากและบางชนิดก้านช่อยาว เช่นหวายลูกผสมปอมปาดัวร์มีก้านช่อดอกยาว ช่อดอกอาจออกตามปลายลำต้น ตามซอกใบ ตามปลายยอดที่ผลิขึ้นมาใหม่ ตามกิ่งแก่ ๆ ที่ทิ้งใบแล้ว หรือตามเหง้า แล้วแต่ชนิดของกล้วยไม้ เช่นกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดี้ยมนั้น ปรากฏว่าช่อดอกเกิดจากตาซึ่งอยู่เหนือข้อของลำต้น หากลำต้นมีกาบใบหุ้มช่อดอกก็จะเจริญและแทงผ่านใบออกมา สำหรับกล้วยไม้ประเภทซิมโพเดี้ยมช่อดอกอาจจะเกิดจากตาซึ่งอยู่ในส่วนต่าง ๆ ได้หลายส่วน เช่นส่งช่อดอกออกมาจากข้อซึ่งอยู่ที่ปลายลำลูกกล้วย หรือตามข้อถัดลงมาทางส่วนโคนของลำลูกกล้วยก็ได้

ดอก

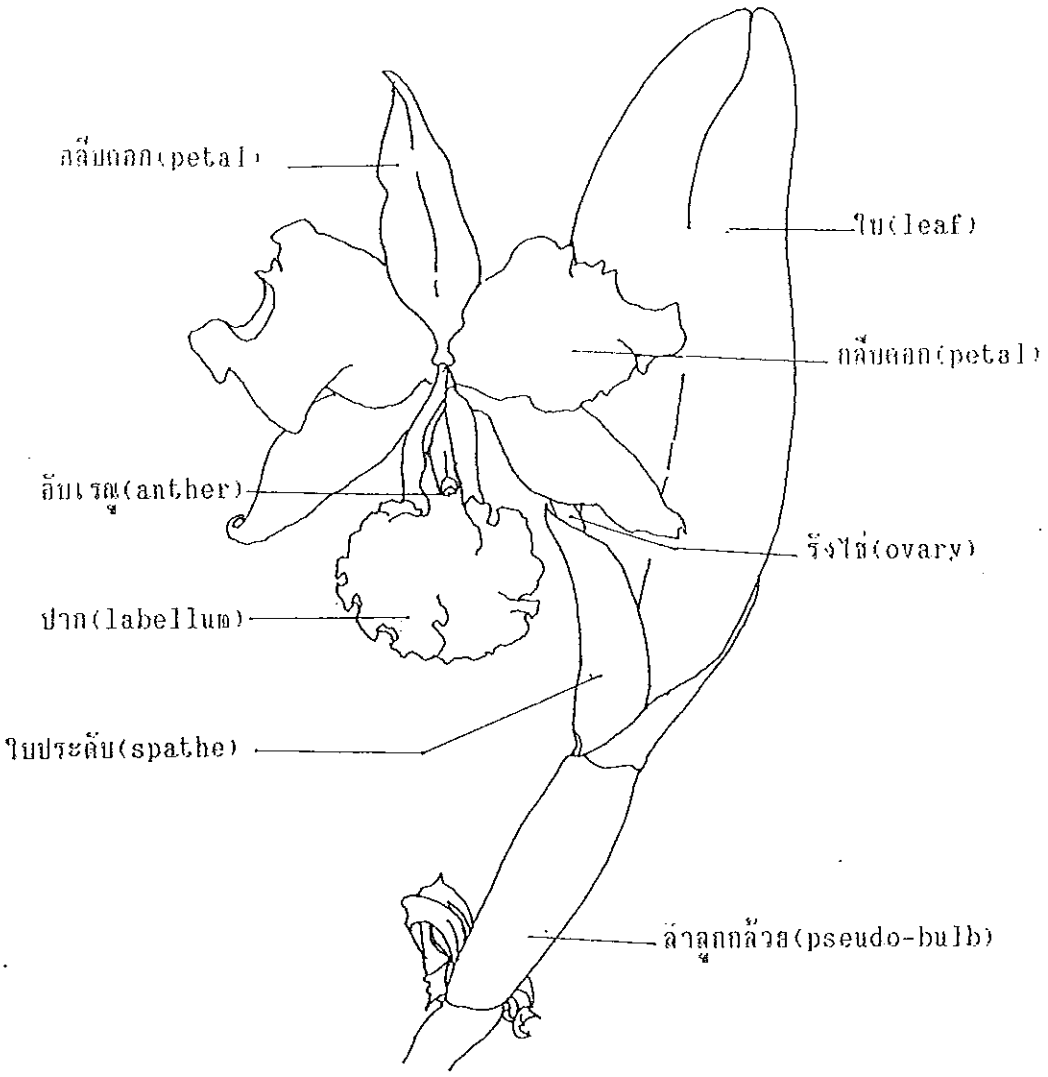
ดอกกล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphroditic flower or bisexual flower) คือเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ลักษณะของกลีบดอกจะอยู่ด้านบนของรังไข่ซึ่งดอกไม้ประเภทนี้มีชื่อเรียกว่า เอพิจีนัส (epigenous flower) ดอกกล้วยไม้มีส่วนประกอบดังนี้คือ (รูปที่ 3)

1.กลีบรองดอก คือกลีบชั้นนอกเป็นส่วนที่ห่อหุ้มป้องกันส่วนต่าง ๆ ในขณะที่มีสภาพเป็นตาดอกอยู่ มักมีลักษณะและสีสรรคล้ายใบ

2.กลีบดอก กล้วยไม้มีกลีบดอก 6 กลีบแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ชั้นนอก 3 กลีบ ชั้นใน 3 กลีบ กลีบชั้นนอกอยู่ข้างบนหนึ่งกลีบ ข้างๆหรือข้างล่าง 2 กลีบ กลีบคู่ล่างนี้จะมีลักษณะและสีสรรเหมือนกันทุกประการ แต่กลีบบนอาจแตกต่างกันออกไป ส่วนกลีบชั้นใน 3 กลีบนั้น กลีบหนึ่งอยู่ข้างล่าง อีก 2 กลีบอยู่ข้างบนกลีบคู่นี้จะมีขนาด รูปทรง สีสรรเหมือนกันทุกประการ ส่วนกลีบล่างจะเปลี่ยนไปโดยมีขนาดเล็กลง หรือโตขึ้น และมีสีสรรผิดแผกไปจากกลีบคู่บน กลีบล่างนี้จึงมีชื่อเรียกเฉพาะว่า ปากหรือกระเป๋า (lip)

3.เกสร มีลักษณะเฉพาะไม่เหมือนดอกไม้อื่น คือส่วนของก้านชูยอดเกสรตัวเมียกับก้านชูอับเรณูร่วมเป็นอวัยวะเดียวกัน ยอดเกสรตัวเมียกับยอดเกสรตัวผู้ที่อยู่ติดกันรวมเรียกส่วนทั้งหมดนี้ว่าเส้าเกสร (column) ซึ่งจะยื่นออกมาจากจุดเดียวกันที่โคนของกลีบดอก ที่ปลายสุดของเส้าเกสรเป็นที่อยู่ของเรณู ซึ่งเป็นเม็ดขนาดเล็กมากมีฝาครอบปิดมิดชิด เรณูของกล้วยไม้มักเกาะกันเป็นก้อนเหนียว ๆ หรือบางที่เกาะกันเป็นก้อนแข็งเรียกว่าก้อนเรณู ถัดจากปลายสุดลงมาเป็นแอ่งกลม ๆ เล็ก ๆ มีน้ำเหนียวๆอยู่เต็มแอ่ง ส่วนนี้คือแอ่งยอดเกสรตัวเมีย การผสมพันธุ์กล้วยไม้ เริ่มแรกก้อนเรณูจะต้องเข้าไปอยู่ในแอ่งและน้ำเหนียวๆ นี้จะทำหน้าที่กระตุ้นให้เม็ดเรณูงอกเข้าไปผสมพันธุ์กับไข่ในรังไข่ต่อไป

4.รังไข่ อยู่ตรงบริเวณก้านดอกที่อยู่ชิดกับโคนกลีบดอก ภายในรังไข่จะมีไข่อ่อนเป็นเม็ดเล็กๆเกาะติดอยู่มากมาย ไข่อ่อนเหล่านี้เมื่อได้รับการผสมจะมีการเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตกลายเป็นเมล็ดใช้สำหรับสืบพันธุ์ต่อไป



รูปที่ 3 ส่วนต่างๆของดอกกล้วยไม้ (Kramer,1989)

ฝักกล้วยไม้

ฝักกล้วยไม้หรือผล ซึ่งภายในมีเมล็ดที่เกิดจากการผสมกันของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย อายุของฝักกล้วยไม้ตั้งแต่เกิดการผสมแล้วไปจนถึงฝักแก่แตกต่างกัน แล้วแต่ชนิดของกล้วยไม้ร่วมกับสภาพสิ่งแวดล้อมและความสมบูรณ์ขององค์ประกอบในการเจริญงอกงามด้วย กล้วยไม้บางชนิดฝักอาจจะแก่ได้ภายในระยะเวลาเพียงเดือนเศษๆ แต่กล้วยไม้บางชนิดมีฝักติดอยู่กับต้นถึงปีครึ่งจึงจะแก่ ฝักกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดี้ยมมักจะติดอยู่กับก้านในลักษณะตั้งเอาปลายชี้ขึ้น แต่ฝักกล้วยประเภทซิมโพเดี้ยมมักจะห้อยปลายลงเป็นส่วนมาก เช่นฝักกล้วยไม้สกุลเด็นโดรเบี้ยม หากฝักสมบูรณ์ดีมีเมล็ดเต็มที่ แต่ละฝักอาจอาจจะให้เมล็ดเป็นจำนวนมาก (10,000-100,000 เมล็ด) ด้วยเหตุที่เมล็ดกล้วยไม้มีเป็นจำนวนมากนี้เองเมล็ดจึงมีลักษณะเป็นผงละเอียด เมื่อฝักแก่แล้วแตกออก เมล็ดสามารถปลิวกระจายไปตามลมได้ง่าย (มาลินี อนุพันธ์สกุล,ม.ป.ป.;ระพี สาคริก,2530; อดุลย์ พงศ์สุวรรณ,ม.ป.ป.)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มี 3 ระยะที่สำคัญคือการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชให้เกิดโปรโตคอร์ม การเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มและการแปรโปรโตคอร์มเป็นต้นพืช ปกติชิ้นส่วนของกล้วยไม้ที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจะเกิดโปรโตคอร์มในระยะหนึ่ง ส่วนการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มให้ย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลว เมื่อต้องการแปรโปรโตคอร์มเป็นต้นพืชย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งอีกครั้งหนึ่ง (Teo,1980)

ผู้ที่ทดลองขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นคนแรก คือ Rotor ในปี 1949 (Goh,1990) เพาะเลี้ยงตาจากช่อดอกของฟาแลนด์น๊อฟชิส จนเป็นต้นพืชได้สำเร็จในหลอดทดลอง

Morel (1960) สามารถผลิตต้นกล้วยไม้ที่ปลอดไวรัสได้สำเร็จโดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดซิมบิเดี้ยม บนอาหารแข็งสูตร Knudson III (C) หรือ KC เขาสังเกตพบว่าปลายยอดที่นำไปเพาะเลี้ยงตอนแรกไม่มีสี หลัง

จากเพาะเลี้ยงจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเขียว และขยายขนาดโตขึ้นอย่างช้า ๆ จนมีลักษณะคล้ายกับโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ด เขาเรียกชิ้นส่วนนี้ว่า ส่วนที่มีลักษณะคล้ายโปรโตคอร์ม (protocorm-like body) หรือโปรโตคอร์ม ซึ่งแต่ละโปรโตคอร์มสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ ต่อมาในปี 1964 เขาพบว่า โปรโตคอร์มที่เกิดขึ้น เมื่อนำไปตัดเป็นชิ้นส่วนเล็กๆแล้วย้ายเลี้ยงต่อไปเรื่อย ๆ จะเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้อีก นำโปรโตคอร์มที่ได้ไปชักนำให้เกิดต้น โดยวิธีนี้จะได้ต้นกล้วยไม้จำนวน 4 ล้านต้นในเวลา 1 ปี จากการเพาะเลี้ยงตาเพียง 1 ตา

จากการค้นพบของ Morel นี้เอง ทำให้ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ หันมาสนใจการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากยิ่งขึ้น โดยทดลองกับกล้วยไม้หลายสกุลดังนี้

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1970) เพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างของกล้วยไม้สกุลช้างกระ (*Rhyncostylis gigantea*) ในอาหารที่มีธาตุต่าง ๆ ที่สมบูรณ์ (enriched media) พบว่าตาพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในเวลา 3-4 เดือน

Tse,และคณะ (1970)เพาะเลี้ยงข้อที่มีตาติดอยู่ของฟาแลนด์น็อฟซิส บนอาหารแข็งสูตร MS และ KC ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเฉากรีดข้อที่มีตาติดอยู่ให้เกิดบาดแผลเสียก่อนนำไปเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับตาที่ไม่มีบาดแผลพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ ตาที่ไม่มีบาดแผลจะเจริญเป็นยอด ส่วนตาที่มีบาดแผลจะเกิดแคลลัส 6 สัปดาห์ต่อมาเกิดยอดรวมขึ้นมากมายจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ยอดรวมที่เกิดขึ้นพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในเวลา 10 สัปดาห์เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร KC จากการทดลองดังกล่าวพบว่าการเพาะเลี้ยงตากล้วยไม้ที่ไม่มีบาดแผลจะได้ต้นกล้วยไม้ 1 ต้นจากตา 1 ตา แต่การทำให้ตาเกิดบาดแผลก่อนนำไปเพาะเลี้ยงสามารถเกิดต้นกล้วยไม้ได้หลายต้นโดยผ่านแคลลัส

Kunisaki และคณะ (1972)เพาะเลี้ยงตายอดของแวนด้าใบกลมบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวและน้ำตาล หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2

เดือน ตาขยายขนาดโตขึ้นเป็นรูปครึ่งวงกลมมีใบเลี้ยงหุ้มอยู่ ฉีกใบเลี้ยงออกแล้วย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลวสูตรเดิม ตาจะพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มจำนวนมากมาย ย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มเหล่านี้บนอาหารแข็งที่มีน้ำตาลซูโครสจะพัฒนาเป็นต้นได้ จากการทดลองเชาพบว่าน้ำมะพร้าวที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีส่วนสำคัญในการส่งเสริมให้ตาพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ดี ส่วนน้ำตาลจะยับยั้งการสร้างคลอโรฟีลล์ของโปรโตคอร์ม ทำให้เนื้อเยื่อมีสีเหลือง แต่ช่วยให้โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นพืชได้ดีขึ้น

Teo และคณะ(1973) เพาะเลี้ยงตาของแวนด้าใบแบน ในอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าวและน้ำตาลเช่นกัน หลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน การเจริญของตามี 2 รูปแบบคือ ตาที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลร่วมกันน้ำมะพร้าวจะเกิดโปรโตคอร์มจำนวนมากแต่ไม่มีการพัฒนาเป็นต้นพืช ส่วนตาที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวอย่างเดียว จะเกิดยอดจำนวนมากมายแต่ไม่มีรากย้ายเลี้ยงยอดเหล่านี้บนอาหารที่มีน้ำตาลอย่างเดียวจะเกิดรากได้ต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์

Teo และ Wong (1978) ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่นซูโครส กลูโคส ฟรุคโตสและแมนนิทอล ต่อการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุล *Holttumara* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างอะแรนด้ากับเรแนนเธอร่า บนอาหารแข็งสูตร KC ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว เชาพบว่าชนิดของน้ำตาลให้ผลการเจริญของโปรโตคอร์มไม่แตกต่างกันคือเนื้อเยื่อของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลร่วมกับน้ำมะพร้าวจะมีสีเหลืองเขียวถึงเหลือง ขณะที่เนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวอย่างเดียวจะมีสีเขียว

Goh (1978) เพาะเลี้ยงตายอดของอะแรนด้าบนอาหารแข็งสูตร VW ที่มีน้ำตาลซูโครสและน้ำมะพร้าว พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 6-8 สัปดาห์ ตาจิงขยายขนาดโตขึ้นเป็นรูปครึ่งทรงกลม ประมาณ 3 เดือนเกิดโปรโตคอร์มจำนวนมากมาย และมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มลงอาหารเหลวพัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยเกิดใบก่อนและรากตามมาทีหลัง ส่วนการเพาะเลี้ยง

ตาข้างนั้นตาขยายขนาดโตขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยง 2-4 สัปดาห์ อีก 2-3 เดือน ต่อมาเกิดโปรโตคอร์มที่ด้านล่างของตาก่อน โปรโตคอร์มบางส่วนพัฒนาเป็นต้นพืชได้

Kerbauy (1984) เพาะเลี้ยงปลายรากของออนซิเดี้ยม ในอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารต่าง ๆ เช่น เปปโตน ไธอะมีน น้ำมะพร้าวและสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น NAA, BA พบว่าอาหารที่เติม NAA เปปโตน และไธอะมีน ส่งเสริมการเกิดแคลลัส ส่วนอาหารที่เติม BA ยับยั้งการเกิดแคลลัส แต่จะส่งเสริมให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดได้ ส่วนอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มและต้นพืชได้

Amaki และ Higushi (1989) นำใบฟาแลนด์น๊อฟชิส มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเปปโตนและทริปโตเฟนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าทั้งเปปโตนและทริปโตเฟนส่งเสริมการเกิดโปรโตคอร์ม ความเข้มข้นของทริปโตเฟน 2 กรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดโปรโตคอร์มมากที่สุด เมื่อตัดแบ่งโปรโตคอร์มที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน เพื่อชักนำให้เกิดออแกนโนจีเนซิส (organogenesis) พบว่าส่วนด้านบนของโปรโตคอร์ม มีแนวโน้มเกิดยอดที่พัฒนาเป็นต้นได้ ส่วนด้านล่างไม่เกิดยอดแต่พัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้อีกเรื่อย ๆ

Shimasaki และ Uemoto (1990) ขยายพันธุ์ชิมบิเดี้ยมจากการเพาะเลี้ยงเหง้าในอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม NAA และ BAP พบว่าระดับความเข้มข้นของ NAA และ BAP ที่ต่ำ น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เหง้าเกิดยอดได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของ BAP ที่สูง ๆ จะยับยั้งการเกิดยอด ส่วนเหง้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA และ BAP ในอัตราส่วนที่สูงเกิดโปรโตคอร์มแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ การย้ายเลี้ยงยอดที่ได้บนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต และลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตและโปแทสเซียมไนเตรต จะส่งเสริมการเกิดราก ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์

การแยกโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์ถูกเอาออกโดยวิธีกล หรือโดยไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) (Cocking,1972) โปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากทุกอวัยวะ เนื้อเยื่อของพืช แคลลัสที่ได้จากการนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และจากเซลล์แขวนลอย (Anderson,1974) ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมดังนี้

1.แรงดันออสโมติก

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่ถูกแยกออกมาแล้วไม่มีผนังเซลล์นี้เอง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ (plasmamembrane) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ทำให้น้ำหรือสารต่างๆผ่านเข้าออกสู่โปรโตพลาสต์ได้ง่าย ซึ่งมีผลต่อแรงดันออสโมติกภายในโปรโตพลาสต์ ดังนั้นโปรโตพลาสต์จึงต้องอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตกหรือหด สารเคมีที่ใช้ปรับระดับแรงดันออสโมติกเรียกว่าออสโมติคัม (osmoticum) มักใช้น้ำตาลเช่น กลูโคส หรือซูโครสและน้ำตาลแอลกอฮอล์เช่น แมนนิทอลหรือซอร์บิทอล อาจใช้แต่ละชนิดเดี่ยวๆหรือผสมกันก็ได้ ออสโมติคัมเหล่านี้ ถูกผสมไว้ในสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์และในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบมักใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัม ส่วนจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงหรือจากเซลล์แขวนลอยใช้กลูโคสและซอร์บิทอลแทน (Kao and Michayluk,1974)

ความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ใช้สำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีตั้งแต่ 0.25 -1.0 โมลาร์ขึ้นกับชนิดของพืช Grambow และคณะ (1972) ใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.56 โมลาร์ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์จากเซลล์แขวนลอยแครอท Wallin และ Eriksson (1973) พบว่าซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์เหมาะสมที่สุดสำหรับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยแครอท การเติมซอร์บิทอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 โมลาร์เป็นต้นไปในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งตัวได้ช้าและน้อย

ส่วนซูโครสความเข้มข้นมากกว่า 0.3 โมลาร์จะยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ Anderson (1974)ใช้แมนนิทอลเข้มข้น 1.0 โมลาร์ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อแครอท Ling และคณะ (1983)ใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยส้มจี๊ด

ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของออสโมติคัมมักจะสูงกว่าของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยเช่น Nagata และ Takebe (1971) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบยาสูบใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ Chen และ Ku (1985) ใช้กลูโคสเข้มข้น 0.7 โมลาร์ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วย Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990)ใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น

สำหรับความเข้มข้นและชนิดของออสโมติคัมที่เหมาะสมในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้นั้น Teo และ Neumann (1978) พบว่าซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์เหมาะสมสำหรับการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบและจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลเรแนนแทนด้า (*Renanthanda* Rosalind Choek.) Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์จากใบและกลีบดอกของกล้วยไม้หลายสกุล เช่นคัทลียา ฟาแลนด์น็อฟซิส เด็นโดรเบี้ยมและรองเท้านารี โดยใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ Loh และ Rao (1985) ทดลองแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้า ใช้ออสโมติคัม 2 ชนิดคือ แมนนิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์และซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแมนนิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่า นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 0.4 โมลาร์เป็นสารออสโมติคัม ส่วน Koh และคณะ(1988) รายงานว่าซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์เหมาะสมสำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากอะแรนด้า Sajise และ Sagawa (1991) แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของฟาแลนด์น็อฟซิสในซอร์บิทอลเข้มข้น 0.32 โมลาร์ Evans และ

Bravo (1983) กล่าวว่าแรงดันออสโมติกที่สูงเกินไป ทำให้เมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์เสียหายได้ ส่วนแรงดันออสโมติกที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตก

2. เอนไซม์และความเข้มข้น

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ สารละลายเอนไซม์จะประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ละลายในออสโมติคัม เอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ของพืชมี 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มเซลลูเลส (Cellulase) เช่นเซลลูเลส, ไดรซีเลส (Driselase) และเซลลูไลซิน (Cellulysin) กลุ่มเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) เช่นเฮมิเซลลูเลสและโรไซม์ (Rhozyme) และกลุ่มเพกติเนส (Pectinase) เช่นเพกติเนส, มาเซอโรไซม์ (Macerozyme) และเพกโตไลเอส (Pectolyase) (Evans and Bravo, 1983)

ในการแยกโปรโตพลาสต์อาจใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกัน (enzyme combination) ก็ได้ การทำงานของเอนไซม์ต่างๆที่ใช้ย่อยผนังเซลล์พืชนั้น พบว่าระดับพีเอชและอุณหภูมิจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ กลุ่มเซลลูเลสจะมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 4.5-5 และ 45-50 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนกลุ่มเพกติเนส มีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 5.5-6.0 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ Fitter และ Krikorian (ม.ป.ป.) กล่าวว่าถ้าต้องการปรับพีเอชของสารละลายเอนไซม์ ให้อยู่ในช่วงเดียวกับพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์หรือโปรโตพลาสต์ เช่น 5.7 ซึ่งไม่ใช่ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ต้องเติมบัฟเฟอร์เช่น 3-10 มิลลิโมลาร์ MES [2(N-Morpholino)ethanesufonic acid] เพื่อสเตบิไลซ์ (stabilize) ช่วงพีเอชการทำงานของเอนไซม์ Anderson (1974) แยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อแครอท คอมบิเนชั่นของเอนไซม์ที่ใช้คือเซลลูเลส 5 เปอร์เซ็นต์และเพกติเนส 1 เปอร์เซ็นต์ Wallin และ Eriksson (1973)

แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยแครอท เอนไซม์ที่ใช้คือเซลลูเลส 5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ Nagata และ Takebe (1971) แยกโปรโตพลาสต์จากใบยาสูบใช้เอนไซม์เซลลูเลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเพกโตไลเอส วาย 23 0.1 เปอร์เซ็นต์ Freason และคณะ (1973)แยกโปรโตพลาสต์จากใบพิทูเนีย (*Petunia*)ใช้เซลลูเลส 1.2 เปอร์เซ็นต์และมาเซอโรไซม์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ Chen และ Ku (1985) แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยใช้มาเซอโรไซม์ 2 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว

สำหรับเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการย่อยโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้นั้น Teo และ Neumann (1978) ใช้เซลลูเลส 2 เปอร์เซ็นต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์และเพกติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ย่อยโปรโตพลาสต์จากใบและโปรโตคอร์มของเรแนนแทนด้า Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้เอนไซม์ที่ใช้คือ เซลลูไลซิน 2 เปอร์เซ็นต์,ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์และมาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ Loh และ Rao (1985) ศึกษาคอมบิเนชั่นของเอนไซม์ต่างๆในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้า พบว่าคอมบิเนชั่นของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์, มาเซอโรไซม์ 0.2 เปอร์เซ็นต์และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ย่อยให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด Koh และคณะ (1988) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้า คอมบิเนชั่นของเอนไซม์ที่ใช้คือเซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์,มาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Sajise และ Sagawa (1991) แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสฟาแลนด์น็อฟซิส ใช้เอนไซม์คือเซลลูเลส 2.5 เปอร์เซ็นต์,ไดรซีเลส 1 เปอร์เซ็นต์และมาเซอโรไซม์ 2 เปอร์เซ็นต์

3.แหล่งโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่างกันเช่นจากแคลลัส ใบ หรือรากของพืช มีความต้องการสภาวะต่างๆสำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงต่างกัน ด้วย Evans และ Bravo (1983)กล่าวว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อของพืชเช่นใบ รากและเรณูต้องใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงๆและใช้เวลาในการ

อินคูเบชั่นนานกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัส Kao และ Michayluk (1980) ทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบอัลฟาฟา(alfafa)พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนใช้เวลาในการแยกน้อยกว่า และมีค่าการเจริญเติบโตของโปร-โตพลาสต์ (plating efficiency) มากกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบแก่

การทรีตต้นแม่ด้วยสภาวะต่างๆก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าเป็นการเพิ่มจำนวนโปรโตพลาสต์ให้ได้มากขึ้น Nyman และ Wallin (1988) แยกโปรโตพลาสต์จากใบสตรอเบอรี่ โดยก่อนแยกโปรโตพลาสต์นั้น ย้ายเลี้ยงยอดอ่อนลงอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาลซูโครสต่ำคือ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์แล้วนำใบมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้น Wallin และJohansson (1989) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบแอปเปิ้ลว่า ก่อนแยกโปรโตพลาสต์ได้เพาะเลี้ยงยอดแอบเปิ้ลภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำเป็นเวลา 6 วันแล้วตัดใบมาแช่ในสารละลายออสโมติคัมที่มีกรดแอบซิสซิก (abscisic acid หรือ ABA) เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาแยกโปรโตพลาสต์ทำให้เพิ่มจำนวนโปรโตพลาสต์เช่นกันและโปรโตพลาสต์ที่ได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง มีการแบ่งตัวได้ดีขึ้น

สำหรับแหล่งโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้นั้น Teo และ Neumann (1978) ได้เลือกโปรโตคอร์มเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตคอร์มเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีความแข็งแรงทนทาน โปรโตพลาสต์ที่ได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งตัวและเจริญเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้ ในปีเดียวกันพวกเขาได้แยก-โปรโตพลาสต์จากใบและต้นอ่อนของกล้วยไม้ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบมีผลิกรูปเข็มและเศษเซลล์มาก ส่วนต้นอ่อนมีผลิกรูปเข็มน้อยแต่ได้จำนวนโปรโต-พลาสต์น้อยด้วย Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้หลายสกุลเช่นคัทลียา ฟาแลนด์น็อฟซิส และเด็นโดรเบี้ยม จากส่วนต่างๆคือโปร-โตคอร์ม,ราก,ใบและกลีบดอก พบว่าในการแยกโปรโตพลาสต์จากโปรโตคอร์มใช้เวลาในการอินคูเบชั่นนานที่สุดและได้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยที่สุด ส่วนโปร-โตพลาสต์ที่ได้จากใบแตกง่าย มีผลิกรูปเข็มและคลอโรพลาสต์จากโปรโตพลาสต์ที่แตกหลุดปนอยู่ในสารละลายเอนไซม์เป็นจำนวนมาก ส่วนกลีบดอกให้จำนวน

โปรโตพลาสต์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งอื่น โปรโตพลาสต์ที่ได้จากกลีบดอกเด็นโดรเบี้ยมจะมีสีตั้งแต่ม่วงเข้มจนถึงม่วงจาง Koh และคณะ (1988) ศึกษาขนาดของใบที่ใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ของอะแรนด้า พบว่าขนาดของใบที่มีความยาวน้อยกว่า 1 เซ็นติเมตร ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าใบที่มีความยาวระหว่าง 1-3 เซ็นติเมตรและการทรีตต้นแม่ด้วยการนำไปเลี้ยงไว้ที่มีความยาวแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้พวกเขาได้ทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของอะแรนด้าเปรียบเทียบกับใบ พบว่าใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าแคลลัส เมื่อใช้น้ำหนักเริ่มต้นของใบและแคลลัสเท่ากันคือ 1 กรัม ส่วน Sajise และ Sagawa (1991) ใช้แคลลัสที่ชักนำได้จากใบฟาแลนด์น๊อฟซิสเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มและต้นพืชได้

4. ขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์ให้สะอาด

หลังจากนำแหล่งโปรโตพลาสต์ต่างๆ เช่นใบ หรือเซลล์แขวนลอยมาแช่ในสารละลายเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ออก จะได้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาปนกับเศษเซลล์อื่นๆอยู่ในสารละลายเอนไซม์ การแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์เหล่านี้นิยมใช้เทคนิคการกรองร่วมกับการปั่นแยก (filtration-centrifugation method)โดยใช้ตะแกรงกรอง nylon mesh หรือ stainless steel sieve ที่มีรูขนาด 25-100 ไมโครเมตร ปั่นแยกที่ความเร็ว 100 x g เป็นเวลา 1- 5 นาที (Evans and Bravo,1983) ข้อเสียของการกรองคือโปรโตพลาสต์อาจจะแตกได้ขณะที่ผ่านตะแกรงกรอง วิธีนี้จึงไม่เหมาะกับโปรโตพลาสต์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์บางเช่นโปรโตพลาสต์จากใบ จึงใช้วิธีการลอยตัว (floatation method)แทน (Gamborg,*et al.*,1981) การแยกโปรโตพลาสต์ออกจากสารละลายเอนไซม์โดยวิธีลอยตัวนั้น ทำได้โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์มาผสมกับสารละลายซูโครสเข้มข้นเช่น 0.6 โมลาร์ นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 500xg เป็นเวลา 5 นาที โปรโตพลาสต์ซึ่งมีความหนาแน่นน้อยกว่าเศษเซลล์ก็จะลอยตัวอยู่ข้างบน ส่วนเศษเซลล์ซึ่งหนักกว่าจะตก

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ตะกอนอยู่ข้างล่าง

ตัวอย่างปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ พอสรุปได้ดังตารางที่ 1.

ตารางที่1 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์กล้วยไม้

สกุล	แหล่งโปรโตพลาสต์	ออสโมติคัม	เอนไซม์และความเข้มข้น	เอกสารอ้างอิง
Renantanda	โปรโตคอร์ม	ซอร์บิทอล	เซลลูเลส 2%	Teo และ
Cattleya	ใบอ่อน	0.7 โมลาร์	มาเซอโรไซม์ 1%	Neumann,
Phalaenopsis	ใบอ่อน		และเพกติเนส 0.5%	1978
Dendrobium	ยอดอ่อน			
Paphiopedilum	ยอดอ่อน			
Cattleya	โปรโตคอร์ม,	ซอร์บิทอล	เซลลูไลซิน 2%	Price
Phalaenopsis	ราก,ใบ,	0.5 โมลาร์,	ไดรซีเลส 0.5%	และ
Dendrobium	กลีบดอก	แมนนิทอล	มาเซอโรไซม์ 1%	Earle,
Paphiopedilum		0.2 โมลาร์		1984
Aranda	ใบ	แมนนิทอล	เซลลูเลส 1%	Loh
		0.5 โมลาร์,	ไดรซีเลส 0.5%	และ
		ซูโครส	มาเซอโรไซม์ 0.2%	Rao,
		0.4 โมลาร์		1985

032744

สกุล	แหล่งโปรโตพลาสต์	ออสโมติคัม	เอนไซม์และความเข้มข้น	เอกสารอ้างอิง
Arachnis	ใบ ดอก ราก	ซอร์บิทอล 0.8 โมลาร์	มาเซอโรไซม์ 0.5%	Hew และ Yip, 1986
Aranda	ใบ,แคลลัส	ซูโครส 0.4 โมลาร์	เซลลูเลส 1.5% ไดรซีเลส 0.5% มาเซอโรไซม์ 0.2%	Koh, Goh และ Loh, 1988
Phalaenopsis	แคลลัส	ซอร์บิทอล 0.32 โมลาร์	เซลลูเลส 2.5% ไดรซีเลส 1% มาเซอเลส 2%	Sajise และ Sagawa, 1991

การเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์

โดยทั่วไปแล้วโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงมีความต้องการอาหารและปัจจัยต่างๆเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ แต่อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต้องเติมสารออสโมติคัมลงไปด้วย ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์มีดังนี้

1. จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

Kao และ Michayluk (1975) กล่าวว่าจำนวนเซลล์หรือโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องมีจำนวนอย่างน้อย $1x10^5$ เซลล์หรือโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เซลล์หรือโปรโตพลาสต์จึงเจริญเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงทั่วไป Nyman และ Wallin (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สตรอเบอรี่ที่แยกได้จากใบ โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $5x10^4$โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Zhou (1989) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากละอองเรณูดอกไอริส (*Iris sp*)โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^4$-$1x10^5$โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Dan และ Stephen(1991)เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์หน่อไม้ฝรั่งใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น $5x10^4$โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้นั้น Loh และ Rao (1985) และ Koh และคณะ (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้อะแรนด้าโดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^5$ และ $1.5x10^5$โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และสารควบคุมการเจริญเติบโต

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยทั่วไปแล้ว อาหารเพาะเลี้ยงมักใช้สูตร MS เป็นสูตรพื้นฐาน แล้วดัดแปลงโดยเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อให้เหมาะสมกับโปรโตพลาสต์ของพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชก็มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เช่นกัน การเติมออกซิน

และไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง จะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่และเกิดการแบ่งตัว สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้กลุ่มออกซินได้แก่ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid),NAA (α-naphthaleneacetic acid) กลุ่มไซโทไคนินได้แก่ BA (N^6-benzyladenine)และ KIN (kinetin) ความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของโปรโตพลาสต์และการเพาะเลี้ยง (Eriksson,1977)

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้นั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงได้แก่สูตร MS, B5, KC, 8p และ VW Teo และ Neumann(1975)เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้เรแนนแทนด้าในอาหารสูตร KC ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D เข้มข้น $2x10^{-6}$ โมลาร์ และ KIN เข้มข้น $1x10^{-6}$ โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งตัวกลายเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ 10 สัปดาห์ต่อมากลุ่มเซลล์โตขึ้นมีจำนวน 80-100 เซลล์ต่อกลุ่ม Price และ Earle (1984)เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกลีบดอกเด็นโดรเบี้ยมในอาหารสูตร B5 พบว่าโปรโตพลาสต์มีชีวิตรอด 85 เปอร์เซ็นต์หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 12 วัน Loh และ Rao (1985) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้าในสูตรอาหาร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์อย่างเดียว หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร,NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KIN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวอย่างเดียวแตกหมด ส่วนในอาหารที่เติม 2,4-D,NAA และ KIN โปรโตพลาสต์ยืดยาวและเกิดการแบ่งตัว แต่ไม่มีรายงานการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ Koh และคณะ(1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้าเช่นกันในอาหารสูตร 8p และดัดแปลงใช้ธาตุอาหารหลักของสูตร MS,B5,และ KC สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้คือ 2,4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารที่มีธาตุอาหารหลักของสูตร 8p เองโปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดอยู่นานที่สุดเป็นเวลาถึง 8 สัปดาห์โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่และให้เปอร์เซ็นต์

การแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์มากที่สุดด้วยคือ 0.9 เปอร์เซ็นต์หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 14 วัน สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ช่วยให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดมากที่สุดหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 14 วัน 2,4-D หรือ BA อย่างเดียวเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตพลาสต์คือ 53.1และ 32.3 ตามลำดับ แต่ถ้าเพาะเลี้ยง 28 วัน เปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์เกิดมากที่สุดในอาหารที่มีธาตุอาหารหลักของสูตร B5 คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงไม่เกิดการแบ่งเซลล์

3.วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีหลายวิธี เช่นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบหยด (droplet culture) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบหยดแขวน (hanging droplet) การเพาะเลี้ยงเป็นชั้นฟีดเดอร์ (feeder layer) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid culture) และการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (agar culture) (Evans and Bravo,1983)

โดยทั่วไปนิยมเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวก่อน เมื่อโปรโตพลาสต์เริ่มสร้างผนังเซลล์แล้วจึงย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งอาจทำได้ 2 วิธีคือ ผสมโปรโตพลาสต์กับอาหารเหลวที่เติมวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์หรือเจลไรต์ 0.15 เปอร์เซ็นต์อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสแล้วนำไปเทบางๆในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารเย็นจะแข็งมีโปรโตพลาสต์ติดอยู่ข้างใน วิธีนี้เมื่อโปรโตพลาสต์เจริญเติบโตสามารถสังเกตได้ชัดเจน อีกวิธีคือเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารที่แข็งแล้วก็ได้

4.การตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้ก่อนนำไปเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เสียก่อน วิธีการตรวจสอบมีหลายวิธีเช่นสังเกตการไหลเวียนของไซโทพลาซึม (cyclosis) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าโปรโตพลาสต์นั้นยังมีกิจกรรมทางเมแทบอลิซึมอยู่ การเปลี่ยนแปลงขนาดของโปรโตพลาสต์เมื่อเปลี่ยน

แปลงความเข้มข้นของสารออสโมติคัม เช่นถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารออสโมติคัม โปรโตพลาสต์จะหดมีขนาดเล็กลง หรือถ้าลดความเข้มข้นของสารออสโมติคัม โปรโตพลาสต์จะมีขนาดโตขึ้นเนื่องจากน้ำแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์มากขึ้น การวัดการใช้ออกซิเจนของโปรโตพลาสต์ด้วยออกซิเจนอิเล็กโทรด (oxygen electrode)ซึ่งแสดงว่าโปรโตพลาสต์นั้นยังหายใจอยู่ (Eriksson,1977) นอกจากนี้วิธีที่นิยมใช้กันมากอีกวิธีหนึ่งคือการย้อมสี เป็นวิธีที่ทำได้สะดวกรวดเร็ว สังเกตง่ายและให้ผลค่อนข้างแน่นอน สีที่ใช้ย้อมเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ได้แก่สีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต(fluorescein diacetate หรือ FDA) ฟีโนซาฟรานีน (phenosafranine)(Widholm,1972) ส่วนการตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ใช้สีแคลคอฟลอร์ไวท์ (calcofluor white หรือ CFW) (Nagata and Takebe,1970)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อชักนำต้นกล้วยไม้จากการเพาะเลี้ยงตาในหลอดทดลอง
2. ศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสม ในการแยกโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ คือ
   - ระดับออสโมลาริตี้
   - ช่วงเวลาที่เหมาะสม
   - พีเอช
   - สภาวะการอินคูเบชั่น
     : อุณหภูมิ
     : การเขย่า
   - ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่างๆ
   - แหล่งโปรโตพลาสต์
   - ขนาดของใบที่ใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์
3. ศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ
   - จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น
   - วิธีการ
   - ชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองเริ่มตั้งแต่วันที่ 30 ตุลาคม 2533 ณ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เครื่องจ่ายอาหารอัตโนมัติ เครื่องกรองน้ำระบบรีเวอร์สออสโมซิส ตู้อบเครื่องแก้ว ตู้อบไมโครเวฟ หม้อนึ่งอัดไอ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์ ได้แก่เครื่องปั่นแยกพร้อมหลอดทดลอง เครื่องกรองจุลินทรีย์และกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3. เครื่องแก้วและพลาสติกต่างๆ ได้แก่กระบอกตวง ฟลาสก์ บิกเกอร์ แท่งแก้วคน ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ขวดพลาสติก พาสเจอร์ปิเปต ปิเปต ไมโครปิเปต จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร ตะแกรงกรองขนาด 43 ไมโครเมตร สไลด์ กระจกปิดสไลด์ และสไลด์นับเม็ดเลือด

4. เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ ปากคีบ เข็มเขี่ย มีดผ่าตัด และช้อนเหล็ก

5. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ

6. เครื่องเขย่าที่ปรับอุณหภูมิได้

7. กล้องจุลทรรศน์แบบต่างๆ ได้แก่กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซ็นซ์ (fluorescence microscope Olympus model BH2-RFL) ที่ใช้ Mercury lamp OSRAM HBO 100 W เป็นแหล่งกำเนิดแสงและกล้องอินเวอร์เตด (inverted microscope)

8. กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์ (photomicrographic system Olympus model PM-10AD) และฟิล์ม Kodacolor ASA 400

8. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงติดหลอดไฟโกรลักซ์ให้ความเข้มแสงประมาณ 2,000-3,000

ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างพืช

พืชทดลองต้นกล้วยไม้อะแรนด้า (*Aranda* Chark Kuan) จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

สารเคมี

1.เอนไซม์ ได้แก่ Cellulase "ONOZUKA" R-10 (Yakult Honsha Co.,Ltd.Lot#201050), Driselase (Kyowa Hakko Co.,Ltd. Lot#4111) และ Pectinase (ICN Biochemical Lot#18832)

2.สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตรต่างๆคือ Vacin and Went (VW),Murashige and Skoog (MS), Knudson C (KC), Gamborg B-5 (B5), และ Nagata and Takebe (NT) (ภาคผนวก)

3.สารเคมีบัฟเฟอร์คือ MES

4.สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช NAA,2,4-D, KIN, BA, Zeatin และ ABA

5.สารเคมีสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่เอธิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ คลอรอกซ์ และทวีน 20

6.สารเคมีสำหรับย้อมตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์คือฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตและแคลคอฟลอร์ไวท์ ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

1.วิธีการเพาะเลี้ยงตากล้วยไม้

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว

1.เลือกหน่อกล้วยไม้อะแรนด้าที่แข็งแรงสมบูรณ์สูงประมาณ 7-10 นิ้ว ตัดใบและรากพร้อมทั้งลอกกาบใบชั้นนอกออก

2.ล้างด้วยน้ำประปาร่วมกับดีเทอร์เจนต์

3.ตัดลำต้นเป็นท่อนสั้นๆ ให้มีตาติดอยู่ท่อนละ 2-3 ตา

4.ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน20 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที

5.ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

6.ลอกกาบใบออกจนเห็นตา ใช้มีดคว้านตาออกมา ส่วนตายอดลอกใบออกจนหมด แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 5 มิลลิเมตร

7.เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร VW ที่ปลอดเชื้อ

8.นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จนตามีรูปร่างครึ่งทรงกลม

1.2 การชักนำโปรโตคอร์ม

1.นำตาที่เจริญเติบโตเป็นรูปครึ่งทรงกลม มาลอกใบอ่อนชั้นนอกออก 2-3 ชั้น

2.ย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลวสูตรเดิม ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงและเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 เดือน จนกระทั่งได้โปรโตคอร์มขึ้นมา

4.ตัดแบ่งโปรโตคอร์มออกเป็นส่วนๆ และย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม

1.3 การชักนำต้นกล้วยไม้จากโปรโตคอร์ม

เมื่อต้องการได้ต้นอ่อน ย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มลงอาหารแข็งสูตรเดิม ทิ้งไว้ประมาณ 2 เดือนโปรโตคอร์มจะพัฒนาเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์

2.วิธีการแยก การตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

2.1 พืชทดลอง

ใช้ใบอ่อนจากต้นกล้วยไม้อะแรนด้าที่ชักนำได้จากการทดลองตอนที่ 1 เลือกเอาใบบนสุดที่มีความยาว 1-3 เซ็นติเมตร การทดลองทุกครั้งใช้ใบกล้วยไม้น้ำหนักสด 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ทุกการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2 วิธีเตรียมสารละลายเอนไซม์

1.เตรียมสารละลายซอร์บิทอล ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์และเมสอย่างละ 20 มิลลิโมลาร์ ลงในสารละลายซอร์บิทอล ปรับพีเอชตามต้องการด้วยสารละลายโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการอบด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

2.เตรียมสารละลายเอนไซม์ชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ ปรับพีเอชให้เท่ากับพีเอชของสารละลายซอร์บิทอล

3.นำไปปั่นแยกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกจากเอนไซม์ ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสของสารละลายเอนไซม์มาใช้ ตะกอนทิ้งไป ทำซ้ำอีกครั้ง

4.ทำเอนไซม์ให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอนไซม์ไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.เมื่อต้องการแยกโปรโตพลาสต์ ให้เตรียมสารละลายเอนไซม์โดยการนำสารละลายในข้อ 1 ผสมกับสารละลายในข้อ 4 ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตรในสภาพปลอดเชื้อ

2.3 วิธีเตรียมวอชชิ่งโซลูชั่น

1.เตรียมสารละลายซอร์บิทอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายเอนไซม์ เติมแคลเซียมคลอไรด์และเมส อย่างละ 10 มิลลิโมลาร์

2.ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการอบด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

2.4 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

นำใบกล้วยไม้น้ำหนักสด 1 กรัม ใช้มีดผ่าตัดผ่าใบกล้วยไม้ตามความยาวของใบออกเป็น 2 ชีก นำด้านที่มีรอยบาดแผลคว่ำลงไปในสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร หุ้มจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปศึกษาตามสภาวะต่างๆที่ต้องการ

2.5 วิธีการล้างโปรโตพลาสต์

1.แยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ในสารละลายเอนไซม์ โดยการกรองด้วยตะแกรงกรอง ขนาด 43 ไมโครเมตร

2.นำสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ ไปเซ็นตริฟิวจ์ที่ 100 x g เป็นเวลา 1 นาที

3.ดูดสารละลายเอนไซม์ออกด้วยพาสเจอร์ปิเปต แล้วแขวนลอยโปร-โตพลาสต์ไว้ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเซ็นตริฟิวจ์อย่างเดิม ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

4.แขวนลอยโปรโตพลาสต์ไว้ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.6 วิธีการเก็บผลการศึกษา

ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ ที่แขวนลอยในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่สไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด ซึ่งมีปริมาตรข้างละ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร สังเกตลักษณะและนับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า แต่ละซ้ำนับจำนวนโปรโตพลาสต์ 10 ครั้ง บันทึกผล

2.7 วิธีเตรียมโปรโตพลาสต์สำหรับการเพาะเลี้ยง

1.ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ ที่แขวนลอยในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่มีสารละลายซูโครสเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

2.นำไปเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 200 x g เป็นเวลา 5 นาที

3.ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ข้างบน มาล้างด้วยวอชชิ่งโซลูชั่น 1 ครั้ง

4.ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ตามต้องการ ในอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยง

2.8 วิธีตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

1.ผสมสารละลายสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่ออะซิโตน 1 มิลลิลิตรกับโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยง 0.1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต 0.1 เปอร์เซ็นต์

2.นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ใช้ dichroic mirror,exciter filter unit Blue (B)และ barrier filter L-435 ภายในเวลา 5-15 นาทีหลังจากการย้อมสี โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว

2.9 วิธีตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

1.ผสมสารละลายสีแคลคอฟลอร์ไวท์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายวอชชิ่งโซลูชั่น ที่มีความเข้มข้นของสารปรับระดับความดันออสโมติกเหมือนกับอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ใช้สารละลายสีปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2.นำไปตรวจสอบใต้กล้องฟลูออเรสเซ็นซ์ใช้ dichroic mirror, exciter filter unit Ultraviolet (U) และ barrier filter O-515 โปรโตพลาสต์ที่มีผนังเซลล์จะเห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบ

นอกเยื่อหุ้มเซลล์

3.การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

ในการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์นั้น ได้ศึกษาตามลำดับดังนี้คือ ระดับออสโมลาริตี้ สภาวะการอินคูเบชั่นคือ อุณหภูมิ และความเร็วในการเขย่า ระดับพีเอช ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่างๆ แหล่งโปรโตพลาสต์ และขนาดของใบ

วิธีการศึกษาทำได้ดังนี้

3.1 การศึกษาระดับออสโมลาริตี้

นำใบกล้วยไม้มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.5,0.7และ0.9 โมลาร์ สังเกตเซลล์ทุกชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง สังเกตลักษณะและตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ บันทึกผล

3.2 สภาวะการอินคูเบชั่น

3.2.1 อุณหภูมิ

นำใบกล้วยไม้มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น0.7 โมลาร์(จากการศึกษาในข้อ 3.1) นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียสตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 5 ชั่วโมง บันทึกผล

3.2.2 การเขย่า

นำใบกล้วยไม้มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส(จากการศึกษาในข้อ 3.2.1) พร้อมการเขย่า 40 รอบต่อนาทีและไม่มีการเขย่า ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 5 ชั่วโมง

บันทึกผล

3.3 พีเอช

นำใบกล้วยไม้มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสและไดรซีเลส เดี่ยวๆเข้มข้นอย่างละ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ พีเอช 3.5,4.0,4.5,5.0 และ 5.5 นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที (จากการศึกษาในข้อ 3.2) ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ ที่เวลา 5 ชั่วโมง บันทึกผล

3.4 ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดต่างๆ

นำใบกล้วยไม้มาแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเขย่า 40 รอบต่อนาที ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลาต่างๆ คือ 5 7 9 และ11 ชั่วโมง บันทึกผล

3.5 แหล่งโปรโตพลาสต์

นำใบกล้วยไม้ โปรโตคอร์มและรากอย่างละ 1 กรัม มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 7 ชั่วโมง (จากการศึกษาในข้อ 3.4) บันทึกผล

3.6 ขนาดความยาวของใบ

นำใบกล้วยไม้ขนาดความยาว 1-3 เซ็นติเมตร และน้อยกว่า 1 เซ็นติเมตร อย่างละ 1 กรัม มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 7 ชั่วโมง บันทึกผล

4. วิธีการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

4.1 วิธีเตรียมอาหาร

1. ชั่งสารเคมีต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร (ภาคผนวก) ให้ได้น้ำหนักตามต้องการ ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนดพร้อมทั้งปรับความเป็นกรดด่าง

2. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.45 ไมโครเมตรสำหรับอาหารเหลวและอบนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับอาหารแข็งและกึ่งแข็งกึ่งเหลว

4.2 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

นำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร สูตร VW ที่มี 2,4-D เข้มข้น $2x10^{-6}$ โมลาร์ (0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร) BA เข้มข้น $1x10^{-6}$ โมลาร์ (0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร) และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^{4}$, $1x10^{5}$ และ $1x10^{6}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดและที่สว่างในห้องเพาะเลี้ยง สังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตดและตรวจสอบความมีชีวิต หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 และ 7 วัน บันทึกผล

4.3 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลว มาเพาะเลี้ยงโดยวิธีต่างๆ ในจานเลี้ยงเชื้อ กำหนดให้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรและเพาะเลี้ยงในที่มืด ในอาหารเหมือนการทดลองข้อ 4.2 โดยวิธีการต่างๆดังนี้

วิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร ปริมาตรอาหาร 3 มิลลิลิตร หุ้มจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม

วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวแบบหยด (sitting drop) โดยหยดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 5 หยด หุ้มด้วยพาราฟิล์ม

วิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารแข็ง

วิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

สังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ทุกวันหลังจากการเพาะเลี้ยง ตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เก็บผลใน 3 สัปดาห์

4.4 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์จำนวน $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และกึ่งแข็งกึ่งเหลว สูตรต่างๆ คือ

สูตรที่ 1 อาหารสูตร VW ที่มี 2,4-D เข้มข้น 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 2 อาหารสูตร KC ที่มี 2,4-D เข้มข้น 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 3 อาหารสูตร 1/2MS ที่มี 2,4-Dเข้มข้น 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 4 อาหารสูตร B5 ที่มี 2,4-D เข้มข้น 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 5 อาหารสูตรที่ 4 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 6 อาหารสูตรที่ 4 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยกลูโคสเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 7 อาหารสูตรที่ 4 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยซูโครสเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 8 อาหารสูตรที่ 4 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยมอลโตสเข้มข้น 0.7 โมลาร์

สูตรที่ 9 อาหารสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ BA เข้มข้น อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 10 อาหารสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ KIN เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 11 อาหารสูตร NT ที่มี NAA กับ BA ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์

บันทึกผลภายใน 3 สัปดาห์ หลังจากการเพาะเลี้ยง โดยสังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ ตรวจสอบความมีชีวิต การสร้างผนังเซลล์ใหม่ และการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในอาหารแต่ละสูตร

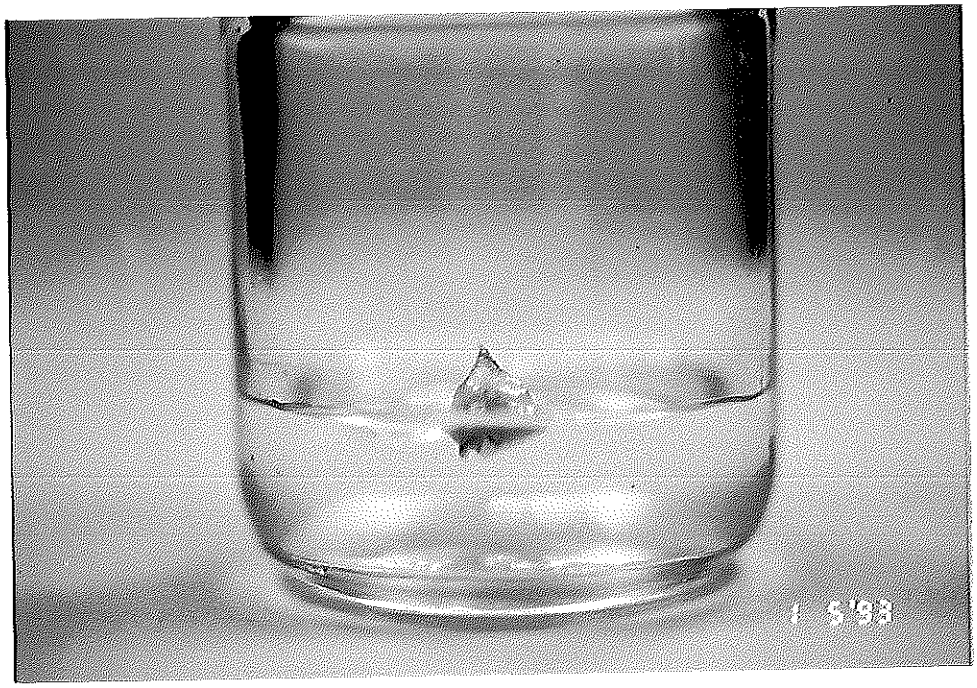
4.4 การทรีตแหล่งโปรโตพลาสต์

ก่อนแยกโปรโตพลาสต์ นำใบกล้วยไม้แช่ในสารละลายกรดแอบซิสซิกเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จำนวน $1x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 9 สังเกตและบันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 4.3

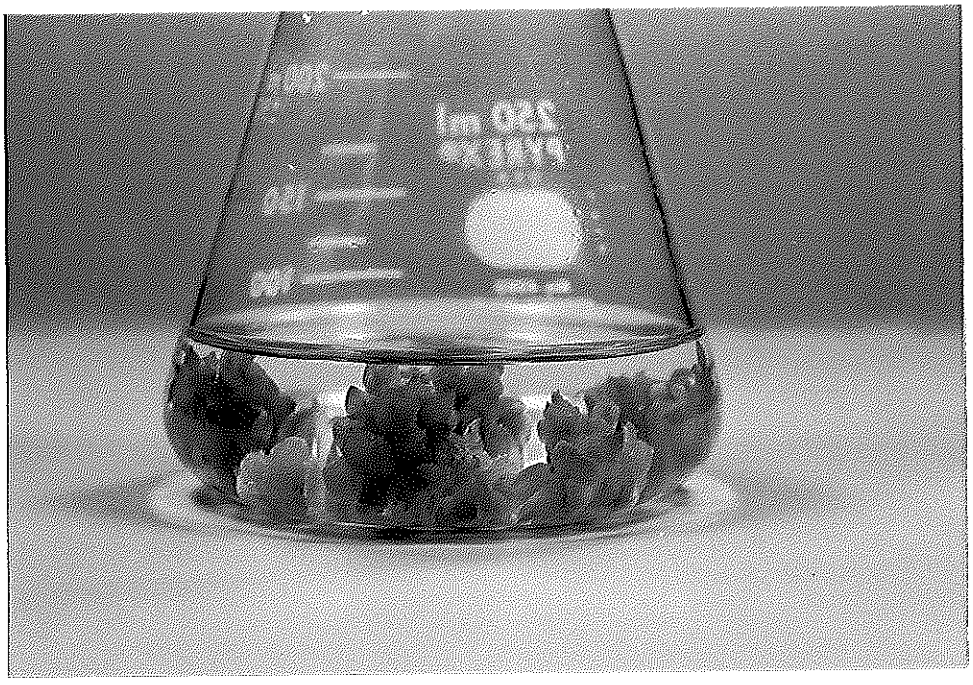
ผลการทดลอง

1.การเพาะเลี้ยงตากล้วยไม้

หลังจากนำตาของกล้วยไม้อะแรนด้ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตาจะขยายขนาดโตขึ้นและพัฒนาเป็นรูปร่างครึ่งทรงกลมคล้ายโดม มีสีเขียว (รูปที่ 4) เมื่อต้องการชักนำโปรโตคอร์มทำได้โดยการฉีกใบอ่อนที่หุ้มอยู่รอบนอกโดมออก เพื่อทำลายสมดุลย์ของฮอร์โมน แล้วย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลวสูตรเดิมในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ตารูปโดมพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มในเวลา 2 เดือนหลังจากการย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว การเกิดโปรโตคอร์มเกิดตรงฐานของตาก่อนแล้วเพิ่มจำนวนมากขึ้นรอบๆชิ้นส่วนของตา ตัดแบ่งโปรโตคอร์มที่ได้เป็นส่วนๆแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเกิดจำนวนโปรโตคอร์มขึ้นมากมายและรวดเร็วจากชิ้นส่วนโปรโตคอร์มเดิมที่ตัดแบ่งมา (รูปที่ 5) เมื่อต้องการต้นกล้วยไม้ให้ทำการย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มลงอาหารแข็งสูตรเดิมอีกครั้ง พบว่าโปรโตคอร์มเหล่านี้ดิฟเฟอเรนทิเอทเป็นต้นพืช โดยเกิดยอดและใบก่อนแล้วเกิดราก (รูปที่ 6) เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 2-3 เดือนได้ต้นกล้วยไม้ที่โตสมบูรณ์ความสูงประมาณ 5 เซ็นติเมตรซึ่งใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 7)



รูปที่ 4 ตากล้วยไม้อะแรนด้า ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 1 เดือน พัฒนาเป็นรูปโดม



รูปที่ 5 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

รูปที่ 6 โปรโตคอร์มพัฒนาเป็นต้นกล้วยไม้

รูปที่ 7 ต้นกล้วยไม้ที่โตสมบูรณ์ สำหรับใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์

2. สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

2.1 ระดับออสโมลาริตี้

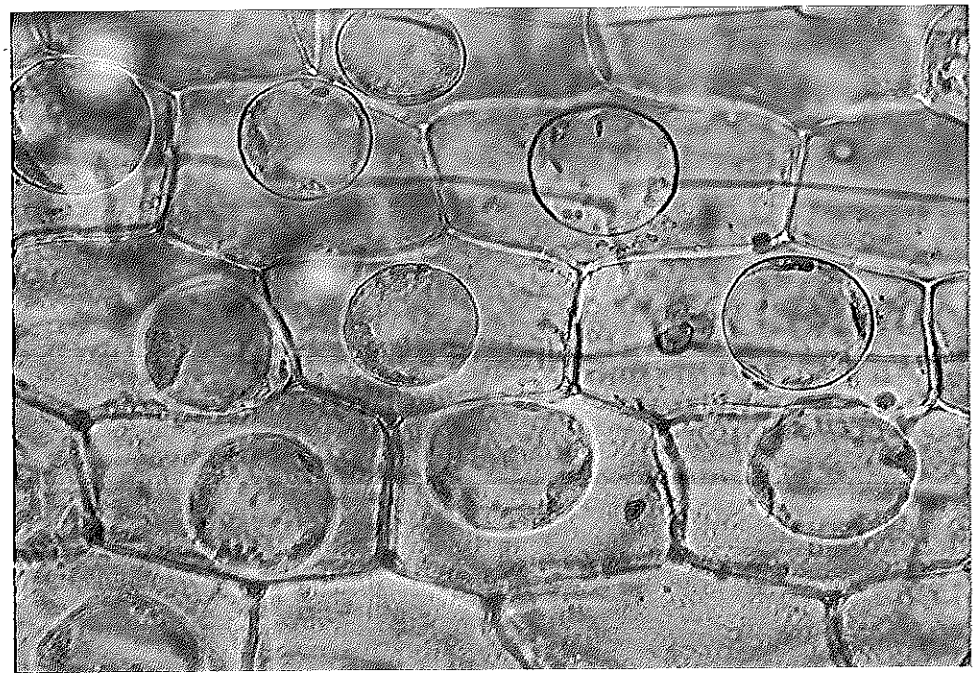
เมื่อนำใบกล้วยไม้น้ำหนัก 1 กรัมมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลซึ่งใช้เป็นสารออสโมติคัมความเข้มข้นต่างๆคือ 0.5,0.7 และ 0.9 โมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมงจะเห็นว่าเซลล์ใบของกล้วยไม้เกิดพลาสโมไลซิส เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากผนังเซลล์ (รูปที่ 8) แล้วเอนไซม์จะย่อยผนังเซลล์จนได้โปรโตพลาสต์หลุดออกมา เมื่อสังเกตโปรโตพลาสต์ทุกชั่วโมงพบว่าเริ่มมีโปรโตพลาสต์หลุดออกมาในชั่วโมงที่ 3 เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง สังเกตลักษณะและตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์เป็นดังนี้ (ตารางที่ 2) ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.5 โมลาร์ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยคือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ได้กลม เต่ง แต่มีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แตกมากสังเกตได้จากมีเม็ดคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในสารละลายเอนไซม์ ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.7 โมลาร์ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ในสารออสโมติคัม 0.5 โมลาร์ แต่มีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แตกน้อยกว่า ส่วนที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.9 โมลาร์นั้น ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยที่สุดคือ $0.6x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะหดไม่กลม เนื่องจากเข้มข้นของสารปรับระดับออสโมลาริตี้สูงเกินไป (รูปที่ 9)

ดังนั้นระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้าคือ 0.7 โมลาร์ ในการศึกษาเรื่องสภาวะอื่นๆที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ จึงได้เลือกสารละลายซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์เป็นตัวควบคุมระดับออสโมลาริตี้

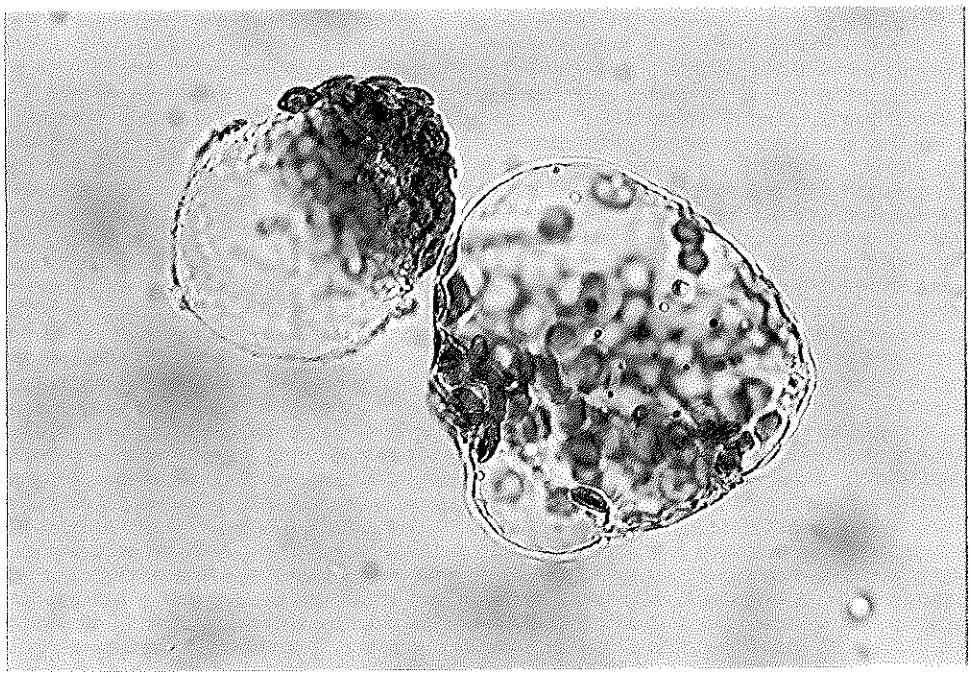
โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้อะแรนด้านั้น มีลักษณะกลม เต่ง มีความแตกต่างกันชัดเจนในเรื่องของขนาด (รูปที่ 10) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือมีการกระจายของเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในโปรโตพลาสต์หลายแบบ เช่น

ตารางที่ 2 จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.5, 0.7 และ 0.9 โมลาร์ ของสารละลายซอร์บิทอล

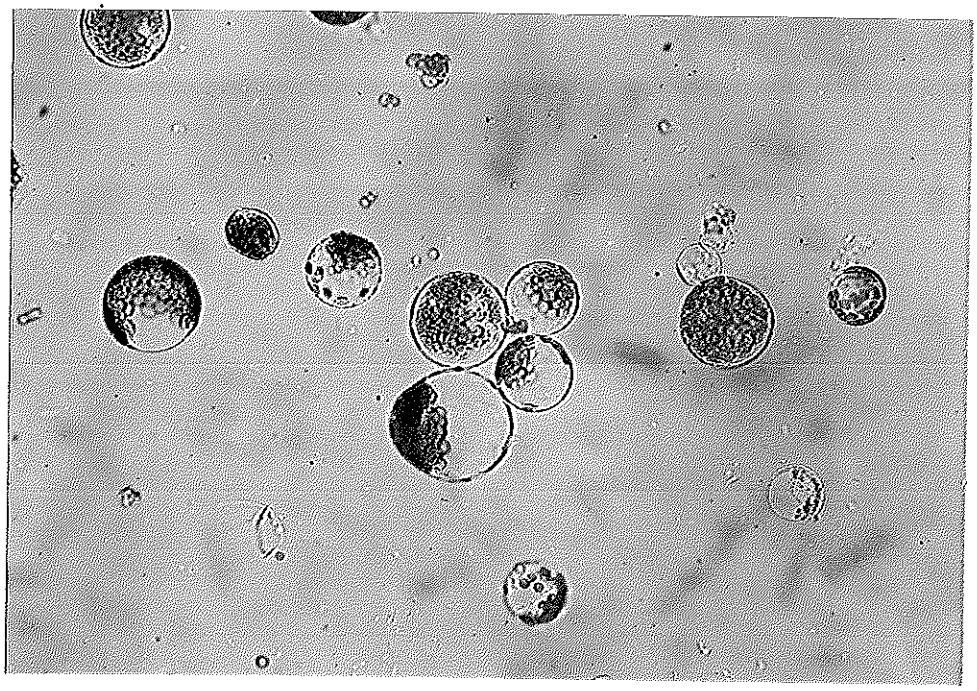
ระดับออสโมลาริตี้ (โมลาร์)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)				ลักษณะโปรโตพลาสต์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm SD$	
0.5	0.60	0.17	2.30	1.02 ± 1.12	กลม เต่งแตกมาก
0.7	2.00	2.10	2.00	2.03 ± 0.05	กลม เต่งแตกน้อย
0.9	0.40	0.80	1.30	0.83 ± 0.45	หด รูปร่างเบี้ยว ไม่กลม



รูปที่ 8 เซลล์ใบกล้วยไม้เกิดพลาสโมไลซีส (x165)



รูปที่ 9 โปรโตพลาสต์ที่หดในสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ (x165)



รูปที่ 10 โปรโตพลาสต์ในสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ มีลักษณะกลม และขนาดต่างๆกัน (x125)

คลอโรพลาสต์กระจายเต็มเซลล์ (รูปที่ 11) คลอโรพลาสต์รวมตัวกันเป็นก้อนอยู่กลางเซลล์ (รูปที่ 12) คลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 13)และคลอโรพลาสต์อยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (รูปที่ 14) และบางโปรโตพลาสต์ไม่มีเม็ดคลอโรพลาสต์เลย (รูปที่ 15)

นอกจากนี้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ จะมีเซลล์ซึ่งภายในสะสมผลึกรูปเข็ม (raphides)ที่เรียกว่า idioblast cell (รูปที่ 16) ปนออกมากับโปรโตพลาสต์ด้วย ถ้าเซลล์นี้แตกผลึกรูปเข็มจะหลุดออกมาทิ่มตำโปรโตพลาสต์อื่นๆทำให้แตกได้

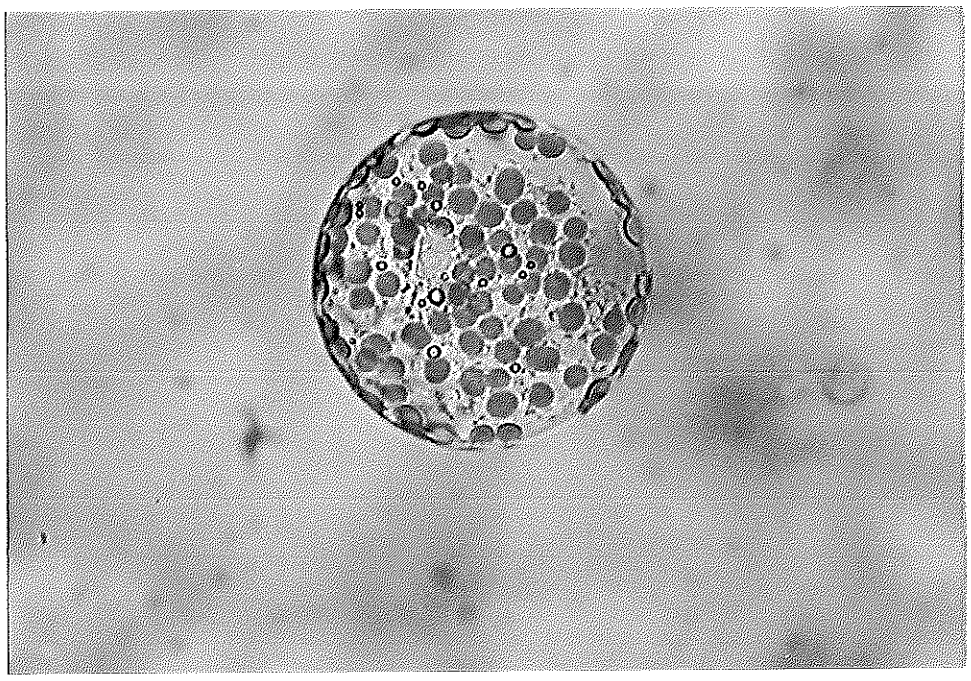
2.2 สภาวะการอินคูเบชั่น

2.2.1 อุณหภูมิ

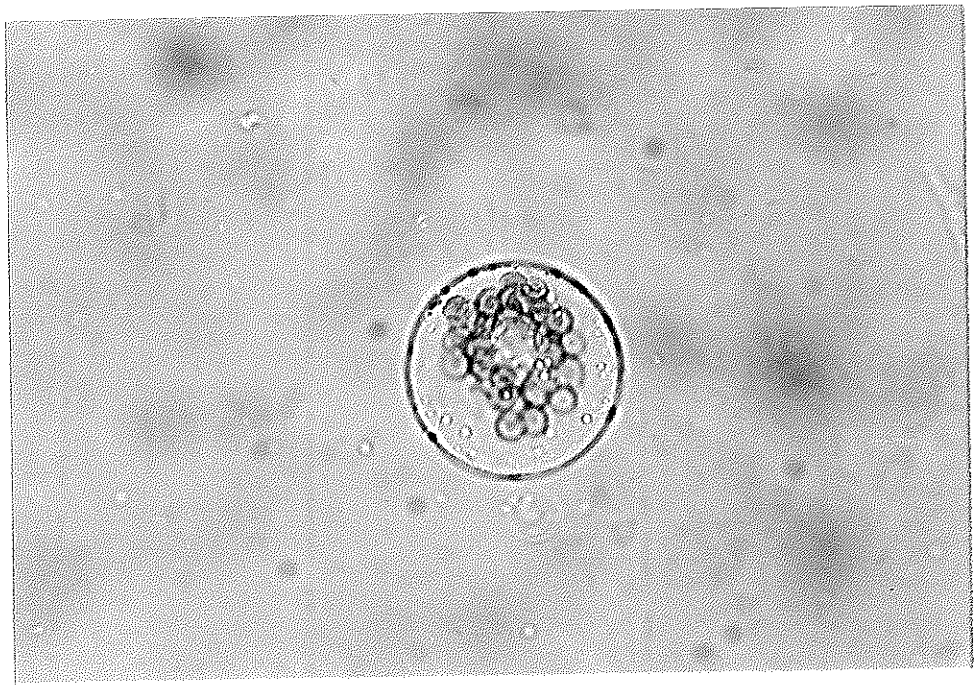
เมื่อนำใบกล้วยไม้มาแยกด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ พีเอช 4.5 นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส บันทึกผลที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าการอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสทุกการทดลอง (ตารางที่ 3)

2.2.2 การเขย่า

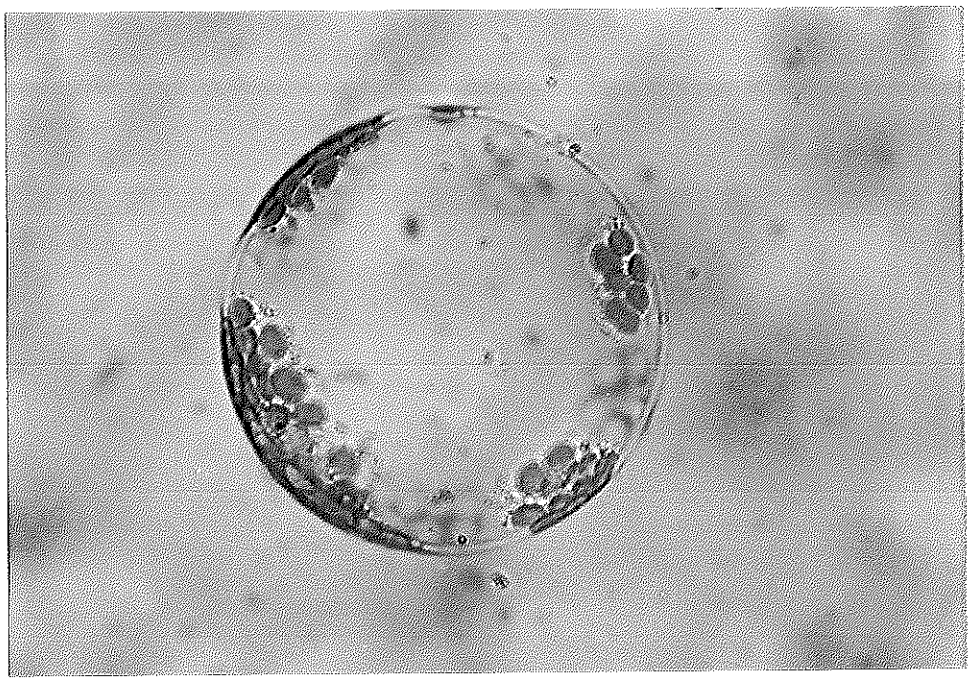
เมื่อนำใบกล้วยไม้ มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ละลายในสารละลายซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์ พีเอช 4.5 นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระหว่างการเขย่า 40 รอบต่อนาทีกับไม่มีการเขย่า พบว่าการอินคูเบชั่นที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเขย่า 40 รอบต่อนาที ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่า (ตารางที่ 4)



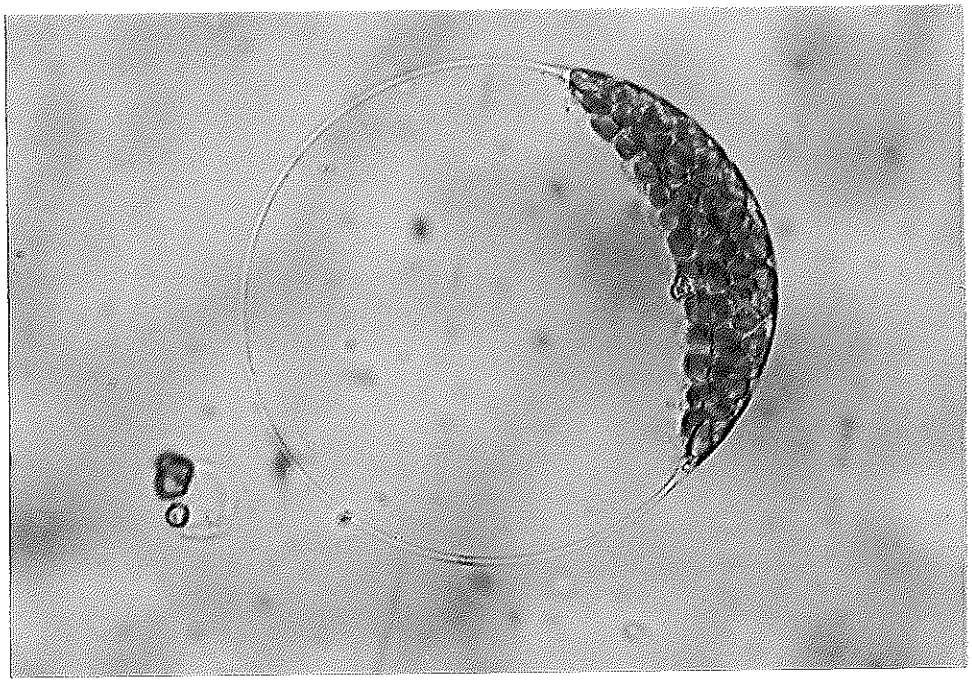
รูปที่ 11 โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์กระจายเต็มเซลล์ (x165)



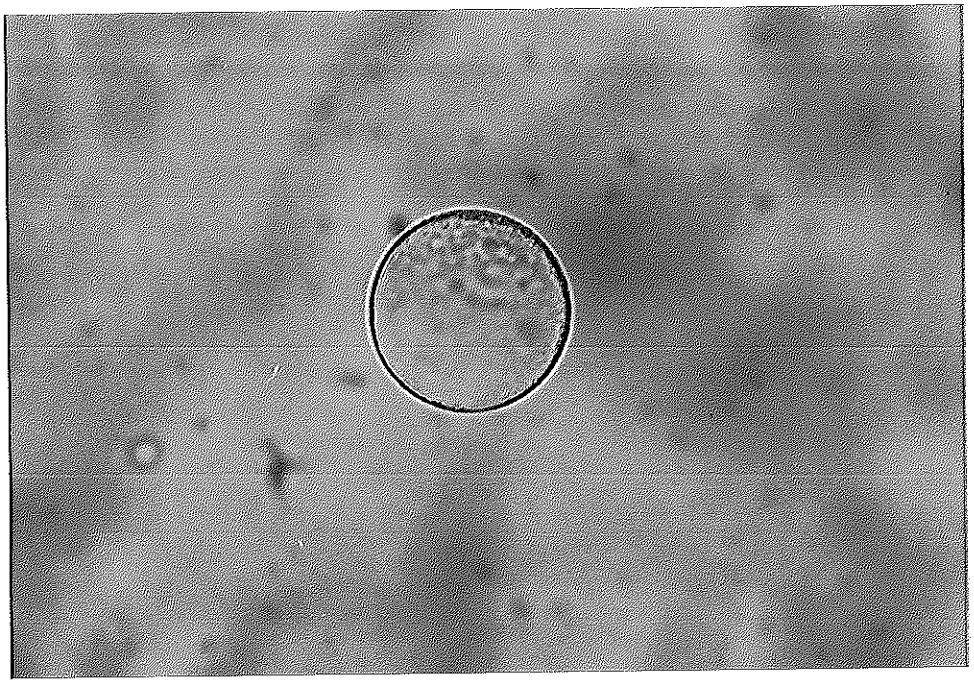
รูปที่ 12 โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์รวมตัวกันเป็นกลุ่มอยู่
กลางเซลล์ (x165)



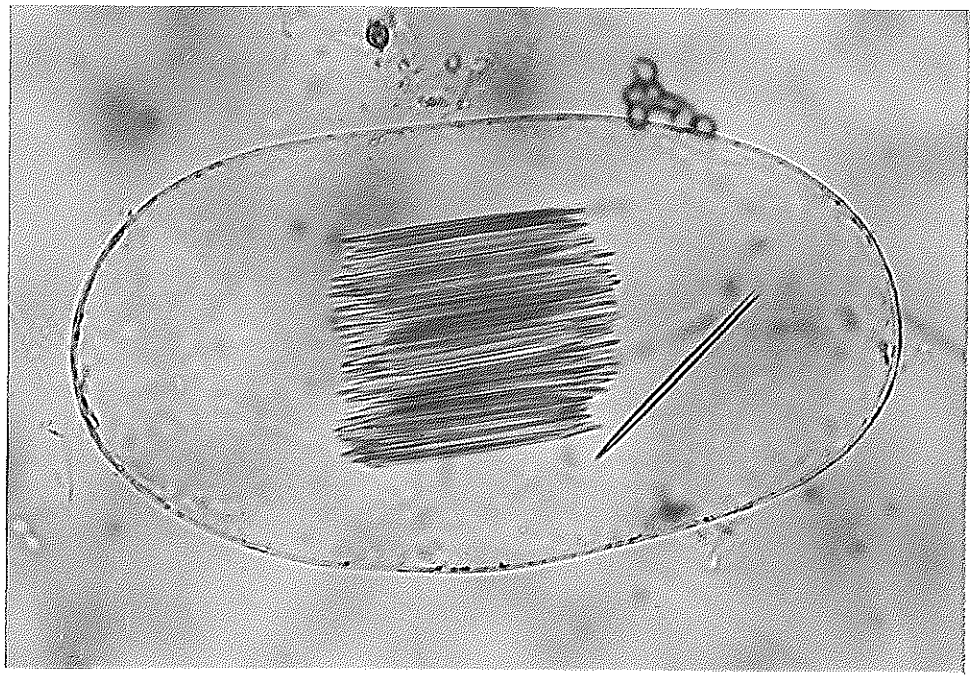
รูปที่ 13 โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ (x165)



รูปที่ 14 โปรโตพลาสต์ที่คลอโรพลาสต์อยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (x165)



รูปที่ 15 โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีคลอโรพลาสต์ (x125)



รูปที่ 16 เซลล์ที่สะสมผลึกรูปเข็มอยู่ภายใน (x165)

ตารางที่ 3 จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ที่สภาวะการอินคูเบชั่น ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (เซลเซียส)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$) ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm SD$
25	2.50	2.10	2.10	2.30±0.232
30	2.90	3.20	2.90	3.00±0.15

ตารางที่ 4 จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า ที่สภาวะการอินคูเบชั่น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที และไม่มีการเขย่า

ความเร็วในการเขย่า (รอบต่อนาที)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$) ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm SD$
0	2.90	3.00	2.80	2.90±0.10
40	3.20	3.40	3.30	3.30±0.10

2.3 ระดับพีเอช

ในการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น ใช้เอนไซม์ในการศึกษาสองชนิด คือเซลลูเลสและไดรซีเลสเปรียบเทียบกัน เนื่องจากไดรซีเลสเป็นเอนไซม์กลุ่มเดียวกับเซลลูเลส แต่ไดรซีเลสมีสมบัติทั้งเซลลูเลสและเพกติเนสรวมกัน จึงคาดว่าน่าจะให้ผลการแยกโปรโตพลาสต์ออกมาเป็นจำนวนมาก

เมื่อนำใบกล้วยไม้มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเซลลูเลสหรือไดรซีเลสเดี่ยวๆ เข้มข้นอย่างละ 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์ ที่ระดับพีเอชต่างๆคือ 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเซลลูเลสคือ 4.0 ได้จำนวน 5.3×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่วนพีเอชที่เหมาะสมของไดรซีเลสคือ 5.0 ได้จำนวน 4×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5) ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลลูเลสจะย่อยได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าไดรซีเลส

2.4 เข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เมื่อนำใบกล้วยไม้มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆและในคอมบิเนชั่นต่างๆ ที่ละลายในซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 5,7,9 และ 11 ชั่วโมง พบว่าเซลลูเลสเดี่ยวๆเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 7 ชั่วโมง ย่อยโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุดคือ 3.6×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ที่เวลา 11 ชั่วโมงได้ 2.6×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6)

สำหรับไดรซีเลสนั้น พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 5 ชั่วโมงให้จำนวนมากที่สุดคือ 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้นข้นเป็น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาเท่ากันคือ 5ชั่วโมง จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ลดลงเรื่อยๆตามความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่าจำนวนโปรโตพลาสต์จะลดลงจนกระทั่งชั่วโมงที่ 9 และ 11 ของการอินคูเบชั่นไม่พบโปรโตพลาสต์เลย (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่ช่วงพีเอชต่างๆของเอนไซม์เซลลูเลสและไดรซีเลส เข้มข้นอย่างละ 2 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของเอนไซม์	พีเอช	จำนวนโปรโตพลาสตต่อมิลลิลิตรเฉลี่ย $\bar{X}\pm SD$ ($x10^5$)				
		3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
เซลลูเลส		1.00±0.36	5.30±0.36	2.80±0.85	2.20±0.50	1.20±0.36
ไดรซีเลส		*	0.20±0.50	0.20±0.38	0.40±1.58	0.10±0.00

* แทนจำนวนโปรโตพลาสต์ที่น้อยจนนับไม่ได้

ตารางที่ 6 จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 5, 7, 9 และ 11 ชั่วโมง

ชนิดของเอนไซม์ และเข้มข้น	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรเฉลี่ย $\bar{X}\pm SD$ ($x10^5$)			
	5 ชม.	7 ชม.	9 ชม.	11 ชม.
เซลลูเลส 1%	1.50±0.36	1.00±0.00	0.90±0.40	1.10±0.38
เซลลูเลส 2%	1.70±0.24	3.60±0.25	1.80±0.50	2.60±0.23
เซลลูเลส 3%	0.10±0.49	0.19±0.10	0.70±0.34	0.23±0.10
ไดรซีเลส 1%	1.00±0.76	0.83±0.45	0.54±0.10	0.56±0.92
ไดรซีเลส 2%	0.89±0.15	0.88±0.20	0.80±0.10	0.30±0.47
ไดรซีเลส 3%	0.19±0.24	0.130±0.36	*	*
เซลลูเลส 1% และ ไดรซีเลส 1%	0.90±0.10	0.80±0.00	0.30±0.26	*
เซลลูเลส 1% และ เพกติเนส 1%	1.00±0.56	0.70±0.787	1.80±0.50	2.50±0.50
ไดรซีเลส 1% และ เพกติเนส 1%	1.80±0.15	2.00±0.20	1.90±0.85	2.80±0.22
เซลลูเลส 1% , ไดรซีเลส 0.5% และ เพกติเนส 0.5%	0.70±0.98	1.30±0.14	2.00±0.54	*

* แทนจำนวนโปรโตพลาสต์ที่น้อยจนนับไม่ได้

ส่วนคอมบิเนชั่นของเอนไซม์นั้น พบว่าคอมบิเนชั่นของเซลลูเลสและเพกติเนส กับคอมบิเนชั่นของเอนไซม์ไดรซีเลสและเพกติเนสอย่างละ 1 เปอร์-เซ็นต์นั้น ที่เวลา 11 ชั่วโมงจะย่อยได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด และใกล้เคียงกันคือ $2.5x10^5$ และ $2.8x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำเนื้อเยื่อใบที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 7 ชั่วโมงมาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ใบกล้วยไม้จะเกิดการหดตัวโดยเยื่อหุ้มเซลล์ผละออกจากผนังเซลล์ แล้วเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยผนังเซลล์จนได้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาโดยที่มิดเดิ้ลลาเมลล่ายังยึดติดกันอยู่ ส่วนตรงกลางเซลล์จะมีช่องว่าง เนื่องจากโปรโตพลาสต์หลุดออกไปแล้ว (รูปที่ 8)

2.5 เปรียบเทียบแหล่งของโปรโตพลาสต์

นำใบ รากและโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์ เก็บผลที่เวลา 7 ชั่วโมง พบว่าใบกล้วยไม้เป็นแหล่งที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ $3.4x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือรากให้จำนวน $1.7x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรโปรโตคอร์มเป็นแหล่งที่ให้จำนวนน้อยที่สุดคือ $0.6x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 7)

2.6 เปรียบเทียบขนาดของใบ

จากการทดลองเปรียบเทียบขนาดความยาวของใบที่ใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ โดยการนำใบกล้วยไม้ที่มีความยาวแตกต่างกันคือ 1-3 เซ็นติเมตร และยาวมากกว่า 3 เซ็นติเมตร มาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์-เซ็นต์ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์เก็บผลที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาด 1-3 เซ็นติเมตร และจากใบที่มีขนาดความยาวมากกว่า 3 เซ็นติเมตร ได้จำนวนไม่แตกต่างกันคือ $3.3x10^5$ และ $3.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 8) แต่ลักษณะโปรโต-พลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาด 1-3 เซ็นติเมตรมีขนาดเล็ก เม็ดคลอโรพลาสต์

ตารางที่ 7 จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่แยกจากแหล่งโปรโตพลาสต์ต่างๆคือ ราก ใบและโปรโตคอร์ม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

แหล่งโปรโตพลาสต์	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm SD$
ราก	0.10	0.10	0.30	1.66 ± 1.15
ใบ	3.70	3.20	3.40	3.43 ± 0.25
โปรโตคอร์ม	*	0.10	0.10	0.10 ± 0.00

* แทนจำนวนโปรโตพลาสต์ที่น้อยจนนับไม่ได้

ตารางที่ 8 จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่แยกได้จากใบที่มีขนาด ต่างกันด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

ความยาวของใบ (เซ็นติเมตร)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm SD$
1-3	3.60	2.40	3.90	3.33 ± 0.79
> 3	3.00	3.90	3.60	3.50 ± 0.45

หนาแน่น แวคิวโอลน้อยซึ่งเหมาะแก่การนำไปเพาะเลี้ยง ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาดความยาวมากกว่า 3 เซ็นติเมตร โปรโตพลาสต์ที่ได้มีแวคิวโอลขนาดใหญ่เกือบเต็มโปรโตพลาสต์

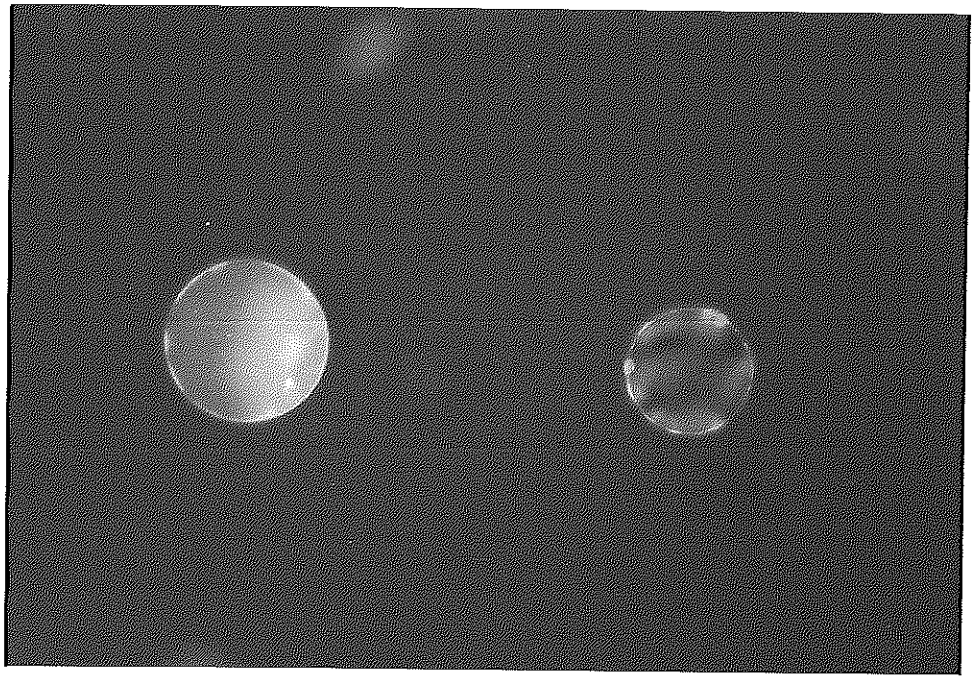
จากการศึกษาเรื่องสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้านั้น สรุปได้ว่าความเข้มข้นของซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์เป็นออสโมติคัมที่เหมาะสมที่สุด การอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสร่วมกับการเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น

สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสคือ 4 และไดรซีเลสคือ 5

ชนิด ความเข้มข้นและคอมบิเนชั่นของเอนไซม์ต่างๆตลอดจนเวลาที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้น พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเดี่ยวๆเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 7 ชั่วโมงสามารถย่อยให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 3.6×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ส่วนการศึกษาแหล่งโปรโตพลาสต์ พบว่าใบที่มีขนาดความยาว 1-3 เซ็นติเมตรเป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุด ในการนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงต่อไป

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้นั้น ก่อนนำไปศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ได้มีการตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ พบว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 โปรโตพลาสต์ที่ย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ เห็นการเรืองแสงสีเหลืองเขียว ซึ่งเป็น โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (x125)

3. สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

3.1 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร VW ที่มี 2,4-D เข้มข้น $2x10^{-6}$ โมลาร์ BA เข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^{4}$, $1x10^{5}$ และ$1x10^{6}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสงความเข้ม 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

โปรโตพลาสต์ทุกระดับความหนาแน่นที่เพาะเลี้ยงทั้งในที่มืด และที่มีแสงเป็นเวลา 1 วัน เมื่อสังเกตลักษณะโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ดพบว่ามีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่และยังมีชีวิต วันที่ 2 หลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ เม็ดคลอโรพลาสต์ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงและหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วันโปรโตพลาสต์จะแตกหมด แสดงว่าในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้าในที่มีแสงไม่เหมาะสมต่อการมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโต

ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 และ 2 วัน นำมาสังเกตลักษณะพบว่าทั้ง 3 จำนวน โปรโตพลาสต์ยังมีชีวิตและยังมีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์ที่มีจำนวนเริ่มต้น $1x10^{4}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรเริ่มจับเกาะกันเป็นกลุ่มบ้าง หรือลอยเดี่ยวๆในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อนำไปตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ ไม่พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์นำมาสังเกตลักษณะพบว่าเม็ดคลอโรพลาสต์ยังคงมีสีเขียว จากการนำไปตรวจสอบความมีชีวิตยังคงมีชีวิตแต่ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ เม็ดคลอโรพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจสอบความมีชีวิต ปรากฏว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่ตายทั้งหมด

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น พบว่า 1 สัปดาห์แรกหลังจากการเพาะเลี้ยง ให้ผลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แต่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ ลักษณะที่สังเกตเห็น โปรโตพลาสต์ยังคงมีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวและมีชีวิต มีการรวมกันเป็นกลุ่มๆล่องลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง แต่กลุ่มที่เกาะติดกันนี้ไม่ได้เกิดจากการแบ่งเซลล์ เพราะเมื่อนำไปตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 2-3 สัปดาห์ สังเกตลักษณะพบว่ายังเหมือนเดิมคือเป็นโปรโตพลาสต์ที่กลม มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่และเกาะกันเป็นกลุ่ม แต่ไม่มีการเจริญเติบโตใดๆ ทั้งสิ้นและตายในที่สุด

ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นมาก เกาะติดกันเป็นกลุ่มใหญ่ๆ มองเป็นแถบสีเขียวสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 วัน นำมาสังเกตลักษณะต่างๆ ให้ผลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนเริ่มต้น $1x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงไปอีก 3 วัน สังเกตเห็นโปรโตพลาสต์บางส่วนไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ มีเฉพาะเม็ดคลอโรพลาสต์เกาะกันเป็นกลุ่มๆบ้าง กระจายอยู่ในอาหารบ้างแต่ส่วนใหญ่ยังคงมีชีวิต หนึ่งสัปดาห์ต่อมาพบว่าโปรโตพลาสต์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มมองเห็นเป็นแถบสีเขียวนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเม็ดคลอโรพลาสต์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกและที่มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นำมาตรวจสอบความมีชีวิต พบว่ามีชีวิตไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการทดลองศึกษา สภาวะต่างๆในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เรื่องต่อๆไปจึงได้เลือกจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

3.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์จำนวนเริ่มต้น $1x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่มี 2,4-D เข้มข้น $2x10^{-6}$ โมลาร์ BA เข้มข้น $1x10^{-6}$ โมลาร์ และสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ โดยวิธีต่างๆในที่มีดให้ผลดังนี้

วิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 วัน โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่เกาะกันเป็นกลุ่มบ้าง ลอยเดี่ยวๆอยู่ในอาหารบ้าง เม็ดคลอโรพลาสต์มีสีเขียวเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตรอดถึง 2 สัปดาห์ แต่ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่

วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบหยด หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 วัน ลักษณะเหมือนการเพาะเลี้ยงวิธีที่ 1 ต่อมาอีก 2 วันหยดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ไม่คงรูปเป็นหยดแต่จะแบนราบไปกับก้นจานเลี้ยงเชื้อทำให้โปรโตพลาสต์แห้งและตายหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน

วิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 วัน โปรโตพลาสต์ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์เหลืออยู่เลย เป็นโปรโตพลาสต์ที่แตกทั้งหมด เห็นเม็ดคลอโรพลาสต์กระจายเต็มบนอาหารวุ้น

วิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน ลักษณะโปรโตพลาสต์กลม เต่ง มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ เม็ดคลอโรพลาสต์มีสีเขียว ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่เช่นกัน เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์อาหารค่อนข้างเหลว โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีชีวิต

ในการทดลองเรื่องชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อไป จึงได้เลือกใช้วิธีที่1 และวิธีที่ 4 ในการเพาะเลี้ยง

3.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

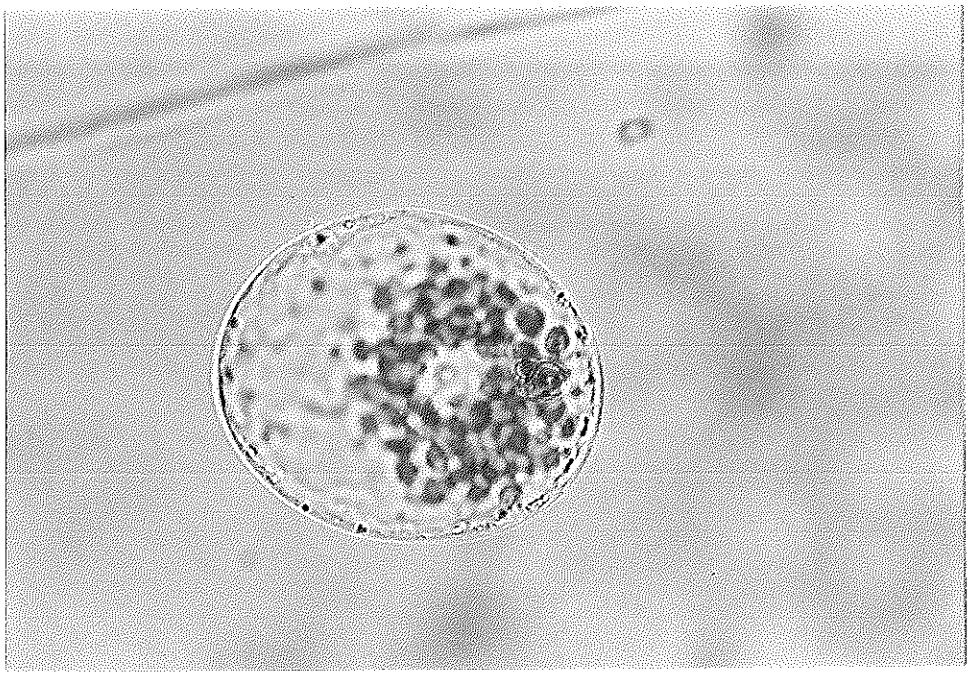
จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในอาหารทั้งหมด 12 สูตร ใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW,KC,B5 และ 1/2MS ที่มี 2,4-D เข้มข้น 0.44

มิลลิกรัมต่อลิตร, BA เข้มข้น 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตรและซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ให้ผลไม่แตกต่างกันคือเป็นโปรโตพลาสต์ที่กลมมีชีวิต แต่ยังไม่พบการสร้างผนังเซลล์

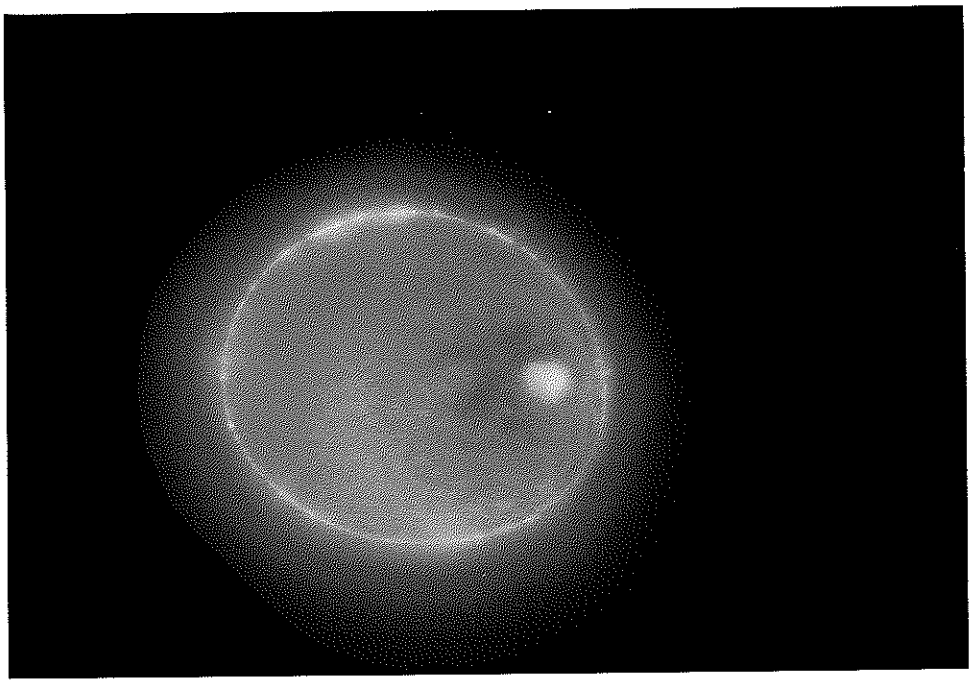
หนึ่งสัปดาห์ต่อมาโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KC และ 1/2MS คลอโรพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งเป็นโปรโตพลาสต์ที่ตาย ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW และ B5 ยังคงมีชีวิตรอดถึง 2 สัปดาห์ โดยเฉพาะอาหารสูตร B5 โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดถึง 3 สัปดาห์แต่ไม่มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ จึงได้เลือกเอาอาหารสูตร B5 มาทดลองเพาะเลี้ยงโดยแทนที่น้ำตาลซอร์บิทอลด้วยน้ำตาลต่างๆ ได้แก่แมนนิทอล กลูโคส ซูโครสและมอลโตส ที่ระดับออสโมลาริตี้เท่ากันก็ไม่พบการเจริญเติบโตและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์เช่นกัน โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.7 โมลาร์ มีอายุได้ 3 วันหลังจากการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารที่เติมน้ำตาลอื่นๆให้ผลไม่แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซอร์บิทอล

โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ BA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน นำมาตรวจสอบพบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีชีวิต บางโปรโตพลาสต์เริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ครึ่งเดียว บางโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้เต็มเซลล์ (รูปที่ 18,19) สังเกตการเรืองแสงของผนังเซลล์ได้ชัดเจนเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 7 วัน ไม่พบการแบ่งตัวของเซลล์ แต่สามารถมีชีวิตรอดต่อไปได้ถึง 2-3 สัปดาห์

เมื่อเปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตของอาหารสูตร NT เป็น 2,4-D กับ KIN, 2,4-D กับ Zeatin และ NAA กับ BAเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์เท่ากัน หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีชีวิตรอดได้ 7 วันเท่านั้น



รูปที่ 18 โปรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (x165)



รูปที่ 19 โปรโตพลาสต์ในรูปที่ 18 เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอร์ไวท์ แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ เห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงแหวนรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (x165)

3.4 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบที่ผ่านการทรีตด้วยกรดแอบซิสซิก

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่ผ่านการแช่ในสารละลายที่มีกรดแอบ-ซิสซิกเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ BA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วันไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่และการแบ่งเซลล์เลย โปรโตพลาสต์มีชีวิตได้ 7 วันก็ตาย

จากการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ BA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์เหมาะสมที่สุด โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่ในเวลา 3 วันหลังจากการเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปไม่พบการแบ่งตัว ส่วนการทรีตใบด้วยกรดแอบซิสซิกเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์นั้น แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรข้างต้นไม่พบการสร้างผนังเซลล์หรือการแบ่งตัวใดๆ

บทวิจารณ์

1.การเพาะเลี้ยงตากล้วยไม้

ชิ้นส่วนตากล้วยไม้ที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้น มี 2 ชนิดคือตายอดและตาข้าง หลังจากเพาะเลี้ยงตาบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1 เดือนตาขยายขนาดโตขึ้นเป็นรูปครึ่งทรงกลม ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Kunisakiและคณะ (1972) เมื่อต้องการชักนำโปรโตคอร์ม ย้ายเลี้ยงตานี้ลงอาหารเหลวสูตรเดิมที่มีการเขย่าตลอดเวลา ในระยะนี้ต้องฉีกใบอ่อนที่หุ้มตาพร้อมทั้งตัดยอดออก เพื่อทำลายสมดุลย์ของฮอร์โมนทำให้ชิ้นส่วนของตาพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม ถ้าไม่ฉีกใบเลี้ยงและตัดยอดออก ตาจะพัฒนาเป็นต้นกล้วยไม้ ทำให้ได้ต้นกล้วยไม้ 1 ต้นเท่านั้น โปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นถ้าตัดแบ่งเป็นส่วนๆแล้วย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่สามารถเจริญเป็นโปรโตคอร์มได้อีก (Amaki and Higushi,1989) เมื่อย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารแข็งจะพัฒนาเป็นต้นพืช แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการดิฟเฟอเรนทิเอชั่นของโปรโตคอร์ม ในตอนแรกเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาบนอาหารแข็งก่อน เพื่อให้ชิ้นส่วนตามีการเจริญเติบโตระยะหนึ่งก่อนแล้วย้ายเลี้ยงลงอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงตาในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลาทำให้ตาสูญเสีย polarity ขณะเดียวกันได้รับอาหารและอากาศตลอดเวลา ทำให้เซลล์เจริญเติบโตขยายขนาดและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ เนื่องจากสูญเสีย polarity นั่นเอง (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2523) เมื่อย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารแข็ง แต่ละโปรโตคอร์มจะพัฒนาเป็นต้นพืชได้

การทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้สูตรอาหาร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์และไม่เติมน้ำตาลซูโครส เนื่องจาก Intuwong และ Sagawa, 1973 พบว่าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสม 3 ชนิด ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวและน้ำตาลซูโครสมีสีเหลือง-น้ำตาล ซึ่งสอด

คล้องกับผลการทดลองของ Teo และคณะ (1973) ที่เพาะเลี้ยงตาของกล้วยไม้แวนด้าในอาหารสูตรเดียวกันและได้โปรโตคอร์มที่มีสีน้ำตาลเช่นกัน ต่อมา Teo และ Wong (1978) ศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Holtumara* พบว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสมีสีเหลืองอ่อนเช่นกันเทียบกับโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีน้ำตาลจะมีสีเขียว ดำนูณ กาญจนภูมิ (2519) อ้างถึง Puhan และ Martin (1970)ว่าการเติมน้ำมะ-พร้าวและน้ำตาลซูโครสพร้อมกันในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากอาจเกิดสารพิษจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับน้ำมะพร้าวและสารอื่น ขณะที่นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง (121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซ็นติเมตร)

2.สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

2.1 ระดับออสโมลาริตี้

ในการแยกโปรโตพลาสต์ ระดับออสโมลาริตี้ของสารละลายเอนไซม์มีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีผนังเซลล์ การเลือกระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมเป็นการป้องกันไม่ให้โปรโตพลาสต์หดหรือแตกในระหว่างการย่อย ระดับออสโมลาริตี้ที่สูงเกินไปหรือต่ำเกินไปมีผลเสียคืออาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์เสียหายจนไม่สามารถฟื้นกลับคืนสู่สภาพเดิม (recovery) อย่างเก่าได้

ในการศึกษาระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์กล้วยไม้นั้น ได้เลือกใช้น้ำตาลซอร์บิทอลเป็นสารออสโมติคัม เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอลไม่สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ จึงไม่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Eriksson,1977;Evans and Cocking,1977) Fitter และ Kriko-rian (ม.ป.ป.) กล่าวว่าก่อนแยกโปรโตพลาสต์ถ้านำแหล่งโปรโตพลาสต์ไปแช่ในสารละลายออสโมติคัมที่ไม่มีเอนไซม์ แต่มีระดับออสโมลาริตี้เท่ากับหรือสูงกว่าระดับออสโมลาริตี้ของสารละลายเอนไซม์เป็นเวลาระยะหนึ่งก่อน แล้วนำไปแยก

โปรโตพลาสต์ทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่แข็งแรงและมีจำนวนมากเพิ่มขึ้นด้วย

จากการทดลองออสโมลาริตี้ในระดับ 0.5,0.7และ0.9 โมลาร์ พบว่า ที่ระดับออสโมลาริตี้ที่สูงเกินไปคือ 0.9 โมลาร์ มีผลทำให้โปรโตพลาสต์เสียลักษณะกลม Sajise และ Sagawa (1991) กล่าวว่าระดับออสโมลาริตี้ที่สูงทำให้โปรโตพลาสต์เกิดพลาสโมไลซีสจนไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้และตายในที่สุด พวกเขาพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสฟาแลนด์น็อฟซิส ในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ไม่สามารถคืนกลับสู่สภาพเดิมได้เลยและสังเกตพบอีกคือโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสจะแตกถ้าอยู่ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของแมนนิทอลหรือซอร์-บิทอลต่ำกว่า 0.4 โมลาร์ Ruesink (1977) อ้างโดย Dan และ Stephen (1991) กล่าวว่าระดับออสโมลาริตี้ที่สูงเกินไปทำให้เมแทบอลิซึมและการเติบโตของโปรโตพลาสต์เสียไป เนื่องจากการนำกรดอะมิโนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นผลให้การสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ลดลงด้วย

ส่วนออสโมลาริตี้ที่ระดับ 0.5 โมลาร์นั้น ลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ได้กลมและเต่ง แต่มีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แตกมาก เนื่องจากมีการแพร่ของน้ำเข้าสู่โปรโตพลาสต์มากจนโปรโตพลาสต์แตก (burst) (Evans and Bravo, 1983) ดังนั้นที่ความเข้มข้นของสารละลายซอร์บิทอล 0.7 โมลาร์จึงเหมาะสมที่สุด ได้โปรโตพลาสต์ที่กลม เต่งและไม่แตกมาก

ในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปแล้วจะต้องเติมสารแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายเอนไซม์และในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย เนื่องจากแคลเซียมเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ช่วยสร้างความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แตกง่าย (Gamborg,1986) จากการทดลองนี้ได้เติมแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณ 10 มิลลิโมลาร์ลงในสารละลายเอนไซม์และในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตกมากเกินไป แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์มากเกินไปมีรายงานว่า ไม่เพียงแต่ยับยั้งการฟอร์มตัวของโปรโตพลาสต์ ยังมีผลทำให้เนื้อเยื่อของพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลด้วย(Shekhawat and Galston,1983) Koh และคณะ (1988) พบว่าโปรโตพลาสต์จากใบ

อะแรนด้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงให้เปอร์เซ็นต์การฟื้นกลับคืนสู่สภาพเดิมของโปรโตพลาสต์ 17 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ขณะที่โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ให้เปอร์เซ็นต์การกลับคืนสู่สภาพเดิมคือ 55 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์ ควรเติมแคลเซียมคลอลอไรด์ลงในสารละลายเอนไซม์และวอชชิ่งโซลูชั่นด้วย เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตกมากเกินไป แต่ไม่ควรเติมในปริมาณที่สูงเพราะจะทำให้การฟื้นกลับคืนสู่สภาพเดิมของโปรโตพลาสต์ลดลง

2.2 สภาวะการอินคูเบชั่น

ในการแยกโปรโตพลาสต์ สภาวะการอินคูเบชั่นของสารละลายเอนไซม์มีความสำคัญเช่นกัน เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งต้องมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งอาจทำให้ย่อยผนังเซลล์ได้ช้าหรือน้อย ส่งผลให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปก็มีผลเสียคือทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ (denature) ได้

จากการทดลองการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถย่อยผนังเซลล์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่า แสดงว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจำเพาะของบริษัท Yakult Honsha Co.,Ltd.

นอกจากอุณหภูมิแล้ว การเขย่าเบาๆประมาณ 30-40 รอบต่อนาที พบว่าช่วยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์หลุดออกมามากขึ้น เนื่องจากการเขย่าทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของเนื้อเยื่อใบ ทำให้โปรโตพลาสต์ซึ่งถูกเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์หมดแล้วหลุดออกมาจากเนื้อเยื่อของใบได้ง่ายขึ้น แต่ถ้าเขย่าด้วยความเร็วสูงเกินไป เช่นมากกว่า 60 รอบต่อนาที ก็มีผลเสียคือแรงกระแทกที่เกิดขึ้นจะทำให้โปรโตพลาสต์แตกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากครบกำหนดเวลาของการ

อินคูเบชั่นแล้ว ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ขึ้นลงหลายครั้ง ช่วยให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเนื้อเยื่อของใบมากขึ้น

จากผลการทดลองจะเห็นว่า จำนวนโปรโตพลาสต์จากสารละลายเอนไซม์ที่นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสร่วมกับการเขย่า 40 รอบต่อนาทีนั้น ให้โปรโตพลาสต์ออกมาเป็นจำนวนมากกว่าการนำไปอินคูเบทที่ไม่มีการเขย่า เมื่อใช้อุณหภูมิ เวลา เดียวกัน

Fitter และ Krikorian (ม.ป.ป.)พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ รากและกลีบดอกของ daylily ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสโดยไม่มีการเขย่าจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มาก แต่ถ้าแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยต้องเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาทีและการใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ขึ้นลงหลายๆครั้ง เป็นการทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์จำนวนเพิ่มขึ้นเช่นกัน

2.3 ระดับพีเอช

การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ นอกจากขึ้นกับอุณหภูมิแล้วยังขึ้นกับพีเอชด้วย ระดับพีเอชที่ไม่เหมาะสมมีผลทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลงเช่นกัน จากการทดลองพบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสคือ 4.0 ส่วนเอนไซม์ไดรซีเลสคือ 5.0 ซึ่งตรงกับข้อมูลจำเพาะของบริษัทที่ผลิตเอนไซม์คือ Yakult Honsha Co.,Ltd. และ Kyowa Hakko Co.,Ltd.ตามลำดับ

2.4 ชนิด ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของเอนไซม์และคอมบิเนชั่นต่างๆ

ปัจจุบันนี้มีเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้ในการย่อยโปรโตพลาสต์ ที่นิยมใช้กันมากคือเซลลูเลส ไดรซีเลสและคอมบิเนชั่นของกลุ่มเซลลูเลสกับกลุ่มเพกติเนส (Eriksson,1977) จากการทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์-เซ็นต์ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองของ Nagata

และ Takebe (1970) ที่แยกโปรโตพลาสต์จากใบของยาสูบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ CLA 623 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากเช่นกัน ส่วนเอนไซม์ไดรซีเลสพบว่าความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย่อยโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shekhawat และ Galston (1983) ที่ใช้ไดรซีเลสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบ moth bean ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก เขากล่าวว่าเอนไซม์ไดรซีเลสที่หยาบ (crude enzyme) นั้น เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อใบและโปรโตพลาสต์ ดังนั้นก่อนแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องทำให้เอนไซม์นั้นบริสุทธิ์เสียก่อน ส่วน Boss และคณะ (1984)ใช้ไดรซีเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในการย่อยเซลล์แขวนลอยแครอท Loh และ Roa (1985) และ Koh และคณะ (1988) พบว่าการเติมไดรซีเลสร่วมกับเซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้า เป็นการเพิ่มจำนวนโปรโตพลาสต์เช่นกัน จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าการใช้เอนไซม์ไดรซีเลสที่ความเข้มข้นสูงคือ 3 เปอร์เซ็นต์ได้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยที่สุดและยิ่งเวลาอินคูเบชั่นนานขึ้นคือ 9 และ 11 ชั่วโมงไม่พบโปรโตพลาสต์เลย เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์สูงๆและการอินคูเบชั่นนานเกินไป ทำให้เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ โดยทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย (Theodoropoulos and Roubelakis - Angelakis,1990)

สำหรับคอมบิเนชั่นของเอนไซม์ที่ใช้ พบว่าคอมบิเนชั่นของเซลลูเลสและเพกติเนสกับคอมบิเนชั่นของไดรซีเลสและเพกติเนสอย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 11 ชั่วโมง ย่อยได้โปรโตพลาสต์จำนวนไม่แตกต่างกัน ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อพืชเช่นใบ ราก เอนไซม์กลุ่มเพกติเนสมีบทบาทสำคัญยิ่ง เนื่องจากเซลล์ของพืชที่เจริญเติบโตสมบูรณ์จะมีการสร้างเพกตินมาพอกไว้ระหว่างเซลล์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์ ทำให้เอนไซม์ทำงานลำบากขึ้น ดังนั้นการเติมเพกติเนสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นแล้ว ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น เป็นเพราะเกิดการทำงานของเอนไซม์ 2 ขั้นตอนคือ ตอนแรกเพกติเนสย่อยสารเพกตินตรงมิดเดิ้ลลาเมลล่า (middle lamella) เพื่อแยกเซลล์ให้หลุดออกจากกัน จากนั้นขั้นตอนที่สองเอนไซม์ชนิดอื่นเช่นไดรซีเลสหรือเซลลูเลสจะย่อย

ผนังเซลล์จนได้โปรโตพลาสต์หลุดออกมา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wallin และ Johansson (1989) ที่แยกโปรโตพลาสต์จากใบแอปเปิ้ล พบว่าการเติมเพกโตไลเอสวาย 23 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเพกติเนสนั้น นอกจากจะเพิ่มจำนวนโปรโตพลาสต์แล้วยังเพิ่มสัดส่วนของโปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์ด้วย

แต่จากการทดลองนี้ จะเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเดียวนั้นย่อยโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากกว่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่สูงเกินไปของเพกติเนสที่ทดลองใช้คือ 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรโตพลาสต์เสียหายได้ (Wallin and Johansson,1989;Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis,1990) จำนวนโปรโตพลาสต์จึงลดลง

2.5 แหล่งโปรโตพลาสต์

ในการที่จะเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น การเลือกใช้แหล่งโปรโตพลาสต์เป็นเรื่องสำคัญ แหล่งโปรโตพลาสต์ที่ดีควรเป็นแหล่งที่ให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเป็นจำนวนมาก มีความแข็งแรงไม่แตกง่าย ทนทานอยู่ในสารละลายเอนไซม์ได้ดี มีไซโทพลาซึมหนาแน่น แวคิวโอลน้อยสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration)ได้ดี

จากการทดลองนี้ ได้เลือกใช้แหล่งโปรโตพลาสต์ 3 แหล่ง คือราก ใบ และโปรโตคอร์ม พบว่าใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด รองลงมาคือราก ส่วนโปรโตคอร์มให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยที่สุด Teo and Nemann,1978 ได้เลือกโปรโตคอร์มเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตคอร์มเป็นเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต เมื่อนำมาแยกโปรโตพลาสต์ทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่กำลังเจริญเติบโต มีความสามารถในการเจริญใหม่ได้ดี แต่จากการทดลองนี้ไม่สามารถใช้โปรโตพลาสต์จากโปรโตคอร์มมาเพาะเลี้ยงได้ เนื่องจากมีจำนวนน้อยมาก

สำหรับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบ ส่วนใหญ่มีแวคิวโอลขนาดใหญ่และคลอโรพลาสต์มักจะรวมกันเป็นกลุ่มแยกจากแวคิวโอล (รูปที่ 12 และ14) นอกจากนี้ การย่อยโปรโตพลาสต์จากใบมีเศษเซลล์ต่างๆมากเช่นเซลล์สะสมผลึก (idioblast cell) (ภาพที่ 16) ที่เกิดจากการสะสมของเสียจากขบวนการ

เมแทบอลิซึมของเซลล์ idioblast cell เป็นเซลล์พิเศษที่ต่างจากเซลล์อื่นๆ คือภายในสะสมสารแคลเซียมออกซาเลต ในรูปของผลึกต่างๆหลายแบบเช่นผลึกรูปเข็ม (raphide) รูปดอกกุหลาบ (rosette) รูปปริซึม (prismatic) (Fahn,1982) การทดลองของ Teo และNeumann (1978); Price และ Earle (1984); Loh และ Rao(1985);Sajise และคณะ (ม.ป.ป.)ก็พบปัญหานี้เช่นกัน เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากใบที่มีความยาว 1-3 เซ็นติเมตรเทียบกับใบที่มีความยาวมากกว่า 3 เซ็นติเมตรพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีความยาวมากกว่า 3 เซ็นติเมตรมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ เนื่องจากเป็นใบแก่จึงมีแวคิวโอลขนาดใหญ่สำหรับสะสมของเสียภายในเซลล์มาก ไม่เหมาะแก่การนำไปเพาะเลี้ยง Sajise และคณะ (ม.ป.ป.) กล่าวว่าการใช้ชิ้นส่วนของพืชที่โตสมบูรณ์ ซึ่งมีระยะพัฒนาการแตกต่างกันมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ ทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีความแตกต่างกันในระยะพัฒนาการด้วย ซึ่งเป็นโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีลักษณะเหมือนกัน (heterogenous) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจะมีการเจริญเติบโตไม่พร้อมกัน นอกจากนี้เซลล์ของพืชที่โตสมบูรณ์แล้วจะมีการสะสมของเสียไว้ในเซลล์มาก เช่นผลึกรูปเข็ม และผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เช่นเม็ดแป้ง เช่นเดียวกับแคลลัสที่แก่มีเม็ดแป้งสะสมไว้ในเซลล์มากเช่นกัน ซึ่งสิ่งเหล่านี้กำจัดออกไปจากเซลล์ได้ยาก และมีผลเสียต่อโปรโตพลาสต์ที่นำไปเพาะเลี้ยง พวกเขาสรุปว่าโปรโตพลาสต์ที่นำมาเพาะเลี้ยงแล้วสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้นั้น ควรเลือกแหล่งโปรโตพลาสต์จากแคลลัสที่มีลักษณะเป็นก้อนเซลล์เกาะกันหลวมๆ ส่วนจารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2534) กล่าวว่าการเลือกใช้โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะเซลล์เมอริสเต็มไปเพาะเลี้ยง สามารถแบ่งเซลล์ได้ Theodoropoulos และ Roubelakis - Angelakis(1990) พบว่าอายุของใบมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ด้วย

ก่อนนำโปรโตพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงได้มีการตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ปรากฏว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต 99 เปอร์เซ็นต์ โมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต ซึ่งมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterase)ตัดโมเลกุลของ

ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ได้ฟลูออเรสซีน (fluorescein) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตร้าไวโอเล็ตจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว (รูปที่ 17)

3.สภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

3.1 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้ประสบผลสำเร็จนั้น ขึ้นกับปัจจัยหลายๆอย่าง จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตต่อไปของโปรโตพลาสต์ จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้หลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 1 สัปดาห์เนื่องจากมีจำนวนน้อยเกินไป Kao และ Michayluk (1975) กล่าวว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือโปรโตพลาสต์ของพืช ควรใช้จำนวนเซลล์หรือโปรโตพลาสต์เริ่มต้น $1x10^5$ เซลล์หรือโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2535) กล่าวว่าเนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงแต่ละโปรโตพลาสต์ปล่อยสารพวกเมแทบอไลต์ (metabolite) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงและสารนี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน หากมีจำนวนโปรโตพลาสต์น้อยเกินไปทำให้มีสารเหล่านี้น้อย ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของโปรโต-พลาสต์ ตรงข้ามกับการทดลองของ Jaiswall และคณะ (1990) ที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของ *Brassica carinata* โดยใช้จำนวนเริ่มต้น $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์เจริญเติบโตได้ดีที่สุด และ Sidikou-Seyniและคณะ (1992) พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบ *Cichorium sp* โดยใช้จำนวนเริ่มต้น $2.5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เจริญได้ดีที่สุด

จากการทดลองนี้ ปรากฏว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์สามารถมีชีวิตรอดได้ประมาณ 2 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการ

ทดลองของ Pupilli และคณะ (1990) ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์ของ *Lotus sp* ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วจำนวน $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ทำให้โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และมีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้ดีกว่าการใช้จำนวนเริ่มต้น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ส่วนการทดลองที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นั้น โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้ 1 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยงเท่านั้น อาจเนื่องจากโปรโตพลาสต์มีความหนาแน่นมากเกินไป ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองของ Theodoropoulos และ Roubelakis - Angelakis(1990) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น ใช้จำนวนเริ่มต้นที่สูงคือ $1x10^6$ โปรโต-พลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์เจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^5$โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Wallin และ Johansson (1989) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบแอปเปิ้ลใช้จำนวนเริ่มต้น $2x10^6$ โปร-โตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งตัวได้ 12 เปอร์เซ็นต์

3.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทั้ง 4 วิธี พบว่าโปรโต-พลาสต์มีชีวิตรอดได้นานที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและกึ่งแข็งกึ่งเหลว เนื่องจากทั้งสองวิธีนี้ โมเลกุลของอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ทันที ทำให้ไม่ขาดแคลนสารอาหารและสามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yan-Xiu และคณะ (1991) ที่รายงานว่าโปรโตพลาสต์ของชะบาจีน (*Hibiscus syriacus*) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเกิดการแบ่งเซลล์ได้ 64 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธีอื่นๆ โดยทั่วไปแล้วมักนิยมเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวก่อน (Nagata and Takebe, 1971; Price and Earle,1984; Loh and Rao,1985; Koh *et al*, 1988) เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์แล้ว จึงย้ายเลี้ยงลงอาหารแข็ง

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบหยดนั้น เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 วัน โปรโตพลาสต์รวมตัวกันเป็นกลุ่มอยู่ตรงกลางของหยดอาหาร วันที่สองหยดของอาหารไม่สามารถคงรูปเป็นหยดอยู่ได้ แต่จะแบนราบไปกับจานเลี้ยงเชื้อซึ่งทำให้โปรโตพลาสต์แห้ง คลอโรพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเวลาต่อมาและตายหลังจากที่เพาะเลี้ยงได้ 3 วัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Yan-Xiu และคณะ (1991) แต่ตรงข้ามกับ Grambow และคณะ (1972) และShekhawat และ Galston (1983) ที่สามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์แครอทและ moth bean ตามลำดับได้สำเร็จโดยวิธีนี้

ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์แตกเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากสูญเสียออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) ประกอบกับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบนั้น มักมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่บางและแตกง่าย นอกจากนี้บางโปรโตพลาสต์ที่ไม่แตกแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากโมเลกุลของสารอาหารถูกยึดเกาะอยู่กับวุ้น แพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ยาก โปรโตพลาสต์จึงขาดสารอาหารและตายได้

3.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ อาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของโปรโตพลาสต์ จากการทดลองพบว่าโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆนั้นมีชีวิตรอดได้นานที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 รองลงมาคือสูตร VW แต่ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ในอาหารทั้งสองสูตร ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KC และ 1/2MS นั้น มีชีวิตรอดได้เพียงหนึ่งสัปดาห์เท่านั้น

สูตรอาหาร B5 เป็นสูตรอาหารที่มีความสมบูรณ์ของธาตุอาหารต่างๆมาก (enriched media) เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อย่างยิ่ง ซึ่ง Price และ Earle (1984)ได้เลือกอาหารสูตรนี้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้หลายสกุล แต่ไม่ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกับการทดลองนี้

ขณะที่ Simmonds และคณะ (1991) พบว่าโปรโตพลาสต์ *Brassica napus* พัฒนาเป็นต้นได้ดีเมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 แสดงว่าอาหารสูตรนี้ไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ แต่เพราะความสมบูรณ์ของอาหารจึงช่วยให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้นานกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอื่นๆ จึงได้เลือกอาหารสูตรนี้ทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป โดยเปลี่ยนชนิดของสารออสโมติคัมจากซอร์บิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ เป็นน้ำตาลโมเลกุลเชิงเดี่ยวคือกลูโคสและน้ำตาลโมเลกุลเชิงคู่คือมอลโตสกับซูโครส ที่ระดับออสโมลาริตี้เท่ากัน พบว่าให้ผลไม่ต่างกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซอร์บิทอล แสดงว่าน้ำตาลเหล่านี้ไม่มีส่วนช่วยให้โปรโตพลาสต์อะแรนด้าเจริญเติบโตได้ ยกเว้นซูโครสที่กลับทำให้โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีชีวิตรอดได้ 3 วันหลังจากการเพาะเลี้ยงเท่านั้น อาจเนื่องจากเกิดสารพิษจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ (คำนูณ กาญจนภูมิ,2519) Kao และ Michayluk (1974) รายงานผลการเปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ 3 ชนิด พบว่าโปรโตพลาสต์ soybean แบ่งตัวได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสผสมน้ำตาลกลูโคส โปรโตพลาสต์ *Vicia hajastana* แบ่งเซลล์ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสอย่างเดียว ส่วนโปรโตพลาสต์ bromegrass แบ่งเซลล์ได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสอย่างเดียว แสดงว่าพืชแต่ละชนิดเลือกใช้น้ำตาลต่างชนิดกันด้วย

ส่วนอาหารสูตร VW นั้นเป็นอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ทุกชนิด แม้แต่ต้นกล้วยไม้อะแรนด้าซึ่งจากการทดลองก็เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้เช่นกัน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไม่พบการพัฒนาใดๆ ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองของ Sajise และ Sagawa (1991) ใช้อาหารสูตร VW ดัดแปลงเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ฟาแลนด์น๊อฟซิสสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและโปรโตคอร์มได้

ส่วนสูตรอาหาร KC และ 1/2MS นั้น โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีชีวิตรอดได้ 1 สัปดาห์ อาจเนื่องจากสูตรอาหาร 1/2MS นั้นมีความเข้มข้นของเกลือต่างๆมากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ สำหรับสูตรอาหาร KC

นั้นเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เช่นกัน Teo และ Neumann (1978) ได้เลือกอาหารสูตรนี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เรแนนแทนด้า สามารถแบ่งเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสหรือโปรโตคอร์มได้

เมื่อนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NT ซึ่ง Nagata และ Takebe (1970) ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบยาสูบได้สำเร็จ ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์อะแรนด้าสร้างผนังเซลล์ใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์และการพัฒนาอื่นๆ การตรวจสอบผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ทำได้โดยย้อมสีแคลคอฟลอร์ไวท์ ซึ่งจะจับกับผนังเซลล์ที่ตำแหน่ง β-linkage glucoside เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตร้าไวโอเล็ตจะเรืองแสงออกมาเป็นวงแหวนรอบเยื่อหุ้มเซลล์

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้อะแรนด้าในอาหารสูตร NT แล้วสามารถสร้างผนังเซลล์ได้ อาจเป็นเพราะองค์ประกอบของอาหารสูตร NT ต่างไปจากสูตรอื่นในเรื่องของแอมโมเนียมไอออน(NH_4^+), แคลเซียม, อินอซิทอล, ไธอะมีนและออสโมลาริตี้ที่ใช้ กล่าวคือในอาหารสูตร NT ไม่มีไอออนแอมโมเนียม ถาวร วัชราภัย (ติดต่อส่วนตัว) กล่าวว่าพวกกล้วยไม้โมโนโพเดียม เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความไวต่อความเข้มข้นของน้ำตาลและแอมโมเนียมสูง George และคณะ(1988) กล่าวว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่สูงเกินไปในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เนื้อเยื่อพืชเป็นแก้วใสหรือฉ่ำน้ำ (vitrescent)

ปริมาณแคลเซียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชโดยทั่วไปนั้น ใช้ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่มิลลิโมลาร์ลงมา แต่สำหรับโปรโตพลาสต์แล้วต้องการใช้แคลเซียม 0.1 ไมโครโมลาร์เท่านั้น แคลเซียมมีสมบัติที่สำคัญคือเป็นตัวเชื่อมสารชีวโมเลกุลเข้าด้วยกัน ซึ่งรวมถึงโครงสร้างและสมบัติทางสรีระของเยื่อหุ้มเซลล์และมิดเดิ้ลลาเมลล่าของผนังเซลล์ด้วยคือทำให้เซลล์แข็งแรงนั่นเอง โปรโตพลาสต์จะเก็บแคลเซียมที่มีปริมาณมากในอาหารเพาะเลี้ยงไว้ในแวคิวโอล และผนังเซลล์ ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ อาหารสูตร NT มีการเติมปริมาณแคลเซียมที่สูงคือ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ แต่ Mitra และคณะ(1976)อ้างโดย George และคณะ

(1988) พบว่าแคลลัสของ *Dendrobium fibriatum* พัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้น้อยในอาหารที่ไม่มีแคลเซียม

อินอซิทอลซึ่งเป็นวิตามินชนิดหนึ่ง มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เนื่องจากเป็นตัวกลางที่สำคัญในวิถีเมแทบอลิซึมต่างๆของพืช ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพืชที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้เป็นตัวกลางในวิถีการสร้างสารต่างๆที่จำเป็นเช่นกรดแอสคอบิกและเพกติน ซึ่งมีบทบาทในการช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์ Lethan(1966) อ้างโดย George และคณะ (1988)รายงานว่าอินอซิทอลร่วมกับไซโทไคนินส่งเสริมให้เนื้อเยื่อลำเลียงของแครอทแบ่งเซลล์ได้

ส่วนไธอะมีนนั้น เป็นวิตามินที่สำคัญที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีบทบาทสำคัญคือเป็นโคแฟกเตอร์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด ปฏิกิริยาระหว่างไธอะมีนกับไซโทไคนินมีส่วนช่วยให้พืชเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ Nagata และ Takebe (1970)รายงานว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอินอซิทอลและไธอะมีนแบ่งเซลล์ได้น้อยและไม่แข็งแรง

เมื่อพิจารณาถึงออสโมลาริตี้ที่ใช้ในสูตรอาหาร NT พบว่าเป็น 0.4 โมลาร์ ซึ่งต่างจากที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 0.7 โมลาร์ ก็อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โปรโตพลาสต์อะแรนด้าเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ เพราะความเข้มข้นของสารออสโมติคัมสูงเกินไป นอกจากทำให้โปรโตพลาสต์เสียหายแล้ว (Evans and Bravo,1983) ยังยับยั้งการแบ่งเซลล์ด้วย (Wallin and Eriksson, 1973)

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ออกซินและไซโทไคนินมีส่วนสำคัญในการชักนำการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ จากการทดลองนี้ พบว่าโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ในอาหารที่มีออกซินคือ 2,4-D และไซโทไคนินคือ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้า สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ แต่ไม่เกิดการแบ่งเซลล์ เนื่องจากมีปัจจัยหลายๆอย่างที่มี

ผลต่อการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้แก่ จีโนไทป์ของพืช, อาหารเพาะเลี้ยง, สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง,แหล่งโปรโตพลาสต์ ซึ่ง Evans และ Bravo (1983) กล่าวว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการแบ่งเซลล์ได้เร็วกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ นอกจากนี้อายุและการดูแลต้นแม่ที่ใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ ล้วนมีผลต่อการเจริญต่อไปของโปรโตพลาสต์ทั้งสิ้น

3.4 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบที่ผ่านการทรีตด้วยกรดแอบซิสซิก

จากการทดลองทรีตชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ด้วยกรดแอบซิสซิก ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์นั้น ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์ที่ได้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NT ไม่สามารถมีชีวิตรอดและสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองของ Wallin และ Johansson (1989) ที่พบว่าโปรโตพลาสต์จากใบแอบเปิ้ลที่ผ่านการทรีตดังกล่าวข้างต้น เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงให้จำนวนการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น 15 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าพืชต่างชนิดกันมีการตอบสนองต่อการทรีตด้วยกรดแอบซิสซิกต่างกัน สำหรับอะแรนด้าควรมีการศึกษาการทรีตด้วยสารอื่นหรือวิธีอื่นต่อไป

บทสรุป

1. การเพาะเลี้ยงตากล้วยไม้อะแรนด้า บนอาหารแข็งสูตร VW ตาพัฒนาเป็นรูปโดมหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 เดือนเมื่อฉีกใบหุ้มตาและตัดยอดออกแล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ตาจะพัฒนาเป็นเป็นโปรโตคอร์มในเวลา 1-2 เดือน เมื่อย้ายเลี้ยงโปรโตคอร์มลงบนอาหารแข็งอีกครั้งสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ในเวลา 2-3 เดือน

2. ระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสม สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้าคือซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.7 โมลาร์

3. ระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไดรซีเลส คือ 4.0 และ 5.0 ตามลำดับ

4. สภาวะการอินคูเบชั่นในการแยกเพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากคือการนำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมการเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที

5. ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่างๆในการย่อยโปรโตพลาสต์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 7 ชั่วโมงย่อยให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด ส่วนคอมบิเนชั่นของเอนไซม์นั้น พบว่าคอมบิเนชั่นของไดรซีเลสและเพกติเนสเข้มข้นอย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 11 ชั่วโมง ย่อยให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

6. ชิ้นส่วนของอะแรนด้าที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือใบ รองลงมาคือราก ส่วนโปรโตคอร์มให้จำนวนน้อยที่สุด

7. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ BA ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในที่มืด โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ในเวลา 3 วัน แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์

8. การทรีตแหล่งโปรโตพลาสต์ ด้วยกรดแอบซิสซิกเข้มข้น 1×10^{-4} โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงตามช้างต้น พบว่าโปรโตพลาสต์ไม่มีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งตัว

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้อะแรนด้า ให้ประสบผลสำเร็จต่อไป มีข้อเสนอแนะดังนี้

1. ควรใช้ใบมีดผ่าใบกล้วยไม้ตามความยาวของใบ แล้วนำด้านที่มีรอยแผลไปคว่ำลงในสารละลายเอนไซม์ วิธีนี้นอกจากทำให้สังเกตโปรโตพลาสต์ที่หลุดออกมาแยกออกจากชิ้นส่วนใบพืชชัดเจนแล้ว ยังทำให้เกิดเศษเซลล์และการแตกของเซลล์ที่สะสมผลึกรูปเข็มน้อยกว่าวิธีที่ใช้ใบมีดหั่นใบกล้วยไม้ละเอียดเป็นฝอย

2. การทำความสะอาดโปรโตพลาสต์ โดยวิธีการลอยตัวนั้น ทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่สะอาด แต่มีข้อควรระวังคือไม่ควรใช้ความเข้มข้นของชูโครสที่แตกต่างไปจากสารละลายวอชชิ่งโซลูชั่น หรืออาหารเพาะเลี้ยงมากเกินไป เพราะจะทำให้โปรโตพลาสต์เกิดออสโมติกช็อก (osmotic shock) ได้ ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อการเพาะเลี้ยง ควรใช้ความเข้มข้นของชูโครสสูงกว่าความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงประมาณ 0.1 โมลาร์เท่านั้น

3. องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ไม่ควรเติมไอออนแอมโมเนียมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่วนแคลเซียมควรเติมปริมาณ 1 ไมโครโมลาร์เท่านั้น สำหรับวิตามินอินอซิทอลและไธอะมีนควรเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย รวมทั้งน้ำมะพร้าวซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

4. สารปรับระดับความดันออสโมติก ควรมีความเข้มข้นประมาณ 0.4 โมลาร์ และลดลงเรื่อยๆจนไม่มีหลังจากที่โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่และแบ่งเซลล์

5. เอนไซม์ต่างๆที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ ควรผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในระดับหนึ่งเสียก่อน เพราะเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ อาจทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานต่ำและเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2531. ภาวะการผลิตและการส่งออกดอกกล้วยไม้ของประเทศไทย. กระทรวงพาณิชย์. หน้า 1-6

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์.2534.การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ดำนูณ กาญจนภูมิ. 2519. การเกิดแคลลัสจากตาแวนด้ามิสโจอะดิมเมื่อเลี้ยงในหลอดทดลอง.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดำนูณ กาญจนภูมิ. 2523. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า38-42.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. ม.ป.ป. กล้วยไม้. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.หน้า 8-10.

ระพี สาคริก. 2530. กล้วยไม้. บริษัทประชาชนจำกัด.หน้า 19-23.

อดุลย์ พงศ์สุวรรณ.ม.ป.ป.กล้วยไม้.บริษัทสามัคคีสาส์นจำกัด.หน้า 8-10.

Amaki,W. and Higuchi,H.1989. Effects of dividing on the growth and organogenesis of protocorm-like bodies in *Doritaenopsis* Scientia Horticulturae. 39:63-72.

Anderson,L.1974. Techniques for isolation and culture of protoplast from culture carrot tissue. Doctoral thesis for the Degree of Philosophy, North Carolina State University.

Bajaj,Y.P.S.1977.Protoplast isolation, culture and somatic hybridization.*In*: Reinert, J. and Bajaj,Y.P.S.(eds) Plant Cell,Tissue and Organ Culture.Springer-Velag, Berlin. pp 467-471.

Boss, W. F.,Grimes,H. D. and Brigtman, A. 1984 Calcium-induced fusion of fusogenic wild carrot protoplasts. Protoplasma. 120:209-215.

Chen.W.H.and Ku,Z.C.1985. Isolation of mesophyll cells and protoplasts,and protoplast fusion and culture in banana. J.of the Agri.Asso. of Chi.129:55-66.

Cocking,E.C.,1972. Plant cell protoplasts-isolation and development. Ann.Rev.Plant Physiol.23:29-50.

Cuddihy,A.E.and Bottino,P.J.1982. Winged-bean protoplasts: isolation and culture to callus. Plant Cell,Tissue and Organ Culture 1:201-209.

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.

Eriksson,T.and Jonasson,K.1969.Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown *in vitro*. Planta. 89:85-89.

Eriksson,T.1977.Technical advances in protoplast isolation and cultivation.*In*:Barz, W., Reinhard,E. and Zenk,M. H.(eds)Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Springer-Verlag, Berlin.pp.313-322.

Evans, D.A. and Bravo,J.E.1983. Protoplast isolation and culture. *In*: Evans D.A., Sharp W.R.,Ammirato,P.V.and Yamada,Y.(eds) Handboook of Plant Cell Culture, Vol. 4.Macmillan Publishing,New York.pp.124-176.

Evans,P.K. and Cocking,E.C.1977.Isolated plant protoplasts. *In*: Street,H.E.(ed) Plant Tissue and Cell Culture, 2 ed,Vol.11. Blackwell Scientific Publication,Great Britain. pp.103-136.

Fahn,A. 1982. Plant anatomy.Pergamon Press,Oxford.pp.22-24.

Fitter,M.S.and Krikorian, A.D. n.d. Plant protoplasts some guidlines for their preparation and manipulation in culture. Department of Biochemistry,Division of Biological Sciences, State University of New York.28 pp.

Freason,E.M.,Power,J.M. and Cocking,E.C. 1973.The isolation culture and regeneration of *Petunia* protoplasts. Dev. Biol. 35:130-137.

Gamborg,O.L.1970. The effect of amino acid and ammonium on the growth of plant cells in suspension. Plant Physi ol.45:372-375

Gamborg,O.L.,Shyluk, J.P. and Shahin,E.A. 1981. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts.*In*:Thorpe, T.A.(ed) Plant Tissue Culture : Methods and Applica tions in Agriculture. Academic Press,New York.pp. 115-154.

Gamborg,O.L.1986.Cell,protoplast,and plant regeneration in culture.*In*:Demain,A.L.and Solomon, N.A.(eds) Mannual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ameri can Society for Microbiology.Washington,D.C.pp.263-273.

George,E.F.,Duttock,D.J.M.and George,M.J.1988.The Constituents of culture media. Plant Culture Media Vol.2. Commentary and Analysis.The Eastern Press Ltd., Reading Berks.pp.339-368.

Goh,C.J. 1978. Meristem culture of *Aranda* Debohra. Malay. Orch. Rev.11:10-15.

Goh,C.J. 1990. Orchids,monopodials.*In*: Ammirato,P.V.Evans, D.A.,Sharp,W.R. and Bajaj,Y.P.S..(eds) Handbook of Plant Cell Culture.Vol.5 McGraw-Hill,Inc. New York. pp. 598-637.

Grambow,H.J., Kao,K.N.,Miller,R.A. and Gamborg, O.L. 1972. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures.Planta.103:348-355.

Hew,C.S. and Yip. K. C. 1986. Isolation of orchid cells. Proceedings of the Sixth Asian Orchid Congress Seminar.Bangkok,Thailand,Nov.10-12,1986,pp 13-16.

Intuwong, O. and Sagawa, Y. 1973. Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences. Amer. Orch. Soc. Bull. 42 :209-215

Jaiswall,S.K., Hammatt, N., Bhojwani,S.S.,Cocking,E.C. and Davey,M.R.1990. Plant regeneration from cotyledon protoplast of *Brassica carinata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 22:159-165.

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

Kao, K.N. and Michayluk, M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta. 126:105-110.

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

Kerbauy, G.B. 1984. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. Plant Cell Report. 3:27-29.

Knudson, L.C. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orch. Soc. Bull. 15:214-217.

Koh, M.C., Goh, C.J. and Loh, C.S. 1988. Protoplast isolation and culture of *Aranda* hybrids. Malay. Orch. Rev. 22:70-78.

Kramer, J. 1989. The conservation international book of orchids. Abbeville Press Publishers. New York. pp. 36.

Kunisaki, J.T., Kim, K.K. and Sagawa, Y. 1972. Shoot tip culture of *Vanda*. Amer. Orch. Soc. Bull. 41:435-439

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

Loh, C.S. and Rao, A.N. 1985. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Aranda* Noorah Alsagoff. Malay. Orch. Rev. 19:34-37.

Michayluk,M.and Kao, K.N.1974. A comparative study of sugars and sugar alcohols on cell regeneration and sustained cell division in plant protoplasts Z.Pflanzenphysiol.75:181-181

Morel,G.M.1960.Producing virus-free *Cymbidium*. Amer. Orch. Soc. Bull. 29:495-497.

Morel,G.M..1964. Tissue culture - a new means of clonal propagation of orchids.Amer.Orch.Soc.Bull.33:473-478.

Murashige,T. and Skoog,F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant.15:473-479.

Nagata,T.,and Takebe,I.1970.Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts Planta. 92:301-308.

Nagata, T. and Takebe, I. 1971.Plating isolated mesophyll protoplasts on agar medium.Planta 99: 12-20.

Nyman, M. and Wallin,A.1988. Plant regeneration from strawberry (*Fragaria* x *Ananassa*) mesophyll protoplasts. Plant Physiol.133:375-377.

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

Pupilli,F.,Arcioni,S.,Damiani,F. and Pezzotti,M.1990. Plant regeneration from callus and protoplast cultures of *Lotus pedunculatus* Cav. Plant Cell,Tissue and Organ Culture. 23:193-199.

Sagawa,Y.,Shoji,T.and Shoji T. 1966. Clonal propagation of *Cymbidiums* through shoot meristem culture. Amer. Orch. Soc. Bull. 35:118-112.

Sagawa,Y.1990. Orchids other considerations.*In* : Ammirato, P.V., Evans, D.A.,Sharp,W.R.and Bajaj, Y.P.S. (eds) Handbook of Plant Cell Culture Vol.5. McGraw Hill, Inc. New York.pp 638-653.

Sajise,J.U.and Sagawa,Y.1991. Regeneration of plantlets from callus and protoplasts of *Phalaenopsis* sp.Malay. Orch. Bull. 5:23-28.

Sajise,J.U., Valmayor, L. and Sagawa,Y. n.d. Some major problems in isolation and culture of orchid protoplasts. A Lecture Presented at the Nagoya International Orchid Show,Sciencetific Program at Nagoya Trade and Industry Center. Nagoya,Japan.20 pp.

Shekhawat,N.S.and Galston,A.W.1983. Isolation,culture,and regeneration of moth bean (*Vigna aconitifolia*) leaf protoplasts. Plant Science Letters. 32:43-51.

Shimasaki,K.and Uemoto,S. 1990. Micropropagation of a terrestrial *Cymidium* species using rhizomes developed from buds and pseudobulbs. Plant Cell,Tissue and Organ Culture.22:237-244

Sidikou-Seyni,R.,Rambaud,C.,Dubois,J.and Vasseur,J.1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Cichorium intybus* L.x *Cichorium endivia* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28:83-91.

Simmonds,H.D.,Long N.E,and Keller A.W. 1991. High plating efficieancy and plant regeneration frequency in low density protoplast culture derived from an embryogenic *Brassica napus* cell suspension. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27:213-241.

Teo,C.K.H.,Kunisaki,T.and Sagawa,Y.1973.Clonal propagation of strap-leafed *Vanda* by shoot-tip culture. Amer. Orch. Soc.Bull. 41:436

Teo,C.K.H.and Neumann,K.H.1978. The culture of protoplasts isolated from *Renantanda* Rosalind Cheok. Orch. Rev. 86:156-158.

Teo,C.K.H..and Neumann,K.H.1978. The isolation and hybridi zation of protoplasts from orchids. Orch. Rev. 86: 186-189

Teo,C.K.H.and Wong,C.H.1978. Effect of sucrose on the growth of protocorms of *Holttumara* Loke Tuck Yip. Orch. Rev.86:285-289

Teo,C.K.H.1980. Studies on some aspects of orchid tissue culture. Proceeding of the Ninth World Orchid Conference Bangkok,Thailand.1980,pp.211-214.

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

Tse,A.T.Y.,Smith,R.J.and Hackett,W.P.1970. Adventitious shoot formation on *Phalaenopsis* nodes. Amer. Orch. Soc.Bull.40:807-801

Vacin,E. and Went,F.1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot.Gaz.110: 605-613.

Vajrabhaya,M.and Vajrabhaya,T. 1970. Tissue culture of *Rhyncostylis gigantea* a monopodial orchid. Amer. Orch. Soc. Bull.39:967-910

Veinken,J.,Ganser,R.,Hampp,R. and Zimmermann,U.1981. Electric field-induced fusion of isolated vacuoles and protoplasts of different developmental and metabolic provenience.Physiol. Plant.53:64-70.

Wallin,A. and Eriksson,T. 1973. Protoplast cultures from suspensions of *Daucus carota.* Physiol. Plant. 28: 33-39.

Wallin,A.1977.Isolation,culture and fusion of protoplasts from cell suspensons of higher plants. Doctoral thesis for the Degree of Philosophy,Uppsala University.

Wallin,A.and Johansson,L.1989.Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *in vitro* cultured shoots of a columnar apple. Plant Physiol. 135:565-570.

Widholm,J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol. 47:189-194.

Xu,Z-H, Davey, M.R. and Cocking, E.C.1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus* (Mung Bean) root protoplasts. Z. Pflanzenphysiol 104: 289-298.

Yan- Xiu,Z.,Dun-Yi,Y. and Harris, P.J.C. 1991. Isolation and culture of protoplast from callus tissue of *Hibiscus syriacus* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 25:17-19.

Zhou,C.1989. A study on isolation and culture of pollen protoplasts. Plant Science. 59:101-108.

ภาคผนวก

องค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ได้แก่ KC (Knudson C,1946), VW (Vacin and Went,1949), 1/2MS (Murashige and Skoog,1962), B5 (Gamborg B-5,1970) และ NT (Nagata and Takebe,1970)

Chemicals	KC,mg/l	VW,mg/l	1/2MS,mg/l	B5,mg/l	NT,mg/l
Macroelements					
$CaCl_2.2H_2O$	-	-	220	150	1100
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1000	-	-	-	-
$Ca_3(PO_4)_2$	-	200	-	-	-
KH_2PO_4	250	250	85	-	27
KNO_3	-	-	950	2500	101
$MgSO_4.7H_2O$	250	250	185	250	120
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	-	150	-
$(NH_4)_2SO_4$	500	500	-	134	-
NH_4NO_3	-	-	825	-	-
Microelements					
$CoCl_2.6H_2O$	-	-	0.025	0.025	-
$CuSO_4.5H_2O$	-	-	0.025	0.025	0.011
H_3BO_3	-	-	6.2	3	-
KI	-	-	0.83	0.750	0.116
$MnSO_4.4H_2O$	7.5	5.7	22.3	10	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	-	0.25	0.25	-
$ZnSO_4.7H_2O$	-	-	6.14	2	-

Chemicals	KC, mg/l	VW, mg/l	MS, mg/l	B5, mg/l	NT, mg/l
Iron					
$FeSO_4.7H_2O$	25	-	13.92	-	-
$Fe_2(C_4H_4O_8)_3.H_2O$	-	28	-	-	-
Na_2.EDTA	-	-	18.62	28	-
Organic components					
Glycine	-	-	2	-	2
Myo-inositol	-	-	100	100	100
Nicotinic acid	-	-	0.5	1	-
Pyridoxine HCl	-	-	0.5	1	-
Thiamine HCl	-	-	0.1	10	1
Sucrose	30000	-	30000	-	-
Coconut water	15%	15%	15%	15%	15%
pH	5.0	5.0	5.6	5.5	5.8