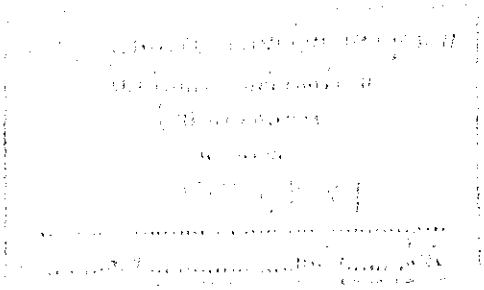
การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

Isolation and Culture of Gloxinia Protoplasts

มยุรี วุฒิสิทธิ์

Mayuree Wuttisit



วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2539

เลขหมู่ QK 898.G4 M19 2539 ต.3

Bib Key 91692

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกชิเนีย

ผู้เขียน นางมยุรี วุฒิสิทธิ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ จิตรภักดี)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ จิตรภักดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

ชื่อผู้เขียน นางมยุรี วุฒิสิทธิ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

นำส่วนต่างๆ ของกล๊อกซิเนียมาชักนำยอดรวม (multiple shoots) บนอาหารพื้นฐานสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยเติม BA (benzyladenine), NAA (1-naphthaleneacetic acid) และคอมบิเนชั่นระหว่าง BA และ NAA ในความเข้มข้นต่างๆ พบว่าส่วนใบสามารถชักนำยอดรวมได้ดีกว่าส่วนอื่นๆ โดยสามารถชักนำยอดรวมจากใบได้มากที่สุดเฉลี่ย 69.0 ยอดต่อใบ ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล สามารถชักนำยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 47.5 ยอดต่อใบ สำหรับอาหารที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 1.0 มก/ล พบว่าใบสามารถเกิดยอดรวมได้มากที่สุดเฉลี่ย 92.0 ยอดต่อใบ

เมื่อย้ายเลี้ยงยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตรเดิมที่เติม IAA (indole acetic acid), IBA (indole butyric acid), NAA ในความเข้มข้นต่างๆ และไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เพื่อชักนำราก พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3.0 มก/ล ให้จำนวนรากได้สูงสุดเฉลี่ย 40 รากต่อยอด ลักษณะรากอวบใหญ่ สีขาว แข็งแรง มีขนาดยาว และแตกแขนง

นำใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซอร์บิทอล 0.4

โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์และเมสอย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ใบกล๊อกชิเนีย ที่มีขนาดยาวกว่า 2.5 เซ็นติเมตร น้ำหนักสด 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 40xg เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย $3.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ได้ศึกษาจำนวนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์, วิธีการเลี้ยง และชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเริ่มต้น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2,4-D และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 1.0 มก/ล และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมต่อไปอีก 21 วัน พบว่ามีการสร้างเซลล์เล็กๆ มากมาย และสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า กลายเป็นเซลล์ซีสเพนชั่นขึ้นมา

Thesis Title Isolation and Culture of Gloxinia Protoplasts

Author Ms. Mayuree Wuttisit

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1995

Abstract

Multiple shoots were induced from various parts of Gloxinia on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with BA (benzyladenine), NAA (1-naphthalene-acetic acid) and combination of BA and NAA at different concentrations. It was found that multiple shoot formation from leaf was better than other parts. MS medium containing BA, NAA and combination of BA and NAA at 1 mg/l each produced 69, 47.5 and 92 shoots per leaf explants, respectively.

For root initiation, all shoots were transferred to MS medium supplemented with either IAA (indole acetic acid), IBA (indole butyric acid), NAA or MS hormone free medium. The results revealed that MS medium containing 3 mg/l IBA gave the highest number of 40 roots per shoot explant. The obtained roots were white, long, healthy and branched.

Protoplasts were isolated from young leaves of cultured Gloxinia plantlets. One gram of fresh weight leaves

(longer than 2.5 cm.) was digested with 10 ml of enzyme solution containing 3% (w/v) Cellulase Onozuka R-10, 0.4 M sorbitol, 10 mM $CaCl_2.2H_2O$, 10 mM MES (2 [N-Morpholinoethanesulfonic acid]). The mixture of leaves and enzyme solution was incubated at 30°C for 5 hours on a gyrotary shaker with an agitation speed of 40 rpm. The average yield of isolated protoplasts was $3.5x10^5$ protoplasts per ml. The protoplast culture was investigated by using different numbers of initial densities, culture methods and types of media. The best results found were $5x10^5$ protoplasts per ml. cultured in liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), 1 mg/l BA and 0.4 M sucrose under dark condition. After 5 days in culture, wall formation was evident. Continued division of cultured protoplasts had resulted in small groups of cell suspension which were easily seen within 21 days after isolation.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ก็ด้วยความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อคิดอันเป็นประโยชน์ ช่วยในการจัดหาเอกสารประกอบการวิจัยเป็นจำนวนมาก อีกทั้งได้ช่วยแก้ปัญหาตลอดจนอุปสรรคต่างๆ อย่างใกล้ชิด และเอาใจใส่ตลอดเวลา ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ จิตรภักดี กรรมการที่ปรึกษาและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำและตรวจสอบแก้ข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ ขอขอบพระคุณพี่สาวทุกคน สามี ที่ให้กำลังใจอยู่เสมอ ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่าน พี่น้องและเพื่อนร่วมงานในโรงเรียนหาดใหญ่วิทยาลัย จ. สงขลา ที่คอยให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการวิจัย และขอบใจลูกทั้งสอง ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ

มยุรี วุฒิสิทธิ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	22
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	24
วัสดุ	24
อุปกรณ์	25
วิธีการ	26
3. ผลการทดลอง	36
4. วิจารณ์	65
5. สรุป	80
เอกสารอ้างอิง	82
ภาคผนวก	94
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนยอดรวมที่เกิดจากส่วนต่างๆ ของกล๊อกชิเนีย เมื่อชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน	37
2	จำนวนยอดที่เกิดจากเกิดจากส่วนต่างๆ ของกล๊อกชิเนีย เมื่อชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 90 วัน	39
3	ผลการชักนำยอดรวมจากใบของกล๊อกชิเนีย ในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
4	ผลการชักนำยอดรวมจากยอดอ่อนของกล๊อกชิเนียในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
5	ผลการชักนำยอดรวมจากลำต้นกล๊อกชิเนียในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
6	ผลการชักนำยอดรวมจากหัวกล๊อกชิเนีย ในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	45

ตารางที่		หน้า
7	ผลของการชักนำยอดรวมจากก้านใบของกล๊อกซิเนีย ในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	45
8	จำนวนรากที่ชักนำได้จากยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่มี IAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	47
9	จำนวนรากที่เกิดจากยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	48
10	จำนวนรากที่เกิดจากยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	49
11	จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนียที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.3, 0.4 และ 0.5 โมลาร์ ของสารละลายซอร์บิทอล	52
12	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของเอนไซม์เซลลูเลส และไดรซีเลส เข้มข้นอย่างละ 3 เปอร์เซ็นต์	56
13	จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนียที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4, 5 และ 6 ชั่วโมง	58
14	จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนีย ที่สภาวะการอินคูเบทที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส	58
15	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาดต่างกันด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง	59
16	เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบที่เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับใบที่ไม่ได้เก็บไว้ในที่มืด	60

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอดรวมที่ชักนำได้จากใบอายุ 90 วัน บนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	37
2	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอดที่ชักนำได้จากใบในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 90 วัน	40
3	เปรียบเทียบการเกิดยอดรวมและราก จากส่วนต่าง ๆ ของกล๊อกชิเนียในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่น ระหว่าง BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 90 วัน	42
4	แสดงการเกิดยอดรวมและรากจากใบในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่น ระหว่าง BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 90 วัน	42
5	เปรียบเทียบการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่มี IAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 30 วัน	47
6	เปรียบเทียบการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน	48
7	เปรียบเทียบการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน	49

รูปที่		หน้า
8	ต้นกล๊อกซิเนียที่เริ่มปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกได้หลังจากนำมาปลูกในกระถาง 2 สัปดาห์	51
9	ต้นกล๊อกซิเนียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์และให้ดอกสวยงาม	51
10	โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ (x165)	53
11	โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เรียงตัวอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง (x165)	53
12	โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีคลอโรพลาสต์ (x165)	55
13	โปรโตพลาสต์ที่มีรงควัตถุสีชมพู (x165)	55
14	โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงเห็นเป็นสีเหลืองเขียวเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (x165)	57
15	การเรืองแสงของผนังเซลล์เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ (x165)	64
16	เซลล์แขวนลอยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์	64

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ซม.	=	เซ็นติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ล.	=	ลิตร
°C	=	degree celcius
%	=	percent
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid (auxin)
B5	=	Gamborg
BA	=	benzyladenine (cytokinin)
CFW	=	calcofluor white
cm.	=	centimetre
FDA	=	fluorescein diacetate
g.	=	gram
IAA	=	indole acetic acid (auxin)
IBA	=	indole butyric acid (auxin)
M	=	molar
MES	=	2 (N-morpholinoethanesulfonic acid)
ml.	=	milli-litre
MS	=	Murashige and Skoog
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid (auxin)
NT	=	Nagata and Takebe
ppm	=	parts per million
rpm	=	round per minute
SADH	=	succinic and -2,2 dimethyl hydrazide
VW	=	Vacin and Went

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล๊อกซิเนียมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศบราซิล ได้มีผู้นำเข้ามาในประเทศไทย เมื่อประมาณ 25 ปีก่อน เนื่องจากกล๊อกซิเนียเป็นไม้กระถางที่มีใบและดอกงดงามมาก โดยเป็นความงามที่ไม่ซ้ำแบบไม้ดอกชนิดใดๆ จึงทำให้กล๊อกซิเนียได้รับความนิยม และเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ดอกไม้ประดับในปัจจุบัน การขยายพันธุ์กล๊อกซิเนียโดยทั่วไปสามารถทำได้โดยการปักชำใบ ยอด หัว และการเพาะเมล็ด ซึ่งนับว่าทั้งสี่วิธีดังกล่าวนั้นต้องใช้เวลานาน และมีข้อเสียอื่นๆ คือ เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำ และต้นลูกที่ได้อาจมีความผันแปรไปจากต้นพ่อแม่ดอกที่ได้อาจจะแตกต่างไปจากต้นเดิม

ต้นกล๊อกซิเนียที่นิยมปลูกกันอยู่ในปัจจุบันได้จากการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ได้ลูกผสมจำนวนมาก ซึ่งลูกผสมเหล่านี้ไม่สามารถสร้างเมล็ด หรือมีได้แต่เมล็ดจะลีบ ทำให้เป็นปัญหาในด้านการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดเพราะจะต้องหาซื้อเมล็ดพันธุ์มาปลูกทุกครั้ง นอกจากนี้ต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีสีดอกหลายสีที่อาจไม่ตรงกับความต้องการของตลาด

เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาด การขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์กล๊อกซิเนียจึงเป็นสิ่งจำเป็น จากความก้าวหน้าทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดีและรวดเร็วขึ้นด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็เป็นวิธีที่ดีอีกวิธีหนึ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช จะทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ๆ การสร้างพืชลูกผสมพันธุ์ใหม่ๆ โดยอาศัยโปรโตพลาสต์นั้น สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ซึ่งทำได้โดยการนำเซลล์

ร่างกาย(somatic cell) ของพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลมารวมกันเกิด somatic cell hybridization ได้ลูกผสม (somatic hybrids) ขึ้นมา เมื่อชักนำลูกผสมนี้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ขึ้นมา ก็จะได้พืชพันธุ์ใหม่ (Bajaj, 1977) วิธีนี้เป็นการกำจัดปัญหาเรื่องสิ่งกีดขวางทางสปีชีส์ได้ดี

สำหรับวิธีการสร้างกลือกชิเนียพันธุ์ใหม่ๆ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์ สามารถทำได้โดยใช้โปรโตพลาสต์จากต้นกล๊อกชิเนียที่มีลักษณะดีเด่นตามต้องการ เช่น ดอกขนาดใหญ่ สีดอกสดและเนื้อกลีบหนาเป็นก่ามะหยี่ ปลายกลีบพริ้ว ก้านดอกยาวแข็งแรง ฯลฯ ของแต่ละสายพันธ์มารวมกัน จากนั้นนำโปรโต-พลาสต์ที่รวมตัวกันแล้วไปเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และมีการแบ่งตัวกลายเป็นแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ (Evans and Bravo, 1983) การรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์นั้น อาจใช้สารเคมี คือ PEG (polyethylene glycol) (Kao and Michayluk, 1974) หรือใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวขึ้น (Veinken, *et al.*, 1981)

นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาประยุกต์ใช้กับโปรโตพลาสต์ได้อีกด้วย เช่น การตัดต่อยีนการนำยีนที่ต้องการ (desired gene) ใส่เข้าไปในโปรโตพลาสต์โดยวิธีต่างๆ เช่น microinjection แล้วนำโปรโตพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงต่อไป เมื่อได้ต้นใหม่ขึ้นมา ต้นที่ได้ (transformed plant) ก็จะแสดงลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม โดยมีลักษณะตามที่ต้องการ

ดังนั้นการศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกชิเนียนับเป็นก้าวแรกของการนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์กล๊อกชิเนียต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล๊อกซิเนียมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Sinningia speciosa* Benth. & Hook. มีชื่อสามัญว่า Gloxinia หรือ Sinningia อยู่ในวงศ์ Gesneriaceae เป็นพืชล้มลุกประเภทไม้เนื้ออ่อน ต้นเป็นพุ่มสูงประมาณ 15 เซ็นติเมตร ลำต้นและก้านใบอวบสีเขียว มีขนเล็กๆ ขึ้นรอบๆ มีหัวใต้ดิน ใบเดี่ยวแยกออกเป็นคู่ตรงกันข้าม (opposite) ใบหนาสีเขียวเข้มและมีลักษณะรูปไข่ ขอบใบหยักทั้งหน้าใบและหลังใบ ใบมีขน ก้านใบล่างๆ อาจยาวกว่าก้านใบด้านบน โดยใบล่างจะแอ่นลงด้านล่างปิดขอบกระถาง ดอกมีลักษณะรูประฆังคว่ำกว้างประมาณ 8-12 เซ็นติเมตร มีก้านดอกที่ยาวและอวบแข็งแรง ชูดอกขึ้นเหนือพุ่มใบ โดยก้านดอกจะงอกออกบริเวณซอกใบและระหว่างซอกก้านดอกด้วย ดอกประกอบด้วยกลีบดอกเนื้อละเอียดเหมือนกำมะหยี่ มีสีต่างๆ กัน เช่น สีขาว สีชมพู สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน ทั้งดอกชนิดชั้นเดียวและดอกซ้อน จำนวนดอกที่จะออกแต่ละครั้งประมาณ 2-15 ดอก (Backer and Brink,1965) กล๊อกซิเนียเป็นไม้ในร่ม ไม่ต้องการแสงโดยตรง ชอบอากาศค่อนข้างเย็น ชอบดินที่มีอินทรียวัตถุสูง ระบายน้ำได้ดี เก็บความชื้นได้มาก และมีความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ประมาณ 6.6

2. พันธุ์ที่ใช้ปลูก

พันธุ์ที่ใช้ในปัจจุบันเป็นพันธุ์ลูกผสม มีทั้งดอกแบบชั้นเดียวและดอกซ้อน ดอกชนิดชั้นเดียวมีสีดอกต่างๆ กัน ได้แก่ ดอกสีแดง (meaning red, superb, edelrol) ดอกสีม่วง (osena orchid) ดอกสีน้ำเงิน (ultra blue) ดอกสีขาว (ultra white) ดอกสีแดงขอบขาว (ultra red with white edge) ชนิดดอกซ้อน ได้แก่ ดอกสีแดงเข้ม (royal red) ดอกสีแดงขอบขาว (geogor mendel) (สมเพียร, 2525)

3. การขยายพันธุ์

3.1 การขยายพันธุ์โดยทั่วไป

กล๊อกซิเนียขยายพันธุ์ได้ง่ายมาก และมีหลายวิธีกล่าวคือ แทบทุกส่วนสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้หมด ไม่ว่าจะเป็นส่วนของยอด ลำต้น ใบ หน่อ หรือหัวใต้ดิน มีวิธีการต่างๆ ดังนี้

3.1.1 การเพาะเมล็ด

เนื่องจากกล๊อกซิเนียมีเมล็ดขนาดเล็กมาก เมื่อเทียบกับไม้ดอกชนิดอื่น และมีขนาดใกล้เคียงกับแอฟริกันไวโอเล็ต โดยเมล็ดหนัก 1 ออนซ์ จะมีประมาณ 800,000 เมล็ด ดังนั้นในการเพาะเมล็ดจึงต้องทำด้วยความประณีตและระมัดระวังเป็นพิเศษ ภาชนะที่ใช้เพาะควรเป็นตะกร้าพลาสติกสี่เหลี่ยมตื้นๆ มีรูพรุนสำหรับระบายน้ำ เครื่องปลูกใช้ทรายกับขุยมะพร้าวที่ร่อนแล้วในอัตราส่วน 1:1 เกลี่ยให้เรียบ แล้วใช้ไม้ขีดเป็นร่องตื้นๆ หว่านเมล็ดให้กระจายกัน มิฉะนั้นจะขึ้นเป็นกระจุก ไม่ต้องกลบเมล็ด เพราะกล๊อกซิเนียต้องการแสงในการงอก ให้น้ำจากข้างล่าง ดูแลกระบะเพาะเมล็ดให้มีความชื้นอยู่เสมอ เมล็ดจะงอกภายใน 12-14 วัน เมื่อกล๊อกซิเนียอายุได้ 1 เดือน ถ้าเห็นว่าต้นเบียดกันแน่นมากไปควรแยกเอาบางส่วนไปปลูกในกระถางใหม่อีกหลายๆ กระถาง จะทำให้ต้นเจริญเติบโตเร็วกว่า เมื่อต้นโตเบียดกันแน่นอีกให้ย้ายอีกหลายครั้งในกระถางใหม่ โดยใช้เครื่องปลูกเช่นเดิม ระยะห่างในการปลูกประมาณ 1 นิ้วต่อต้น ในระยะนี้ระบบรากและใบเจริญพอที่จะหาและปรุงอาหารได้เองแล้ว ถ้าต้องการเร่งการเจริญเติบโต อาจละลายปุ๋ยลงในน้ำหรือใส่ลงไปในกระถางโดยตรงก็ได้ พร้อมกับเพิ่มแสงให้เล็กน้อย คือ แทนที่จะวางในที่ร่ม ให้เลื่อนออกมาวางที่สว่าง แต่อย่าให้ถูกแสงโดยตรง เพราะกล๊อกซิเนียเป็นไม้ที่ไม่ต้องการแสงแดดจัด

เมื่อกล๊อกซิเนียมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของพุ่มต้นโตเกินกว่า 1 นิ้ว ก็ควรแยกลงปลูกในกระถางเดี่ยวขนาด 3 นิ้วต่อต้น เพราะระบบรากของกล๊อกซิเนียไม่ลึกมาก จึงไม่เป็นการสิ้นเปลืองกระถางและเครื่องปลูกด้วย เครื่องปลูกในระยะนี้ควรเป็นเครื่องปลูกที่ใช้ได้ตลอดไปจนกว่ากล๊อกซิเนียออกดอก

อาจใช้ทราย 1 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน ใบไม้ 1 ส่วน ปุ๋ยคอกเก่าๆ 1 ส่วน เติมปุ๋ยเล็กน้อย

เมื่อกล๊อกซิเนียอายุสัก 8-9 สัปดาห์ มีปลายใบจรดขอบกระถางหรือพ้นขอบกระถางออกมาแล้ว อาจย้ายครั้งสุดท้ายใส่กระถางขนาด 4-5 นิ้ว ซึ่งเป็นกระถางที่ใช้สำหรับปลูกเพื่อจำหน่าย โดยใช้เครื่องปลูกเหมือนเดิม แล้วปล่อยให้ออกดอกในกระถางนี้เลย

3.1.2 การปักชำใบ

ใช้แผ่นใบหรือก้านใบที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป และเป็นใบที่อยู่บริเวณกลางๆ ลำต้น วิธีการตัดควรมีก้านใบติดมาด้วยประมาณ 1 นิ้ว เพื่อใช้สำหรับเกาะติดกับวัสดุปักชำไม่ให้โค่นล้มได้ง่าย การปักชำควรจะมีการจัดเรียงอย่างมีระเบียบ โดยหันหน้าใบหรือหลังใบไปในทางเดียวกันตลอดอย่างมีระเบียบ พยายามอย่าให้ขอบใบชนกัน อาจจะชำในกระถาง 10 นิ้ว เช่นเดียวกับที่ใช้เพาะเมล็ด หรือภาชนะอื่นใดก็ได้ที่เหมาะสมและสะดวก เช่น ในตะกร้าพลาสติก หรือภาชนะอื่นๆก็ได้ที่สะดวก การให้น้ำควรให้จากก้นกระถาง จะทำให้ออกรากและเกิดหัวเล็กๆขึ้นที่โคนใบแล้วเกิดรากและต้นใหม่จากหัวเล็กนี้ แผ่นใบจะเหี่ยวและสลายตัวไปก่อน นำต้นอ่อนที่ได้ไปปลูก จากวันเริ่มปักชำจนได้ต้นใหม่ใช้เวลาประมาณ 2 เดือน

3.1.3 การใช้หัวปลูก

หลังจากต้นให้ดอกแล้วจะโทรม ถ้าต้องการหัวไปปลูกควรงดการรดน้ำ ปล่อยให้ต้นเหี่ยว แล้วขุดหัวมาล้างน้ำ และนำมาผึ่งลมไว้ประมาณ 4-6 สัปดาห์ หัวของกล๊อกซิเนียจะเริ่มแตกหน่อ นำหัวที่แตกหน่อมาปลูก โดยใช้เครื่องปลูกกลบหัวบางๆ และเพิ่มเครื่องปลูกมากขึ้น เมื่อต้นโตขึ้นประมาณ 3-4 เดือน จะออกดอก ถ้าหากเก็บหัวไว้ปลูกในฤดูต่อไป ให้เก็บหัวที่ล้างน้ำสะอาดแล้วไว้ในตู้เย็น แล้วค่อยนำออกมาใช้เมื่อถึงเวลาปลูก

การปลูกกล๊อกซิเนียด้วยหัวแม้ว่าดอกจะมีคุณสมบัติดีเพียงไรก็ตามแต่จะได้ปริมาณไม่มากนัก ถ้าทำเป็นการค้าจะไม่สะดวก จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม

3.1.4 การปักชำยอด

เมื่อนำต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดหรือจากหัวไปปลูก หากต้นที่งอกออกมาใหม่ได้รับแสงสว่างไม่เพียงพอ จะทำให้ต้นยืดยาวเก้งก้าง อาจจะช่วยเหลือได้โดยการตัดส่วนยอดออกไปชำ เพื่อให้ตาข้างแตกยอดใหม่ จะได้พุ่มต้นที่กะทัดรัด (compact) ขึ้น ยอดที่ยืดสูงไปอาจจะมีใบอยู่เพียง 3-4 ใบ ก็นำไปชำได้ การปักชำยอดทำเช่นเดียวกับการปักชำใบ

กล๊อกซิเนียบางพันธุ์เก้งก้าง อาจจะต้องเด็ดยอดเพื่อให้ได้พุ่มที่เตี้ยลง โดยเด็ดขณะที่ย้ายปลูกใหม่ๆ บางพันธุ์อาจไม่จำเป็นต้องเด็ดยอด ทั้งนี้ผู้ปลูกต้องสังเกตเอง ปัจจุบันนิยมใช้สารชะลอการเจริญเติบโตในการผลิตไม้ดอกไม้ประดับอย่างกว้างขวาง การปลูกกล๊อกซิเนียในที่ที่มีแสงแดดจัด จำเป็นต้องพรางแสงด้วยหลังคาเพื่อลดอุณหภูมิ จนบางครั้งทำให้แสงมีความเข้มไม่พอ การแตกกิ่งก้านจึงสูงเก้งก้าง อาจแก้ได้โดยการใช้สารเคมีซึ่งช่วยให้ต้นกระทัดรัดขึ้น เช่น SADH ความเข้มข้น 1,000 ppm พ่นทางใบ หลังย้ายปลูกลงกระถาง 1-2 สัปดาห์

3.2 การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์พืช มีการพัฒนาจนประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด โดยเริ่มที่กล้วยไม้เป็นพืชชนิดแรกที่ขยายพันธุ์ได้ ต่อมามีการนำเอาพืชชนิดอื่นๆ ทั้งไม้ดอกไม้ประดับ เช่น เบญจมาศ, ลิลลี่, คาร์เนชั่น, จิบโซฟิลล่า ไม้ผลและพืชผัก เช่น กล้วย, หน่อไม้ฝรั่ง, ขิง, แตงโม มาขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ได้สำเร็จ การใช้เทคโนโลยีดังกล่าวนับว่ามีความสำคัญมากที่ช่วยเพิ่มต้นกล้าให้ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งลดต้นทุนการผลิตและยังเพิ่มความแน่ใจว่าได้ต้นกล้าตรงตามพันธุ์ การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น อาจแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ กล่าวคือ

3.2.1 การขยายพันธุ์โดยผ่านการเกิดแคลลัส

แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่างๆ การชักนำชิ้นส่วนพืชให้เกิดแคลลัสทำได้โดยนำชิ้นส่วนพืชมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วตัดให้มีขนาดพอเหมาะ จากนั้นนำไปวางบนผิวอาหารแข็ง วิธีการแบบนี้เรียกว่า อินนอคคูเลชั่น (inoculation) นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่าชิ้นส่วนพืชมีลักษณะพองฟูของเนื้อเยื่อแคลลัสตรงบริเวณรอบหรือบนรอยตัดชิ้นส่วนพืชนั้น แคลลัสเกิดขึ้นได้จากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง เช่น ราก ลำต้น ใบ อวัยวะสะสมอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ก่อนเกิดการสร้างแคลลัส จะต้องเกิดดีดิฟเฟอเรนทิเอชั่นของชิ้นส่วนพืชแล้วตามด้วยการแบ่งเซลล์ แต่ถ้าชิ้นส่วนพืชนั้นมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่ เซลล์พวกนี้สามารถแบ่งตัวได้ทันทีโดยไม่ต้องเกิดดีดิฟเฟอเรนทิเอชั่น การเกิดดีดิฟเฟอเรนทิ-เอชั่นทำให้เซลล์ที่โตเต็มที่แล้ว (mature cell) สามารถเปลี่ยนจากระยะเต็มวัย (adult phase) ไปเป็นระยะอ่อนวัย (juvenile phase) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสง่ายขึ้น

ถึงแม้ว่าสามารถใช้อวัยวะทุกส่วนและเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืชในการชักนำให้เกิดแคลลัส แต่การสร้างแคลลัสได้มากน้อย ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปัจจัยภายใน ได้แก่ ชนิด ตำแหน่ง และอายุของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น กล่าวคือ ไม้ล้มลุกให้แคลลัสได้ดีกว่าไม้ยืนต้น พืชใบเลี้ยงคู่ให้แคลลัสดีกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ชิ้นส่วนพืชที่มีอายุอ่อนกว่าให้แคลลัสเร็วกว่าชิ้นส่วนพืชที่มีอายุแก่ นอกจากปัจจัยภายในแล้วยังมีปัจจัยภายนอกอีก ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช องค์ประกอบแร่ธาตุอาหารที่เลี้ยง แสง และ อุณหภูมิ

จากแคลลัสที่ได้ทำการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจนเนซีส (organogenesis) หรือ เอ็มบริโอเจนเนซีส (embryogenesis) ก็จะได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ขึ้นมา

3.2.2 การขยายพันธุ์โดยการทำให้เกิดยอดรวม

วิธีนี้ไม่ต้องผ่านการเกิดแคลลัส สามารถทำได้โดยการตัดเอาปลายยอด (shoot apex) ของพืชที่ต้องการไปชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoots) เป็นจำนวนมาก จากนั้นแยกยอดรวมออกเป็นยอดเดี่ยวๆ นำไปเลี้ยงในอาหารสูตรที่ทำให้เกิดยอดรวมอีก เป็นการเพิ่มจำนวนยอดได้เรื่อยๆ เมื่อเพียงพอกับความต้องการแล้ว จึงนำยอดเดี่ยวๆ เหล่านั้นไปชักนำรากในอาหารสูตรที่ทำให้เกิดราก ก็จะได้ต้นที่สมบูรณ์ นอกจากใช้ปลายยอดแล้วอาจแยกเอาส่วนของลำต้นที่มีตาข้าง (axillary bud) มาเพาะเลี้ยงทำให้เกิดเป็นต้นขึ้นมา แล้วนำต้นที่ได้ไปชักนำราก

การขยายพันธุ์พืชแบบนี้ค่อนข้างนิยมกว่าการชักนำให้เกิดแคลลัส เพราะทำได้ง่ายและเร็วกว่า Hughes (1981) ได้กล่าวถึงข้อดีของการขยายพันธุ์พวกไม้ดอกไม้ประดับโดยวิธีนี้ กล่าวคือ

1. สามารถเพิ่มจำนวนต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ได้เป็นจำนวนมาก
2. อาจได้ต้นที่ปลอดโรค เช่น ในพวกกล้วยไม้ได้ต้นปลอดไวรัสจากการเพาะเลี้ยงเมอริสเต็ม (meristem)
3. สามารถเก็บรักษาสต๊อคในหลอดทดลองแทนการเก็บในเรือนเพาะเลี้ยง
4. ได้ลูกผสมที่เกิดจาก incompatible species โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ หรือโอวูล
5. อาจทำให้เกิดพืชแฮพลอยด์ขึ้นมาได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูพวกไม้ดอกไม้ประดับบางชนิด ซึ่งพืชแฮพลอยด์นี้จะแสดงลักษณะต่างๆ ออกมาได้ เมื่อทำให้กลายเป็นพืชดิพลอยด์ขึ้นมาก็จะได้เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ซึ่งมีประโยชน์ทางด้านการผสมพันธุ์พืช

ในการขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น Murashige (1974) ได้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้ 1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม และการทำให้ชิ้นส่วนนั้นปลอดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ 2 การเพิ่มจำนวน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงเมอริสเต็ม การทำให้ตายอดและตาข้างเจริญพัฒนาขึ้นมา การชักนำให้เกิดยอดรวม การทำโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส 3 การทำให้เกิดราก และนำต้นสมบูรณ์ลงดิน พบว่าต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง อาจสร้างรากได้เอง แต่บ่อยครั้งที่จำเป็นต้องย้ายต้นที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดราก แต่ในพืชบางชนิดต้นจะเกิดรากได้เองเมื่อย้ายลงดินโดยตรง การนำพืชออกจากขวดเพื่อปลูกลงดินนั้นพืชมักเสียน้ำในปริมาณที่มาก ทำให้โอกาสรอดน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญของมัดท่อลำเลียง (vascular bundles) ยังไม่สมบูรณ์ และชั้นผึ้งเคลือบผิว (epicuticular wax) มีจำนวนน้อยกว่าพืชในธรรมชาติ ดังนั้นการดูแลให้ต้นแข็งแรงก่อนลงดินจะทำให้จำนวนต้นที่รอดชีวิตสูงขึ้น

ตัวอย่างไม้ดอกไม้ประดับที่ใช้ขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จ ดังนี้

Norton และ Boe (1982) เพาะเลี้ยงปลายยอดของพืชในตระกูลกุหลาบบนอาหารสูตร Linsmaier และ Skoog ร่วมกับ BA 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดสูงสุด และจะเกิดรากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี IBA 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจำนวนรากจะเพิ่มขึ้นหากเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์

Meyer และ Staden (1988) เลี้ยงตาข้างของ *Gerbera aurantiaca* Sch. บนอาหารสูตร MS ที่มี BA 5 ไมโครโมลาร์ จะทำให้เกิดยอดรวม ส่วนการเกิดรากต้องเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA 5-10 ไมโครโมลาร์ หรือ NAA 5-10 ไมโครโมลาร์ จากนั้นสามารถนำปลูกลงดินได้ ต่อมาในปี 1991 สองคนนี้ได้ทำการตัดยอดของ *Aloe barbadensis* Mill พบว่าเมื่อเลี้ยงยอดบนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่มี IBA 5 ไมโครโมลาร์ จะเกิดจำนวนยอดสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเกิดรากด้วย แต่เมื่อนำมาเลี้ยงบน

อาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้นสูงกว่า NAA จะเกิด adventitious buds และ ตาข้าง โดยตาข้างจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี IAA นอกจากนี้การศึกษาทางด้านการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphogenesis) พบว่าตาข้างจะถูกยับยั้งโดย 2,4-D ส่วนไคเนติน, BA และ thidiazuron จะเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช และจะยับยั้งการพัฒนาของตาข้าง และ adventitious buds ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของตาข้าง คือ 25 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ คือ ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หากใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของตา

การขยายพันธุ์แอฟริกันไวโอเล็ต *(Saintpaulia ionantha* Wendl.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีผู้ศึกษาจำนวนมาก และมีการใช้ส่วนต่างๆ มาเป็นตัวเริ่มต้น เช่น ก้านใบ Harney และ Knap (1990) รายงานการชักนำต้นจากก้านใบโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส แต่ส่วนที่ค่อนข้างนิยมนำมาใช้คือ ใบ Cooke (1977) ตัดใบให้มีขนาดพื้นที่ 10 ตารางมิลลิเมตร วางบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พบว่ามีการสร้างต้นขึ้นมาให้เห็นภายใน 60 วันหลังจากเพาะเลี้ยง เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมแต่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ต้นที่ได้สร้างรากขึ้นมา

Takayama (1990) ได้รวบรวมงานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Begonia x hiemalis* และกล่าวว่าการขยายพันธุ์บีโกเนียโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น นิยมชักนำให้เกิดการสร้าง adventitious bud จากส่วนใบ ก้านใบ ก้านช่อดอก และเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีคอมบิเนชั่นของออกซินกับไซโทไคนิน ตัวอย่างเช่น BA 1.3 ไมโครโมลาร์ หรือ ไคเนติน 4.6 ไมโครโมลาร์ ใช้ร่วมกับ NAA 5.4 ไมโครโมลาร์ เพียงพอต่อการชักนำการสร้างตาจำนวนมากมายแล้ว

ต้นคาร์เนชั่น *(Dianthus sp.)* จัดเป็นพืชที่ค่อนข้างเป็นเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำได้หลายวิธีเช่น Hackett และ Anderson (1967) ชักนำให้เกิดยอดรวมจาก

การเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารสูตร White ที่มีสารอนินทรีย์เข้มข้นกว่าเดิม 5 เท่า เติมด้วย NAA 11 ไมโครโมลาร์ ตอนแรกได้แคลลัสเกิดขึ้นก่อน ต่อมาแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นส่วนเมอริสเต็มสีเขียวเข้ม และต้นจำนวนมากเกิดตามมาเมื่อย้ายแคลลัสไปยังอาหารสูตร MS ที่ไม่มี NAA. Takeda (1974) รายงานการชักนำต้นจากส่วนฐานของใบอ่อนและใบแก่ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA และ NAA. Kakeshi (1979) ใช้ตาดอกในการชักนำต้นขึ้นมาโดยสามารถชักนำต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากกลีบดอกอ่อนที่แยกออกมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี IAA 5.4 ไมโครโมลาร์ และ BA 4.4 ไมโครโมลาร์

การเพาะเลี้ยงเยอราเนียม (*Pelargonium sp.*) นั้น ส่วนใหญ่มักใช้วิธีออร์แกโนเจนเนซีส เช่น Abo El-Nil, *et al.* (1976a) แสดงให้เห็นว่า ออร์แกโนเจนเนซีสในแคลลัสของเยอราเนียมนั้น ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินและไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การให้แสง 16 ชั่วโมง จะช่วยเร่งได้ดีขึ้น เช่น ถ้าเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่มีไคเนติน 4.6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 2.6 ไมโครโมลาร์ จะเกิด bud primordia ขึ้นมามากมาย และจะเจริญพัฒนาต่อไปเมื่อย้ายตาเหล่านี้ไปยังอาหารที่มีไคเนติน 9.3-11.6 ไมโครโมลาร์ และ NAA 2.6 ไมโครโมลาร์ ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเมอริสเต็มนั้น Harney (1982) ใช้อาหารสูตร MS ที่มี BA 0.9 ไมโครโมลาร์ และ NAA 1.0 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำต้นจำนวน 4-8 ต้นต่อหนึ่งปลายยอด

วรรณรัตน์ นองมณี (2533) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบอ่อนและฐานรองดอกตูมของต้นเยอบีร่า (*Gerbera jamesonii hybrida*) พบว่าก้านใบอ่อนเกิดแคลลัสในอาหารที่มี BA ทุกระดับความเข้มข้นร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสจะพัฒนาเป็นส่วนต้นในอาหารที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในอาหารที่มีไคเนตินทุกระดับความเข้มข้น ไม่พบการเกิดแคลลัสและส่วนต้น การเพาะเลี้ยงฐานรองดอกตูมเยอบีร่าในอาหารที่มี BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จะเกิดเป็นส่วนต้นโดยไม่ผ่านแคลลัส ส่วนต้นเยอบีร่าที่เกิดจากก้านใบอ่อนและฐานรองดอกตูม เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี IAA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดราก และเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังการเพาะเลี้ยง

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนีย ได้มีการศึกษาและทดลองพัฒนาสูตรอาหาร และวิธีการทดลองต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของต้นกล้าที่ได้ให้อยู่รอดได้สูงในธรรมชาติ สามารถผลิตให้ได้จำนวนต้นกล้ามากที่สุด และประหยัดค่าใช้จ่ายมากที่สุด ดังการทดลองที่ผ่านมาดังนี้

เจริญ สิงห์ลอ (2534) ขยายพันธุ์กล๊อกซิเนียโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบในอาหารสูตร MS มีการเติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 50 วันสามารถผลิตต้นกล้าได้มากกว่า 70 ต้นต่อก้านใบ และปลูกลงดินได้ สำหรับการชักนำให้เกิดราก ทำได้โดยเพาะเลี้ยงต้นกล้าในอาหารสูตรเดิมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อต้นกล้าออกราก จึงนำไปปรับสภาพในน้ำสะอาดเป็นเวลา 3 วัน และแช่จุ่มใน IAA 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 15 นาที แล้วนำปลูกลงดิน ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถให้ต้นกล้าที่มีชีวิตได้นานที่สุด

รงรอง วิเศษสุวรรณ และ อรดี สหวัชรินทร์ (2534) นำก้านดอกตูมของกล๊อกซิเนียมาฟอกด้วยน้ำยาคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมน้ำยาเคลือบผิวทวิน 20 1-2 หยด นาน 5 นาที ล้างก้านดอกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 เดือน จะเกิดต้น ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสูตร MS ที่มีไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กล๊อกซิเนียจะแตกหน่อและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จากนั้นย้ายลงอาหารใหม่ โดยตัดต้นเป็นข้อ ๆ ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 เดือน เมื่อเลี้ยงไปประมาณ 2 เดือน จะออกรากมีลักษณะยาว ผอม สามารถย้ายลงปลูกได้ หรือเปลี่ยนอาหารใหม่โดยแยกกล๊อกซิเนียออกเป็นต้นเดี่ยวๆ แล้วย้ายลงในอาหารสูตร MS จะช่วยให้รากงอกได้ดีขึ้น

ไกรสร พุ่มพวง (2536) ชักนำยอดรวมจากส่วนยอดอ่อนของกล๊อกซิเนียซึ่งยาว 2-3 เซ็นติเมตร ในอาหารสูตร VW ที่มีไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำยอดได้เฉลี่ย 3.36 ยอด จากนั้นนำยอดที่ได้ไปชักนำรากโดยใช้อาหารสูตร VW ที่มี IAA, IBA และ NAA พบว่าสูตร VW ที่มี IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้มากที่สุด ทำการอนุบาลต้นอ่อนโดยนำต้นอ่อนมาปรับตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน แล้วล้างวุ้นออกให้หมดแช่น้ำ 5 นาที แล้วนำไปปลูกลงดินซึ่งผสมทราย 1 ส่วน ใบไม้ผุ 1 ส่วน และปุ๋ยคอก 1 ส่วน รดน้ำและดูแลให้แสงสว่างส่องถึง หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จนออกดอก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อชักนำแคลลัส พบว่าใช้เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด โดยเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เท่าที่กล่าวมาเป็นการขยายพันธุ์พืชซึ่งมักนิยมทำให้เกิดยอดรวมจากส่วนต่างๆ ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับนั้น ที่ทำกันมาก็โดยการผสมเกสรให้ได้พันธุ์แปลกใหม่ออกมา ซึ่งการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของไม้ดอกไม้ประดับต่างชนิดกันแล้วนำโปรโตพลาสต์มาหลอมรวมกัน ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้ โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ไม่มีผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์ถูกเอาออกโดยวิธีกลหรือโดยไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) (Cocking, 1972) Anderson (1974) สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จากทุกส่วนของแคลลัสที่ได้จากการนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และจากเซลล์ซัสเพนชั่น โดยในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสม ดังนี้

4.1 แรงดันออสโมติก

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่ถูกแยกออกมาแล้วไม่มีผนังเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ทำให้น้ำหรือสารต่างๆ ผ่านเข้าออกสู่โปรโตพลาสต์ได้ง่าย ซึ่งมีผลต่อแรงดันออสโมติกภายในโปรโตพลาสต์ ดังนั้นโปรโตพลาสต์จึงต้องอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตกหรือหด สารเคมีที่ใช้ปรับระดับแรงดันออสโมติก เรียกว่า ออสโมติคัม (osmoticum) มักใช้น้ำตาล เช่น กลูโคส หรือ ซูโครส และน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอลหรือซอร์บิทอล อาจใช้แต่ละชนิดเดี่ยวๆ หรือผสมกันก็ได้ ออสโมติคัมเหล่านี้ผสมกับสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปร-โตพลาสต์และในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบ มักใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัม ส่วนจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงหรือจากเซลล์แขวนลอย ใช้กลูโคสและซอร์บิทอลแทน (Kao and Michayluk, 1974)

ความเข้มข้นของออสโมติคัม ที่ใช้สำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีตั้งแต่ 0.25 - 1.0 โมลาร์ ขึ้นกับชนิดของพืช Wallin และ Eriksson (1973) พบว่าซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์เหมาะสมที่สุดสำหรับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์ซัสเพนชั่นแครอท การเติมซอร์บิทอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 โมลาร์เป็นต้นไปในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะทำให้โปรโต-พลาสต์แบ่งตัวได้ช้าและน้อย

ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของออสโมติคัม มักจะสูงกว่าของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์ซัสเพนชั่น เช่น Nagata และ Takebe (1971) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบยาสูบใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ Chen และ Ku (1985) ใช้กลูโคสเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วย Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) ใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น Teo และ Neumann (1978) พบว่าซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ เหมาะสมสำหรับการแยกและเพาะเลี้ยง

โปรโตพลาสต์จากใบ และจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลเรแนนแทนด้า (*Renantanda* Rosalind Choek.) Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์จากใบและกลีบดอกของกล้วยไม้หลายสกุล เช่น คัทลียา ฟาแลนน็อฟซิส เด็นโดรเบี้ยม และ รองเท้านารี โดยใช้ซอร์บิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พัฐวดี ทองสีด่า (2535) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้าจักก๊วน ในน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ Evans และ Bravo (1983) กล่าวว่า แรงดันออสโมติกที่สูงเกินไป ทำให้เมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์เสียหายได้ ส่วนแรงดันออสโมติกที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตก

4.2 เอนไซม์และความเข้มข้น

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้น ขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ สารละลายเอนไซม์ที่ละลายในออสโมติคัมจะประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ของพืชมี 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มเซลลูเลส (Cellulases) เช่น เซลลูเลส, ไดรซีเลส (Driselase) และเซลลูไลซิน (Cellulysin) กลุ่มเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulases) เช่น เฮมิเซลลูเลสและโรไซม์ (Rhozyme) และกลุ่มเพกติเนส (Pectinases) เช่น เพกติเนส, มาเซอโรไซม์ (Macerozyme) และเพกโตไลเอส (Pectolyase) (Evans and Bravo, 1983)

การแยกโปรโตพลาสต์ อาจใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกัน (enzyme combination) ก็ได้ จากการศึกษาพบว่าระดับพีเอชและอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยกลุ่มเซลลูเลสจะมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 4.5-5.0 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนกลุ่มเพกติเนสมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 5.5-6.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Nagata และ Takebe (1971) แยกโปรโตพลาสต์จากใบยาสูบ ใช้เอนไซม์

เซลลูเลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเพกโตไลเอส วาย 23 0.1 เปอร์เซ็นต์ Freason, *et al.* (1973) แยกโปรโตพลาสต์จากใบพิทูเนีย (*Petunia*) ใช้เซลลูเลส 1.2 เปอร์เซ็นต์และมาเซอโรไซม์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ Chen และ Ku (1985) แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยใช้มาเซอโรไซม์ 2 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว ส่วนพัฐวดี ทองสีด่า (2535) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้าจักก๊วน โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว

4.3 แหล่งโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่างกัน เช่น จากแคลลัส ใบ หรือรากของพืช มีความต้องการสภาวะต่างๆสำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงต่างกันด้วย Evans และ Bravo (1983) กล่าวว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อของพืช เช่น ใบ ราก และเรณู ต้องใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงๆ และใช้เวลาในการอินคูเบชั่นนานกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัส Kao และ Michayluk (1980) ทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบอัลฟาฟา (alfalfa) พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อน ใช้เวลาในการแยกน้อยกว่า และมีค่าการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์(plating efficiency) มากกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบแก่ Price และ Earle (1984) แยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้หลายสกุลจากส่วนต่างๆ คือ โปรโตคอร์ม, ราก, ใบ และ กลีบดอก พบว่า ในการแยกโปรโตพลาสต์จากโปรโตคอร์มใช้เวลาในการอินคูเบชั่นนานที่สุด และได้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยที่สุด ส่วนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบแตกง่าย ส่วนกลีบดอกให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งอื่น โปรโต-พลาสต์ที่ได้จากกลีบดอกเด็นโดรเบี้ยม จะมีสีตั้งแต่ม่วงเข้มจนถึงม่วงจาง พัฐวดี ทองสีด่า (2535) ศึกษาขนาดของใบที่ใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ของอะแรนด้าจักก๊วน พบว่าขนาดของใบที่มีความยาวน้อยกว่า 1 เซ็นติเมตร ให้จำนวนโปร-โตพลาสต์มากกว่าใบที่มีความยาวระหว่าง 1-3 เซ็นติเมตรและพบว่าใบให้จำนวน

โปรโตพลาสต์มากกว่าแคลลัส เมื่อใช้น้ำหนักเริ่มต้นของใบและแคลลัส 1 กรัม เท่ากัน

4.4 ขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์ให้สะอาด

หลังจากนำแหล่งโปรโตพลาสต์ต่างๆ เช่น ใบ หรือเซลล์แขวนลอยมาแช่ในสารละลายเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ออก จะได้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาปนกับเศษเซลล์อื่นๆ อยู่ในสารละลายเอนไซม์ การแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์เหล่านี้ นิยมใช้เทคนิคการกรองร่วมกับการเซ็นตริฟิวจ์ (filtration-centrifugation method) โดยใช้ตะแกรงกรอง nylon mesh หรือ stainless steel sieve ที่มีรูขนาด 25-100 ไมโครเมตร เซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 100 x g เป็นเวลา 1- 5 นาที (Evans and Bravo, 1983) มีข้อเสียคือ โปรโตพลาสต์อาจจะแตกได้ขณะที่ผ่านตะแกรงกรอง วิธีนี้จึงไม่เหมาะกับโปรโตพลาสต์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์บาง เช่น โปรโตพลาสต์จากใบ จึงใช้วิธีการลอยตัว (floatation method) แทน (Gamborg, *et al.*, 1981) การแยกโปรโตพลาสต์ออกจากสารละลายเอนไซม์โดยวิธีลอยตัวนั้น ทำได้โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์มาผสมกับสารละลายซูโครสเข้มข้น เช่น 0.6 โมลาร์ นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 500xg เป็นเวลา 5 นาที โปรโตพลาสต์ซึ่งมีความหนาแน่นน้อยกว่าเศษเซลล์ก็จะลอยตัวอยู่ข้างบน ส่วนเศษเซลล์ซึ่งหนักกว่าจะตกตะกอนอยู่ข้างล่าง

4.5 การเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์

โดยทั่วไปแล้วโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง มีความต้องการอาหารและปัจจัยต่างๆ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ แต่อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต้องเติมสารออสโมติคัมลงไปด้วย ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ มีดังนี้

4.5.1 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

Kao และ Michayluk (1975) กล่าวว่าจำนวนเซลล์หรือโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องมีจำนวนอย่างน้อย $1x10^5$ เซลล์หรือโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เซลล์หรือโปรโตพลาสต์จึงจะเจริญเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงทั่วไป

Loh และ Rao (1985) และ Koh, *et al.* (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงคือ $1x10^5$ และ $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนพัฐวดี ทองสีดำ (2535) รายงานจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นจากใบอะแรนด้าจักก๊วนในการเพาะเลี้ยง คือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

4.5.2 อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และสารควบคุมการเจริญเติบโต

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยทั่วไป มักใช้อาหารเพาะเลี้ยงมักใช้สูตร MS เป็นสูตรพื้นฐาน แล้วดัดแปลงโดยเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อให้เหมาะสมกับโปรโตพลาสต์ของพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เช่นกัน การเติมออกซินและไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง จะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่และเกิดการแบ่งตัว สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินที่นิยมใช้ ได้แก่ 2,4-D, NAA กลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA และ ไคเนติน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรโตพลาสต์ และการเพาะเลี้ยง (Eriksson, 1977) Price และ Earle (1984) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกลีบดอกเด็นโดรเบี้ยมในอาหารสูตร B5 พบว่าโปรโตพลาสต์มีชีวิตรอด 85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 12 วัน พัฐวดี ทองสีดำ (2535) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้าจักก๊วนในอาหารสูตร NT ที่มี 2,4-D กับ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ได้แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์

4.5.3 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีหลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบหยด (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 เปอร์เซ็นต์ หรือ เจลไรต์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทบางๆ ในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารเย็นจะแข็งและมีโปรโตพลาสต์ติดอยู่ข้างใน วิธีนี้เมื่อโปรโตพลาสต์เจริญเติบโตสามารถสังเกตได้ชัดเจน อีกวิธีทำโดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารที่แข็งแล้วก็ได้

4.5.4 การตรวจสอบความมีชีวิต และการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เสียก่อน วิธีการตรวจสอบมีหลายวิธี เช่น สังเกตการไหลเวียนของไซโทพลาสซึม (cyclosis) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าโปรโตพลาสต์นั้นยังมีกิจกรรมทางเมแทบอลิซึมอยู่ การเปลี่ยนแปลงขนาดของโปรโตพลาสต์เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารออสโมติคัม เช่น ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารออสโมติคัม โปรโตพลาสต์จะหดและมีขนาดเล็กลง หรือถ้าลดความเข้มข้นของสารออสโมติคัมโปรโตพลาสต์จะมีขนาดโตขึ้น เนื่องจากน้ำแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์มากขึ้น นอกจากนี้วิธีที่นิยมใช้กันมากอีกวิธีหนึ่งคือ การย้อมสี เป็นวิธีที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว สังเกตง่ายและให้ผลค่อนข้างแน่นอน สีที่ใช้ย้อมเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ สีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (fluorescein diacetate หรือ FDA) ฟีโนซาฟรานีน (phenosafranine)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

(Widholm, 1972) ส่วนการตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ใช้สีแคลคอฟลอร์ไวท์ (calcofluor white หรือ CFW) (Nagata and Takebe, 1970)

ตัวอย่างการแยกโปรโตพลาสต์ในพวกไม้ดอกไม้ประดับ เช่น การแยกโปรโตพลาสต์ของแอฟริกันไวโอเล็ตนั้น Grout(1990) กล่าวว่าสามารถใช้เอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์จากกลีบเลี้ยงและก้านใบ โดยเริ่มแรกนำชิ้นส่วนไปปรับระดับแรงดันออสโมติกในสารละลายเกลือ MS ที่มีน้ำตาลซอร์บิทอล 0.9 โมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปย่อยในสารละลายเอนไซม์ Onozuka R 10 cellulase เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาค่อนข้างนาน นอกจากนี้ Hughes (1981) ได้ใช้ใบและก้านใบจากต้นที่เป็นแฮพลอยด์ เป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์ และใช้เอนไซม์เซลลูไลซิน 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ และเพกติเนส 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนออสโมติคัมที่ใช้ปรับระดับแรงดันออสโมติกนั้น ใช้ส่วนผสมระหว่างน้ำตาลแมนนิทอล 0.27 โมลาร์ ร่วมกับ น้ำตาลซอร์บิทอล 0.27 โมลาร์

Mii และ Cheng (1982) อ้างโดย Mii, *et al.* (1990) ได้แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ใบของคาร์เนชั่นและเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลแมนนิทอล 0.7 ไมโครโมลาร์, NAA 54 ไมโครโมลาร์ และ BA 2.4 ไมโครโมลาร์ พบว่าประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของโปรโตพลาสต์ มีการแบ่งตัวและเกิดเป็นเซลล์โคโลนีขึ้นมา นอกจากนี้เขายังรายงานเพิ่มเติมว่าการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์จะเกิดขึ้นเมื่อเลือกใช้ใบในระยะก่อนที่ใบจะขยายตัวเต็มที่ ถ้าใช้ใบแก่โปรโตพลาสต์จะไม่แบ่งตัวภายใต้สภาวะเดียวกับใบอ่อน ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่มีอยู่ประมาณ $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากเซลล์โคโลนีที่ได้นั้น มีการเจริญต่อไปเป็นรากแต่ไม่เกิดต้นขึ้นมา

Kameya (1975) สามารถชักนำต้น Geranium จากโปรโตพลาสต์ที่มาจากเซลล์ใบได้สำเร็จ ส่วน Abo El - Nil และ

Hildebrandt (1976) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มาจากเซลล์ซัสเพนชั่นจนสร้างเป็นเซลล์โคโลนีได้สำเร็จ แต่ยังไม่อาจชักนำต้นจากเซลล์โคโลนีเหล่านี้

โปรโตพลาสต์ของพิทูเนียนั้นได้มีการแยกจากหลายแหล่งเช่น กลีบดอก เรณู โอวูล แต่นิยมแยกจากเซลล์ใบและเซลล์ซัสเพนชั่น Frearson (1973) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *Petunia hybrida* โดยดึงเอพิเดอมิสของใบออก หรือตัดเป็นแผ่นเล็กๆ จากนั้นทำ preplasmolyze เซลล์ก่อน โดยการใช้สารละลายที่มีออส์โมติคัมสูง การทำเช่นนี้เป็นการลด multinucleate protoplasts ที่เกิดจากการรวมตัวกันในระหว่างแยกโปรโตพลาสต์ และทำให้เพิ่มความมีชีวิตดีขึ้น นอกจากนี้การเติมแคลเซียมหรือการใช้เกลืออนินทรีย์ในสูตร MS ที่เจือจาง จะช่วยในเรื่องการเพาะเลี้ยง การเจริญของโปรโตพลาสต์นั้น พบว่าทั้งออกซินและไซโทไคนินมีความจำเป็นในการที่เจริญไปเป็น macrocallus เมื่อถึงขั้นนี้ไซโทไคนินก็ไม่จำเป็นอีกต่อไป

วัตถุประสงค์

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนีย

เพื่อนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นกล๊อกซิเนีย จากส่วนใบ ก้านใบ ยอดอ่อน หัวและลำต้น โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ศึกษาความเข้มข้นของ BA NAA และอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด

1.2 ศึกษาอิทธิพลของอาหารที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง BA และ NAA

1.3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของออกซิน ที่เหมาะสมต่อการเกิดราก

1.4 การอนุบาลต้นกล๊อกซิเนียหลังจากออกจากขวดเพาะเลี้ยง

2. การแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ระดับออสโมลาริตี้
- ชนิดของเอนไซม์
- ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม
- อุณหภูมิที่ใช้ในการอินคูเบชั่น
- ขนาดความยาวของใบ
- การเก็บใบไว้ในที่มืด

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

ศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

- จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น
- วิธีการ
- ชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

พืชทดลอง

พืชที่ใช้เป็นตัวอย่างในการทดลอง คือ กล็อกซิเนีย *(Sinningia speciosa* Benth. & Hook.*)* ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ส่วนใบ ก้านใบ ยอดอ่อน หัว และลำต้น

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ

- เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (MS) (1962)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ NAA, BA, 2,4-D, IBA และ IAA
- สารเคมีบัฟเฟอร์ คือ MES
- สารเคมีสำหรับย้อมตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ คือ ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต และ แคลคอฟลอร์ไวท์ ตามลำดับ
- เอนไซม์ ได้แก่ Cellulase "ONOZUKA" R-10 (Yakult Honsha Co., Ltd. Lot#201050), Driselase (Kyowa Hakko Co., Ltd. Lot#4111)

เครื่องแก้ว

เครื่องแก้วและพลาสติกต่างๆ ได้แก่ กระบอกตวง ฟลาสก์ บิกเกอร์

แท่งแก้วคน ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ขวดพลาสติก พาสเจอร์ปิเปต ปิเปต ไมโครปิเปต จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร ตะแกรง กรองขนาด 43 ไมโครเมตร สไลด์ กระจกปิดสไลด์ และสไลด์นับเม็ดเลือด

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เตาแม่เหล็กไฟฟ้า
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง
- หม้อนึ่งอัดไอ
- เตาอบไมโครเวฟ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์

- ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow carbinet)
- เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตะเกียง แอลกอฮอล์ ปากคีบ มีดผ่าตัด จานเพาะเลี้ยง เป็นต้น

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์

- เครื่องปั่นแยกพร้อมหลอดทดลอง
- เครื่องกรองจุลินทรีย์
- กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

เครื่องเขย่าที่ปรับอุณหภูมิได้

กล้องจุลทรรศน์แบบต่างๆ

- กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)
- กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซ็นซ์ (fluorescence microscope Olympus model BH2-RFL) ที่ใช้ Mercury lamp OSRAM HBO 100 W เป็นแหล่งกำเนิดแสง

- กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด (inverted microscope)

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

ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยง ติดหลอดไฟโกรลักซ์ให้ความเข้มแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนีย

1.1 ศึกษาความเข้มข้นของ BA NAA และอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด

วิธีการทดลอง

1.1.1 แยกชิ้นส่วนของต้นกล๊อกซิเนียที่ปลอดเชื้อได้แก่ ใบ ก้านใบ ลำต้น ยอดอ่อน และหัว นำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS โดยชุดที่ 1 เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 2 เติม NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 3 ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช แต่ละสูตรอาหารทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ขวด โดยมีวิธีการวางชิ้นส่วนพืชที่แยกไว้ลงในอาหารแต่ละซ้ำ ทุก ๆ 20 ขวด ดังนี้

ขวดที่	1-4	ใช้	ใบ
ขวดที่	5-8	ใช้	ก้านใบ
ขวดที่	9-12	ใช้	ลำต้น
ขวดที่	13-16	ใช้	ยอดอ่อน
ขวดที่	17-20	ใช้	หัว

1.1.2 การบันทึกผล

ตรวจดูผลการเจริญเติบโตของยอด เช่น จำนวนและขนาดของยอด สีใบและลำต้น เปรียบเทียบกันในระยะเวลาที่เท่ากัน และบันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

1.2 ศึกษาอิทธิพลของอาหารที่ใช้ BA ร่วมกับ NAA

วิธีการทดลอง

1.2.1 แยกชิ้นส่วนต้นกล๊อกซิเนียที่ปลอดเชื้อออกเป็นใบ ก้านใบ ยอดอ่อน หัว และ ลำต้น นำชิ้นส่วนพืชดังกล่าวมาวางบนอาหารที่เตรียมได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นคอมบิเนชั่นของอาหาร 16 สูตร โดยแต่ละสูตรอาหารทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ขวด วิธีการวางชิ้นส่วนพืชดังวิธีการในการทดลองที่ 1.1

1.2.2 การบันทึกผล

ตรวจดู จำนวน และขนาดของยอดที่เกิด สีใบและลำต้น เปรียบเทียบผลที่ได้ในอาหารแต่ละสูตร ในระยะเวลาที่เท่ากัน บันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง บันทึกผลการเกิดรากบริเวณโคนต้น ความยาว ขนาด และจำนวนรากที่เกิด

1.3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของออกซินที่เหมาะสมต่อการเกิดราก

วิธีการทดลอง

1.3.1 แยกยอดกล๊อกซิเนียออกเป็นยอดเดี่ยวๆ ยอดที่ตัดมาทำการชักนำราก ควรมีความยาวของลำต้นจากปลายยอดถึงโคนที่ตัดยาวประมาณ 4 เซ็นติเมตร มีจำนวนใบประมาณ 4-5 ใบขึ้นไป นำยอดเดี่ยวๆ ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งหมด 4 ชุด โดยชุดที่ 1 อาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 2 อาหารสูตร

MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 3 อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 4 อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ชุดละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด ๆ ละ 1 ต้น

1.3.2 การบันทึกผล

บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ที่ทำให้เกิดรากขึ้น สังเกตลักษณะ ขนาด และจำนวนรากในอาหารแต่ละสูตร เปรียบเทียบการเกิดรากในอาหารทั้ง 3 สูตร กับรากที่เกิดจากการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

1.4 การอนุบาลต้นกล้อกชิเนียหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยง

วิธีการทดลอง

1.4.1 นำต้นกล้อกชิเนียจากการทดลอง มาปรับอุณหภูมิภายนอกห้องเพาะเลี้ยง 1 วัน แล้วล้างวุ้นออกให้หมด แช่น้ำทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปลูกในดินที่ผสมไว้ และรดน้ำบริเวณโคนต้น และต้องคอยดูแลการให้น้ำและแสงให้เพียงพอ เลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ ให้เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุกสัปดาห์จนออกดอก

1.4.2 การเก็บข้อมูล

บันทึกผลการการทดลอง ตลอดจนระยะเวลาที่อนุบาลจนกระทั่งออกดอก

2. การแยกโปรโตพลาสต์กล้อกชิเนีย

พืชทดลอง

ใช้ใบอ่อนจากต้นกล้อกชิเนียที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลือกเอาใบที่มีความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร การทดลองทุกครั้งใช้ใบกล้อกชิเนียน้ำหนักสด 1 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ทุกการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

วิธีเตรียมสารละลายเอนไซม์

1. เตรียมสารละลายซอร์บิทอลให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์และเมส อย่างละ 20 มิลลิโมลาร์ลงในสารละลายซอร์บิทอล ปรับพีเอชตามต้องการด้วยสารละลายโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการอบด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

2. เตรียมสารละลายเอนไซม์ชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ ปรับพีเอชให้เท่ากับพีเอชของสารละลายซอร์บิทอล

3. นำไปเซ็นตริฟิวจ์เอาส่วนที่ไม่ต้องการออกจากเอนไซม์ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสของสารละลายเอนไซม์มาใช้ ทิ้งตะกอนไป ทำซ้ำอีกครั้ง

4. ทำเอนไซม์ให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอนไซม์ไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. เมื่อต้องการแยกโปรโตพลาสต์ ให้เตรียมสารละลายเอนไซม์ โดยการนำสารละลายในข้อ 1 ผสมกับสารละลายในข้อ 4 ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตรในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีเตรียมวอชชิ่งโซลูชั่น

1. เตรียมสารละลายซอร์บิทอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายเอนไซม์ เติมแคลเซียมคลอไรด์และเมส อย่างละ 10 มิลลิโมลาร์

2. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการอบด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

นำใบกล๊อกซิเนียน้ำหนักสด 1 กรัม ใช้มีดผ่าตัดตัดใบกล๊อกซิเนียตามความยาวของใบออกเป็นเส้นยาวๆ แล้วนำลงไปในสารละลาย

เอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร หุ้มจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปศึกษาตามสภาวะต่างๆที่ต้องการ

วิธีการล้างโปรโตพลาสต์

1. แยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ ในสารละลายเอนไซม์ โดยการกรองด้วยตะแกรงกรองขนาด 43 ไมโครเมตร

2. นำสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ ไปเซ็นตริฟิวจ์ที่ 100 x g เป็นเวลา 1 นาที

3. ดูดสารละลายเอนไซม์ออกด้วยพาสเจอร์ปิเปต แล้วแขวนลอยโปรโตพลาสต์ในวอชชิ่งโซลูชั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเซ็นตริฟิวจ์อย่างเดิม ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

4. แขวนลอยโปรโตพลาสต์ไว้ในวอชชิ่งโซลูชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการเก็บผลการศึกษา

ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในวอชชิ่งโซลูชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่สไลด์สำหรับนับเม็ดเลือดซึ่งมีปริมาตรข้างละ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร สังเกตลักษณะและนับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า แต่ละซ้ำนับจำนวนโปรโตพลาสต์ 10 ครั้ง บันทึกผล

วิธีเตรียมโปรโตพลาสต์สำหรับการเพาะเลี้ยง

1. ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในวอชชิ่งโซลูชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่มีสารละลายซูโครสเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

2. นำไปเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 200 x g เป็นเวลา 5 นาที

3. ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ข้างบน มาล้างด้วยวอชชิ่งโซลูชั่น 1 ครั้ง

4. ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ตามต้องการในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยง

วิธีตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

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

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

วิธีตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

1. ผสมสารละลายสีแคลคอฟลอร์ไวท์เข้มข้น 0.1 เปอร์-เซ็นต์ ในสารละลายวอชชิ่งโซลูชั่นที่มีความเข้มข้นของสารปรับระดับความดันออส-โมติกเหมือนกับอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ใช้สารละลายสีปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

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

ในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนียนั้น ได้ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่

เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ ตามลำดับดังนี้คือ ระดับออสโมลาริตี้ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการอินคูเบชั่น ขนาดของใบ และ การเก็บใบไว้ในที่มืด

วิธีการศึกษา ทำได้ดังนี้

2.1 ระดับออสโมลาริตี้

นำใบกล๊อกซิเนียมาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.3, 0.4 และ 0.5 โมลาร์ สังเกตเซลล์ทุกชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง สังเกตลักษณะและตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ บันทึกผล

2.2 ชนิดของเอนไซม์

นำใบกล๊อกซิเนียมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ นำไปอินคูเบทและเขย่า 40 รอบต่อนาที ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลาต่างๆ คือ 4, 5 และ 6 ชั่วโมง บันทึกผล

2.3 ระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสและช่วงเวลาที่เหมาะสม

นำใบกล๊อกซิเนียมาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ นำไปอินคูเบทและเขย่า 40 รอบต่อนาที ในเวลาต่างๆ คือ 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลาดังกล่าว บันทึกผล

2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการอินคูเบชั่น

นำใบกล๊อกซิเนียมาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 5 ชั่วโมง บันทึกผล

2.5 ขนาดความยาวของใบ

นำใบกล๊อกซิเนียขนาดความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร และน้อยกว่า 2.5 เซ็นติเมตร อย่างละ 1 กรัม มาแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 5 ชั่วโมง บันทึกผล

2.6 การเก็บใบไว้ในที่มืด

นำต้นกล๊อกซิเนียที่จะใช้ใบในการแยกโปรโตพลาสต์ ไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบที่มีขนาดยาวกว่า 2.5 เซ็นติเมตร ไปแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบระหว่างต้นที่เก็บใบไว้ในที่มืดกับต้นที่ไม่ได้เก็บใบไว้ในที่มืด

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

3.1 วิธีเตรียมอาหาร

3.1.1 ชั่งสารเคมีต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสูตร MS (ภาคผนวก) ให้ได้น้ำหนักตามต้องการ ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนด พร้อมทั้งปรับความเป็นกรดด่าง

3.1.2 ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร สำหรับอาหารเหลว และอบนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับอาหารแข็งและกึ่งแข็งกึ่งเหลว

3.2 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

นำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร สูตร MS ที่มี 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ $1x10^5$, $5x10^5$ และ $1x10^6$ โปรโตพลาสต์

ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดและที่สว่างในห้องเพาะเลี้ยง สังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตด และตรวจสอบความมีชีวิตหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3, 5, 7 และ 9 วัน บันทึกผล

3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีต่างๆ ในจานเลี้ยงเชื้อ กำหนดให้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง คือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงในที่มืด ในอาหารเหมือนการทดลองข้อ 3.2 โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร ปริมาตรอาหาร 3 มิลลิลิตร หุ้มจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม

วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารแข็ง

วิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

สังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ทุกวันหลังจากการเพาะเลี้ยง ตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เก็บผลใน 3 สัปดาห์

3.4 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์จำนวน $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ

สูตรที่ 1 อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS ที่มี NAA กับ BA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 5 อาหารสูตรที่ 1 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 6 อาหารสูตรที่ 2 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 7 อาหารสูตรที่ 3 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์

สูตรที่ 8 อาหารสูตรที่ 4 แทนที่ซอร์บิทอลด้วยซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์

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

สูตรที่ 10 อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D กับ NAA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์

บันทึกผลภายใน 3 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง โดยสังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ ตรวจสอบความมีชีวิต การสร้างผนังเซลล์ใหม่ และการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในอาหารแต่ละสูตร

3. ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนีย

1.1 ศึกษาความเข้มข้นของ BA NAA และอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดและการเพิ่มจำนวนยอด

1.1.1 การชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่มี BA

หลังจากทำการชักนำยอดจากส่วนต่างๆ ของกล๊อกซิเนียในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกชิ้นส่วนพืชสามารถชักนำยอดรวมได้ในอาหารทุกสูตร โดยเฉพาะจากใบสามารถชักนำยอดรวมได้ดีที่สุดในทุกความเข้มข้น ส่วนก้านใบชักนำยอดรวมได้น้อยที่สุดในทุกความเข้มข้น ดังแสดงผลในตารางที่ 1

ยอดที่ชักนำได้มีความสูงเฉลี่ย 0.5 เซ็นติเมตรต่อยอด หลังจากเพาะเลี้ยงไป 90 วัน โดยในระยะ 30 วันแรกของการเพาะเลี้ยง พบว่าส่วนต่างๆ ที่นำมาเพาะเลี้ยง เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นตุ่มที่จะเจริญไปเป็นยอดต่อไป หลังจากการเพาะเลี้ยง 90 วันได้ยอดที่สมบูรณ์ โดยยอดที่ชักนำได้มีลักษณะเป็นยอดรวม เกิดแน่นเป็นกระจุก แยกเป็นยอดเดี่ยวๆ ได้ยาก ใบมีสีเขียวค่อนข้างเข้มและมีลักษณะอวบหนา แต่มีขนาดเล็ก ลำต้นมีสีเขียวอ่อน

ในอาหารที่มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมจากใบได้มากที่สุดเฉลี่ย 69.0 ยอดต่อใบ ส่วนในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดรวมได้น้อยที่สุดเฉลี่ย 44.8 ยอดต่อใบ ดังแสดงผลในรูปที่ 1 ส่วนอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดรวมได้มากเช่นกันเมื่อเทียบกับในความเข้มข้นอื่น ๆ

ตารางที่ 1 จำนวนยอดรวมที่เกิดจากส่วนต่าง ๆ ของกล๊อกซิเนีย เมื่อชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน

ชนิดของอาหาร MS+BA (มก/ล)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช ($\bar{X}$±S.D.)				
	ใบ	ยอดอ่อน	ลำต้น	ก้านใบ	หัว
0.5	56.8±1.2	40.2±1.2	20.8±1.2	18.7±1.4	7.2±1.2
1.0	69.0±1.2	50.6±1.0	22.6±1.3	20.2±1.0	10.2±1.6
1.5	47.0±1.0	32.8±1.2	16.9±1.8	18.7±1.6	8.2±1.3
2.0	44.8±1.4	30.6±1.0	17.7±2.1	15.6±2.0	9.6±1.0

รูปที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอดรวมที่ชักนำได้จากใบ อายุ 90 วัน บนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ

1.1.2 การชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่มี NAA

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกล๊อกซิเนีย ในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกชิ้นส่วนสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 45 วัน พบว่าชิ้นส่วนต่างๆ เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นแคลลัสและราก หลังจากนั้นก็เริ่มเกิดยอดเดี่ยวๆ ขึ้นมาหลายๆ ยอด

ใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เป็นเวลา 90 วัน ทุกความเข้มข้นเกิดยอดได้มากกว่าส่วนอื่นๆ ดังแสดงผลในตารางที่ 2 และที่ความเข้มข้น NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 47.5 ยอดต่อใบ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นๆ พบว่าความเข้มข้นของ NAA มากขึ้น จำนวนยอดจะลดน้อยลงตามลำดับ แต่การเกิดแคลลัสกลับมากขึ้น นอกจากนี้จะเกิดรากด้วย โดยรากที่เกิดมีลักษณะสั้นลงและขนาดอ้วนขึ้น

หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน จะได้ยอดที่สมบูรณ์ คือเป็นยอดขนาดใหญ่ ใบอวบหนา สีเขียวเข้ม ลำต้นสีเขียวอ่อน มีราก 5-6 รากต่อต้น ลักษณะรากสั้นไม่แข็งแรง ดังแสดงผลในรูปที่ 2 การย้ายเลี้ยงยอดรวมทุก 2 เดือน ไปยังอาหารสูตรเดิมในขวดเพาะเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จะสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้มากขึ้น ยอดที่ได้เจริญเติบโตได้เร็วและดีขึ้น

1.1.3 การเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

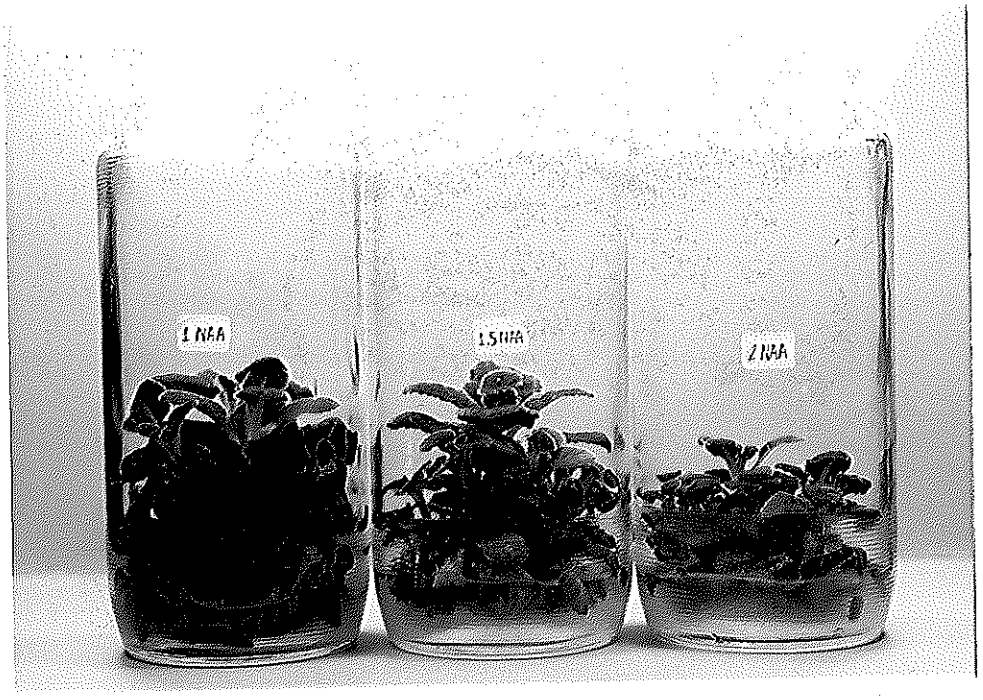
หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่าส่วนต่างๆ ที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะคล้ายๆ กัน กล่าวคือ เกิดรากบริเวณโคนรอยตัด

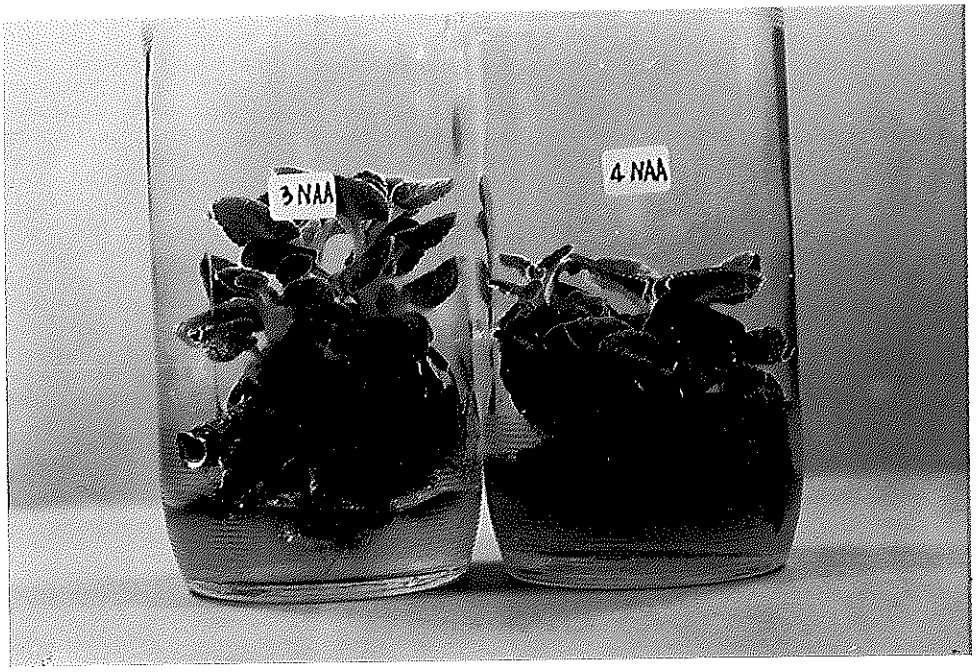
ลักษณะรากที่เกิดเป็นรากขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ค่อนข้างยาวและแตกรากแขนง หลังจากใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงทั้งหมด 45 วัน ชิ้นส่วนต่างๆ เริ่มมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล แม้จะมีการย้ายเลี้ยงก็ไม่สามารถช่วยให้เจริญต่อไปได้ ในระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 60 วัน พบว่าไม่มีส่วนใดที่สามารถให้

ยอดรวมได้ นอกจากนี้ส่วนใบ ก้านใบ ลำต้น และหัวจะกลายเป็นสีน้ำตาลไหม้และตายไปในที่สุด มีเพียงส่วนยอดอ่อนเท่านั้นที่เกิดรากบริเวณโคนยอดและสามารถเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ต่อไป แต่ไม่สามารถเกิดยอดรวมได้

ตารางที่ 2 จำนวนยอดที่เกิดจากเกิดจากส่วนต่างๆ ของกล๊อกซิเนีย เมื่อชักนำในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 90 วัน

ชนิดของอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช ($\bar{X}\pm$S.D.)				
MS+NAA (มก/ล)	ใบ	ยอดอ่อน	ลำต้น	ก้านใบ	หัว
1.0	47.50±2.3	30.2±1.5	10.6±1.2	3.2±0.6	4.5±0.8
1.5	24.75±3.3	23.1±1.6	9.1±1.3	3.0±1.0	4.0±0.7
2.0	16.60±1.9	15.0±2.3	8.0±0.6	2.5±1.0	3.5±1.0
3.0	15.00±2.0	10.6±1.6	9.7±1.2	2.5±1.2	4.0±0.8
4.0	7.60±2.5	5.2±0.7	2.4±0.6	1.0±0.0	3.5±1.0





รูปที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอดที่ชักนำได้จากใบในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 90 วัน

1.2 ศึกษาอิทธิพลของอาหารที่ใช้ BA ร่วมกับ NAA

หลังจากนำส่วนต่างๆของกล๊อกซิเนียมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ส่วนต่างๆของกล๊อกซิเนียเกิดเป็นยอดรวมได้หมด เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ประมาณ 45 วัน พบว่าส่วนต่างๆจะเริ่มเกิดตุ่มสีเขียวๆ ที่จะเจริญเป็นยอดต่อไป จากนั้นอีกประมาณ 15 วัน จะเกิดยอดให้เห็นชัดเจน ยอดที่เกิดมีความสูงโดยเฉลี่ย 2 เซ็นติเมตร ลักษณะยอดเป็นยอดเดี่ยวๆ ที่เกิดอยู่กันแน่นเป็นกระจุก แต่สามารถแยกเป็นยอดเดี่ยวๆ ได้ง่าย ใบมีสีเขียวสด ลำต้นสีเขียวอ่อน ต้นที่เกิดค่อนข้างสมบูรณ์ โดยที่โคนต้นจะเกิดหัวเล็กๆ และราก 5-6 รากต่อต้น แต่ขนาดรากค่อนข้างเล็กมากและขนาดสั้น ไม่เหมาะสมต่อการนำมาปลูกในธรรมชาติ ดังแสดงผลในรูปที่ 3

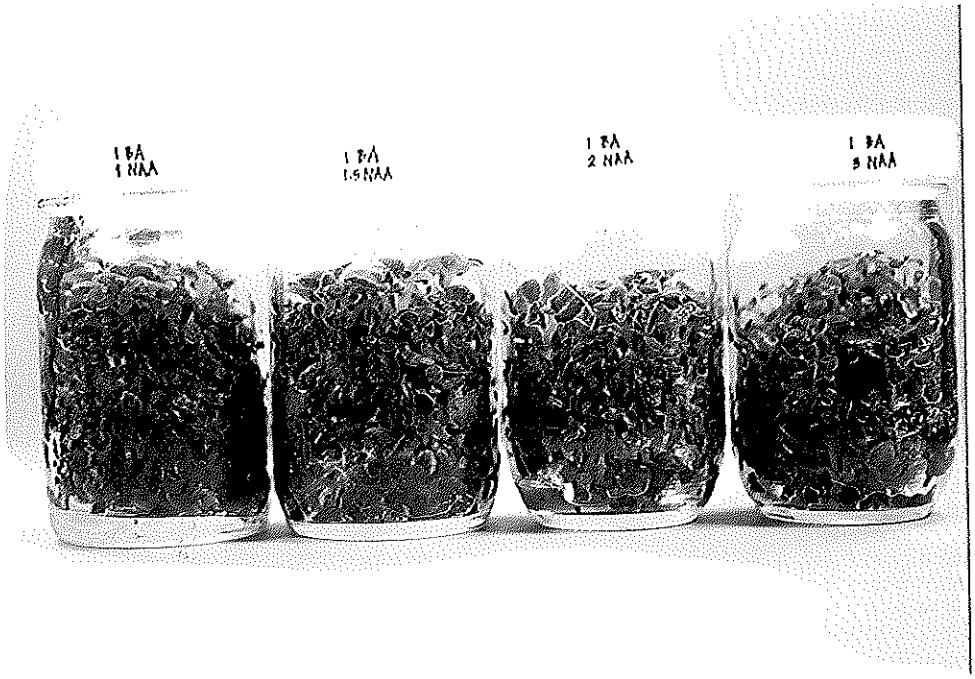
จากทุกชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงใบสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด โดยพบว่าอาหารที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 92.0 ยอดต่อใบ ดังแสดงผลในรูปที่ 4 และตารางที่ 3

การชักนำยอดรวมจากยอดอ่อน สามารถเกิดยอดรวมได้มากรองมาจากใบ โดยที่ความเข้มข้น NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดรวมมากที่สุดเฉลี่ย 75.0 ยอดต่อยอดอ่อน ซึ่งมากกว่ายอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงในความเข้มข้นอื่นๆ ดังแสดงผลในตารางที่ 4

การชักนำยอดรวมจากลำต้นสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้มากที่สุดในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ยอดเฉลี่ย 25.0 ยอดต่อลำต้น ดังแสดงผลในตารางที่ 5

การชักนำยอดรวมจากหัว สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้มากที่สุดในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA

รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเกิดยอดรวมและรากจากส่วนต่าง ๆ ของกล๊อกซิเนียใน อาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่น ระหว่าง BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 90 วัน



รูปที่ 4 แสดงการเกิดยอดรวมและรากจากใบในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่น ระหว่าง BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 90 วัน

1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ยอดเฉลี่ย 24.0 ยอดต่อหัว ดังแสดงผลในตารางที่ 6

ส่วนของก้านใบ พบว่าเกิดยอดรวมได้น้อยที่สุด โดยในอาหารที่เป็นสัดส่วนระหว่าง NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 18.0 ยอดต่อก้านใบ เท่านั้น ดังแสดงผลในตารางที่ 7

สรุปผลจากการทดลองชักนำยอดรวมทั้งหมด พบว่าในอาหารที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำยอดรวมมากที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NAA และ BA จะเสริมให้เกิดยอดรวมได้ดี และเกิดรากในแต่ละยอดในขณะเดียวกันด้วย

ตารางที่ 3 ผลการชักนำยอดรวมจากใบของกล้อกซิเนีย ในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรกับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

BA (มก/ล) \ NAA (มก/ล)	1.0	1.5	2.0	3.0
	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อใบ ($\bar{X}\pm$S.D.)			
1.0	92.0±2.1	86.8±8.4	82.9±9.2	77.0±12.3
1.5	90.0±6.8	86.8±8.5	81.4±9.7	75.5±15.6
2.0	88.0±8.4	84.4±9.9	79.6±10.5	74.6±15.3
3.0	79.4±5.6	83.0±10.0	77.2±12.5	73.6±15.3

ตารางที่ 4 ผลการชักนำยอดรวมจากยอดอ่อนของกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรกับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

BA (มก/ล) \ NAA (มก/ล)	1.0	1.5	2.0	3.0
	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อยอดอ่อน ($\bar{X}\pm$S.D.)			
1.0	75.0±6.2	72.0±5.6	65.0±8.5	20.0±4.6
1.5	70.0±7.6	76.0±4.2	70.0±7.2	15.0±3.2
2.0	62.0±11.0	60.0±8.6	28.0±5.5	18.0±4.3
3.0	52.0±7.6	50.0±6.6	30.0±2.3	20.0±5.5

ตารางที่ 5 ผลการชักนำยอดรวมจากกล่าต้นกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรกับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

BA (มก/ล) \ NAA (มก/ล)	1.0	1.5	2.0	3.0
	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อล่าต้น ($\bar{X}\pm$S.D.)			
1.0	24.0±2.8	24.0±3.2	22.0±4.3	17.0±5.6
1.5	25.0±8.9	23.0±5.8	20.0±5.6	18.0±6.2
2.0	23.0±2.2	21.0±5.4	20.0±5.6	18.0±2.3
3.0	21.0±2.8	24.0±3.2	22.0±4.3	17.0±5.6

ตารางที่ 6 ผลการชักนำยอดรวมจากหัวกล๊อกซิเนีย ในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรกับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

BA (มก/ล) \ NAA (มก/ล)	1.0	1.5	2.0	3.0
	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อหัว ($\bar{X}$±S.D.)			
1.0	24.0±6.6	22.0±4.3	20.0±6.8	19.0±6.2
1.5	20.0±6.8	21.0±8.2	18.0±6.5	18.0±5.3
2.0	20.0±4.3	18.0±8.2	20.0±6.5	10.0±5.3
3.0	18.0±6.2	15.0±5.3	15.0±2.8	10.0±1.2

ตารางที่ 7 ผลของการชักนำยอดรวมจากก้านใบของกล๊อกซิเนีย ในอาหารสูตร MS ที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

BA (มก/ล) \ NAA (มก/ล)	1.0	1.5	2.0	3.0
	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อก้านใบ ($\bar{X}$±S.D.)			
1.0	18.0±1.7	7.0±1.7	5.0±2.8	5.0±1.3
1.5	9.0±2.4	8.0±2.6	5.0±1.8	5.0±1.2
2.0	10.0±2.8	9.0±2.4	7.0±1.8	4.0±1.2
3.0	7.0±1.7	1.0±0.0	7.0±2.1	3.0±1.0

1.3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของออกซินที่เหมาะสมต่อการเกิดราก

หลังจากนำยอดกล๊อกซิเนียมาชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่มี IAA IBA และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติมออกซิน ยอดจะเกิดรากได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มีออกซิน และเมื่อเปรียบเทียบรากที่เกิดจากอาหารที่มีและไม่มีออกซินแล้ว พบว่าในอาหารที่มีออกซิน จะมีรากเกิดมากกว่าและแข็งแรงกว่า โดยอาหารที่มี IAA เกิดรากสีขาว แข็งแรง มีขนาดยาว และแตกแขนง โดยที่ IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากได้สูงสุดเฉลี่ย 35.5 รากต่อยอด ดังแสดงผลในตารางที่ 8 และรูปที่ 5

ในอาหารที่มี IBA เกิดรากได้ดี มีลักษณะอวบใหญ่ สีขาว แข็งแรง มีขนาดยาวและแตกแขนง โดยที่ IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากได้สูงสุดเฉลี่ย 40 รากต่อยอด ดังแสดงผลในตารางที่ 9 และรูปที่ 6

ในอาหารที่มี NAA รากที่ได้มีสีขาวใส ขนาดเล็ก ไม่แข็งแรง โดยที่ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนรากได้สูงสุดเฉลี่ย 30 รากต่อยอด ดังแสดงผลในตารางที่ 10 และรูปที่ 7

ส่วนในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตซ่นิดออกซิน รากที่ได้มีสีขาวใส ขนาดเล็ก ไม่แข็งแรง เกิดรากเฉลี่ย 23.7 รากต่อยอด

1.4 การอนุบาลต้นกล๊อกซิเนียหลังจากออกจากขวดเพาะเลี้ยง

นำต้นกล๊อกซิเนียที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงจากห้องทดลองมาปรับอุณหภูมิที่อุณหภูมิภายนอก 1 วัน หลังจากนั้นนำต้นกล๊อกซิเนียที่ได้มาล้างวุ้นออกให้หมดด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้น แช่รากไว้ในน้ำนาน 5 นาที แล้วนำต้นที่ได้ไปปลูกในดินที่ผสมตามอัตราส่วน ทราย 1 ส่วน : ใบไม้ผุ 1 ส่วน : ปุ๋ยคอก 1 ส่วน ซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการปลูกต้นกล๊อกซิเนีย ที่เตรียมไว้แล้วในกระถาง หลังจากปลูกแล้วนำไปพักไว้ในที่ร่ม รดน้ำวันเว้นวัน แต่ควรนำถุงพลาสติกมาคลุมไว้ เพื่อให้ต้นกล๊อกซิเนียปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอก หลัง

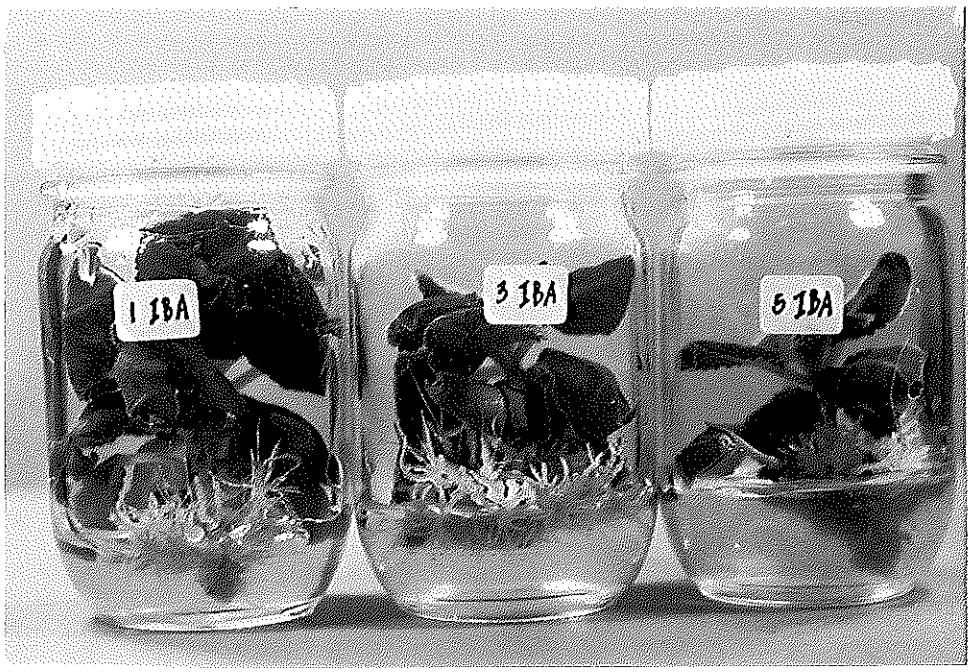
ตารางที่ 8 จำนวนรากที่ชักนำได้จากยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่มี IAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดของอาหาร MS + IAA (มก/ล)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด ($\bar{X}\pm$S.D.)
1	20.0±3.5
3	35.5±3.5
5	29.0±1.0

รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่มี IAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 30 วัน

ตารางที่ 9 จำนวนรากที่เกิดจากยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดของอาหาร MS + IBA (มก/ล)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด ($\bar{X}\pm$S.D.)
1	35.0±4.2
3	40.0±3.3
5	30.2±1.5



รูปที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน

ตารางที่ 10 จำนวนรากที่เกิดจากยอดกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดของอาหาร MS + NAA (มก/ล)	จำนวนรากเฉลี่ยต่อยอด ($\bar{X}\pm$S.D.)
1	20.0±5.3
3	30.0±2.5
5	15.0±4.8

รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของรากในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน

จากนั้นประมาณ 2 สัปดาห์ ต้นกล๊อกซิเนียเริ่มแตกกิ่งก้านสาขา ยอดอ่อนและใบใหม่ขึ้นมา ดังแสดงผลในรูปที่ 8 ในระยะนี้ต้องเริ่มให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุกๆ สัปดาห์ โดยนำมาผสมน้ำรดบริเวณโคนต้น จะทำให้ใบมีขนาดใหญ่และต้นเจริญดี เมื่ออายุได้ประมาณ 1-2 เดือน จะเริ่มมีดอกอ่อนเกิดขึ้น ถ้าต้องการให้ดอกมีขนาดใหญ่และต้นสมบูรณ์ดี ควรจะเลี้ยงกล๊อกซิเนียในห้องปรับอากาศที่มีแสงส่องถึง ดังแสดงผลในรูปที่ 9

2. การแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

2.1 ระดับออสโมลาริตี้

เมื่อนำใบกล๊อกซิเนียน้ำหนัก 1 กรัมมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอล ซึ่งใช้เป็นสารออสโมติคัมความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.3, 0.4 และ 0.5 โมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมงจะเห็นว่าเซลล์ใบของกล๊อกซิเนียเกิดการหดตัว (plasmolysis) เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากผนังเซลล์แล้วเอนไซม์จะย่อยผนังเซลล์จนได้โปรโตพลาสต์หลุดลอกมา

เมื่อสังเกตโปรโตพลาสต์ทุกชั่วโมง พบว่าเริ่มมีโปรโตพลาสต์หลุดออกมาในชั่วโมงที่ 3 เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง สังเกตลักษณะและตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ ดังแสดงผลในตารางที่ 11 คือ ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.3 โมลาร์ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย ส่วนใหญ่โปรโตพลาสต์แตก ทำให้นับจำนวนไม่ได้ สังเกตได้จากมีเม็ดคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในสารละลายเอนไซม์ ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด คือ 3.3×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะกลม เต่ง และมีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แตกน้อยกว่า ส่วนที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.5 โมลาร์นั้นได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยกว่าที่ระดับ 0.4 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะหดไม่กลม แสดงว่าความเข้มข้นของสารปรับระดับออสโมลาริตี้สูงเกินไป

รูปที่ 8 ต้นกล๊อกซิเนียที่เริ่มปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกได้หลังจากนำมาปลูกในกระถาง 2 สัปดาห์

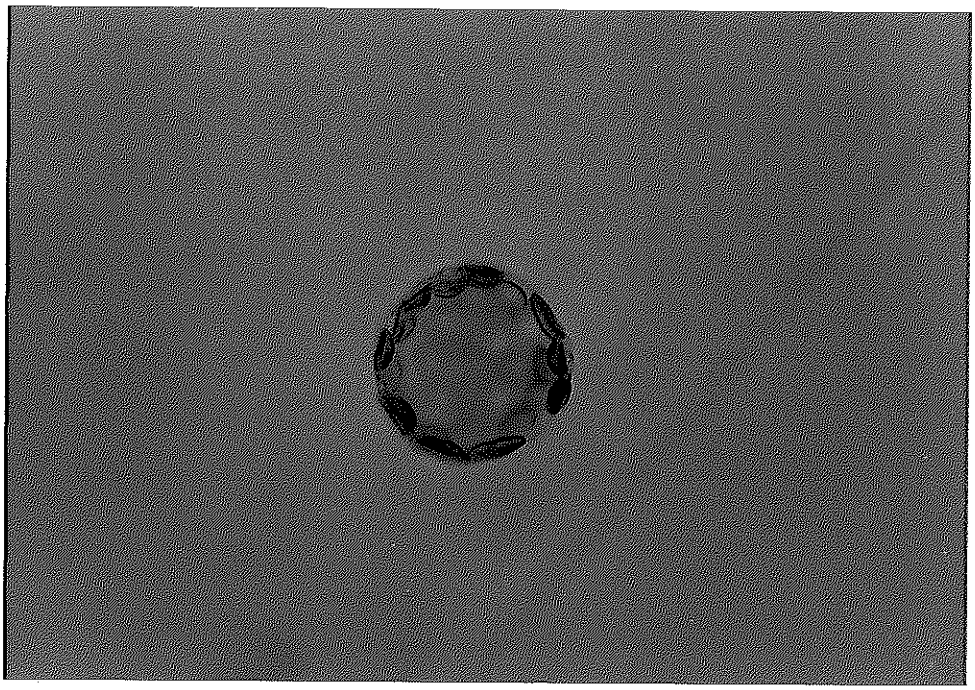
รูปที่ 9 ต้นกล๊อกซิเนียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์และให้ดอกสวยงาม

ดังนั้นระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนีย ในการศึกษาเรื่องสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ จึงได้เลือกสารละลายซอร์บิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นตัวควบคุมระดับออสโมลาริตี้

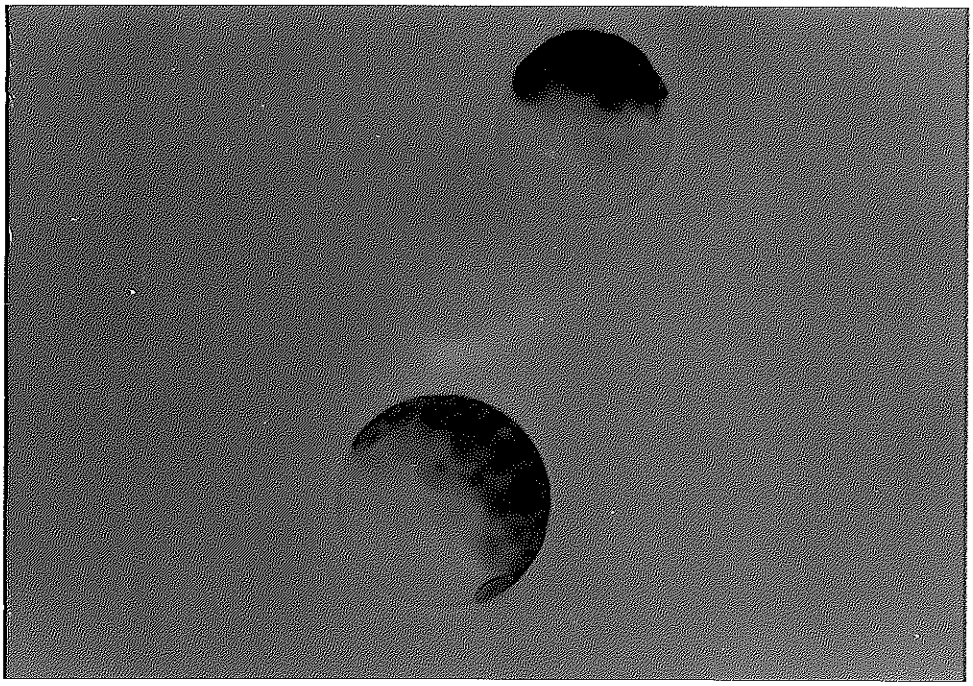
โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล๊อกซิเนียนั้น มีความแตกต่างกันชัดเจนในเรื่องของขนาดและการกระจายของเม็ดคลอโรพลาสต์ภายในโปรโตพลาสต์ ซึ่งมีหลายแบบ เช่น คลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ ดังแสดงผลในรูปที่ 10 และคลอโรพลาสต์อยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ดังแสดงผลในรูปที่ 11

ตารางที่ 11 จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนียที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.3, 0.4 และ 0.5 โมลาร์ ของสารละลายซอร์บิทอล

ระดับออสโมลาริตี้ (โมลาร์)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($\times 10^5$)				ลักษณะโปรโตพลาสต์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm S.D.$	
0.3	0.40	0.60	0.70	0.56 ± 0.22	กลม เต่งแตกมาก
0.4	3.20	3.30	3.60	3.36 ± 0.85	กลม เต่งแตกน้อย
0.5	2.40	2.10	2.50	2.33 ± 0.36	หด รูปร่างเปลี่ยว ไม่กลม



รูปที่ 10 โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เรียงตัวชิดเยื่อหุ้มเซลล์ (x165)



รูปที่ 11 โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์เรียงตัวอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง (x165)

บางโปรโตพลาสต์ไม่มีเม็ดคลอโรพลาสต์เลย ดังแสดงผลในรูปที่ 12 นอกจากนี้ภายในโปรโตพลาสต์บางอันจะเห็นเป็นสีชมพู ซึ่งเป็นผลมาจากการที่มีรงควัตถุอยู่นั่นเอง ดังแสดงผลในรูปที่ 13

2.2 ชนิดของเอนไซม์

เมื่อนำใบกล๊อกซิเนียมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลสและไดรซีเลส เข้มข้นอย่างละ 3 เปอร์เซ็นต์ และคอมบิเนชั่นของเซลลูเลสกับไดรซีเลสเข้มข้นอย่างละ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าเซลลูเลสเดี่ยวๆ เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ย่อยโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุดคือ 3.6×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

สำหรับไดรซีเลสนั้นพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยคือ 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ได้นั้นส่วนมากผนังเซลล์ยังถูกย่อยไม่สมบูรณ์เพราะมีรูปร่างโปรโตพลาสต์ที่ไม่กลมอยู่ด้วยและจะเริ่มพบเห็นโปรโตพลาสต์เมื่อผ่านการอินคูเบทไปแล้ว 4 ชั่วโมงในขณะที่เริ่มพบเห็นโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส เมื่ออินคูเบทไปประมาณ 3 ชั่วโมง ดังแสดงผลในตารางที่ 12

ส่วนคอมบิเนชั่นของเซลลูเลสกับไดรซีเลสนั้นสามารถแยกโปรโตพลาสต์ออกมาได้จำนวนมากกว่าไดรซีเลสเดี่ยวๆ แต่ไม่มากกว่าเซลลูเลสเดี่ยวๆ กล่าวคือเมื่อผ่านการอินคูเบชั่นไป 5 ชั่วโมงได้จำนวนโปรโตพลาสต์ออกมา 2.8×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 12 โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีคลอโรพลาสต์ (x165)

รูปที่ 13 โปรโตพลาสต์ที่มีรงควัตถุสีชมพู (x165)

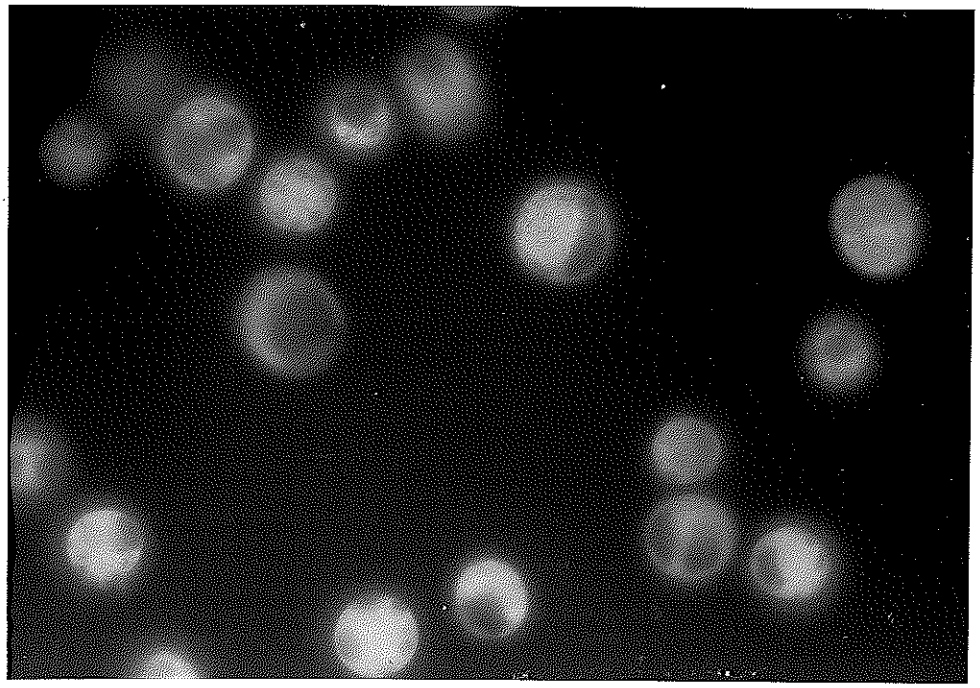
ตารางที่ 12 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของเอนไซม์เซลลูเลสและไดรซีเลส เข้มข้นอย่างละ 3 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของเอนไซม์	จำนวนโปรโตพลาสตต์ต่อมิลลิลิตรเฉลี่ย $\bar{X}\pm$S.D. ($\times10^5$)		
เวลา	4	5	6 (ชม.)
เซลลูเลส 3%	2.8±0.85	3.6±0.36	3.0±0.31
ไดรซีเลส 3%	1.2±0.22	1.5±0.10	1.4±0.24
เซลลูเลส 5% และ ไดรซีเลส 5%	2.2±0.50	2.8±0.22	2.5±0.34

2.3 ระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสและช่วงเวลาที่เหมาะสม

เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แยกโปรโตพลาสต์ของใบ สังเกตผลที่เวลา 4, 5 และ 6 ชั่วโมง โดยบันทึกจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ และตรวจความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ถ้าเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงเห็นเป็นสีเหลืองเขียว ดังแสดงผลในรูปที่ 14 ส่วนโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่เรืองแสง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาทดสอบว่าย่อยผนังเซลล์หมดแล้วหรือไม่ โดยนำโปรโตพลาสต์ไปย้อมสีแคลคอฟลอไวท์ ถ้าเป็นโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ คือผนังเซลล์ถูกย่อยหมดแล้ว จะไม่มีการเรืองแสงที่ขอบเซลล์

จากการทดลองศึกษาระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสและเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกชิเนีย พบว่าเซลลูเลสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ในการย่อย 5 ชั่วโมง จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด ได้ 3.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และความมีชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงผลในตารางที่ 13



รูปที่ 14 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงเห็นเป็นสีเหลืองเขียวเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (x165)

2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการอินคูเบชั่น

เมื่อนำใบกล๊อกซิเนีย มาแยกด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส บันทึกผลที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าการอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการอินคูเบชั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสทุกการทดลอง ดังแสดงผลในตารางที่ 14

2.5 เปรียบเทียบขนาดของใบ

จากการทดลองเปรียบเทียบขนาดความยาวของใบที่ใช้เป็นแหล่งโปร-โตพลาสต์ โดยการนำใบกล๊อกซิเนียที่มีความยาวแตกต่างกัน คือ ใบที่มีขนาดความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร และยาวน้อยกว่า 2.5 เซ็นติเมตร มาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายซอร์บิทอล 0.4 โมลาร์ เก็บผลที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาด

ตารางที่ 13 จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์กลีอกชิเนียที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4, 5 และ 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้	จำนวนโปรโตพลาสต์ ($x10^5$ $\bar{X}\pm S.D.$)	ความมีชีวิต (%)
1% 4 ชม.	1.60±0.34	95
1% 5 ชม.	1.90±0.40	95
1% 6 ชม.	1.80±0.23	90
2% 4 ชม.	2.30±0.54	95
2% 5 ชม.	2.60±0.26	90
2% 6 ชม.	2.70±0.25	87
3% 4 ชม.	2.90±0.50	92
3% 5 ชม.	3.50±0.49	90
3% 6 ชม.	3.30±0.56	85

ตารางที่ 14 จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบกลีอกชิเนียที่สภาวะการอินคูเบทที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$) ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm S.D.$
25	2.40	2.60	2.10	2.30±0.32
30	3.10	3.20	3.00	3.10±0.25

ความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ 3.2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าใบที่มีขนาดความยาวน้อยกว่า 2.5 เซ็นติเมตร ซึ่งได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพียง 2.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 15 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาดความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร มีขนาดเล็ก เม็ดคลอโรพลาสต์หนาแน่น แวคิวโอลน้อย ซึ่งเหมาะแก่การนำไปเพาะเลี้ยง ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาดความยาวน้อยกว่า 2.5 เซ็นติเมตร แตกง่าย ทำให้เห็นคลอโรพลาสต์ลอยอยู่ในสารละลายเป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 15 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีขนาดต่างกัน ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ความยาวของใบ (เซ็นติเมตร)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($\times 10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm S.D.$
>2.5	3.20	3.40	3.10	3.20 ± 0.10
<2.5	2.60	2.50	2.40	2.50 ± 0.15

2.6 การเก็บใบไว้ในที่มืด

เมื่อนำใบกล๊อกซิเนียที่ผ่านการเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปทำการแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อยู่ในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ บันทึกผลที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าใบที่เก็บไว้ในที่มืด จะให้โปรโตพลาสต์จำนวนมากกว่าใบที่ไม่ได้เก็บในที่มืด โดยมีจำนวน 2.2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบที่เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับใบที่ไม่ได้เก็บไว้ในที่มืด

สภาวะของใบ	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X}\pm S.D.$
เก็บไว้ในที่มืด	2.1	2.5	2.2	2.26 ± 0.23
ไม่ได้เก็บไว้ในที่มืด	1.5	1.4	1.8	1.56 ± 0.17

จากการศึกษาเรื่องสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกชิเนียนั้น สรุปได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสเดี่ยวๆ เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความเข้มข้นของซอร์บิทอล 0.4 โมลาร์เป็นออสโมติคัมเป็นเวลา 5 ชั่วโมง สามารถย่อยให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดได้ $3.6x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร การอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น ส่วนการศึกษาแหล่งโปรโตพลาสต์ พบว่าใบที่มีขนาดความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร เป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุด และการเก็บใบไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการแยกจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการไม่เก็บใบไนที่มืด

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้นั้น ก่อนนำไปศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ได้มีการตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ พบว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

3.1 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร NS ที่มี BA และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซอร์บิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง คือ $1x10^5$ $5x10^5$ และ$1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

โปรโตพลาสต์ทุกระดับความหนาแน่นที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 1 วัน เมื่อสังเกตลักษณะโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด พบว่ามีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่และยังมีชีวิต วันที่ 3 หลังจากการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ เม็ดคลอโรพลาสต์ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยง แสดงว่า ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนียในที่มีแสงไม่เหมาะสมต่อการมีชีวิตและการเจริญเติบโต

ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 และ 2 วัน นำมาสังเกตลักษณะ พบว่าทั้ง 3 จำนวน โปรโตพลาสต์ยังมีชีวิตและยังมีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์ที่มีจำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เริ่มเกาะกันเป็นกลุ่ม เมื่อนำไปตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ ไม่พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ เม็ดคลอโรพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจสอบความมีชีวิต ปรากฏว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่ตายทั้งหมด

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $5x10^5$โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น พบว่า 1 สัปดาห์แรกหลังจากการเพาะเลี้ยง ลักษณะที่สังเกตเห็นโปรโตพลาสต์ยังคงมีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวและมีชีวิต มีการรวมกันเป็นกลุ่ม ๆ ลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง แต่กลุ่มที่เกาะติดกันนี้ไม่ได้เกิดจากการแบ่งเซลล์ เพราะเมื่อนำไปตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เมื่อ

เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 2-3 สัปดาห์ สังเกตลักษณะ พบว่ายังเหมือนเดิม คือ เป็นโปรโตพลาสต์ที่กลม มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่และเกาะกันเป็นกลุ่ม แต่ไม่มีการเจริญเติบโตใดๆ ทั้งสิ้น

ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^{6}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นมากเกาะติดกันเป็นกลุ่มใหญ่ๆ มองเป็นแถบสีเขียว สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า หนึ่งสัปดาห์ต่อมา พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มเห็นเป็นแถบสีเขียวนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเม็ดคลอโรพลาสต์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกและที่มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นำมาตรวจสอบความมีชีวิต พบว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่ตายเป็นส่วนใหญ่

ดังนั้นการศึกษาสภาวะต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เรื่องต่อๆ ไป จึงได้เลือกจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ $5x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

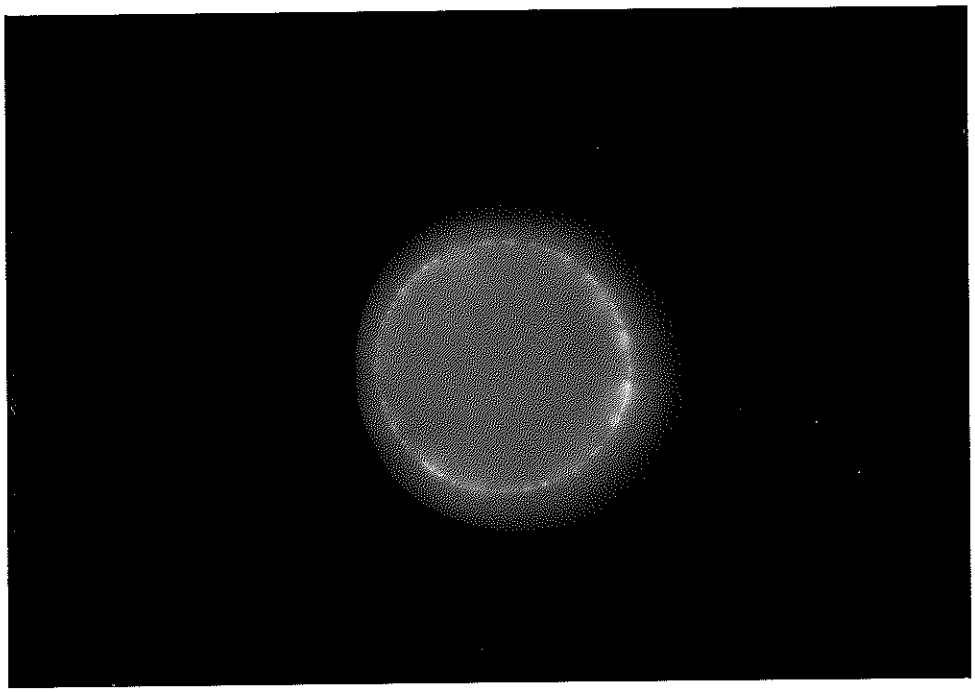
3.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี BA และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซอร์บิทอล 0.4 โมลาร์ โดยใช้จำนวนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง $5x10^{5}$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยง 3 วิธี พบว่าวิธีที่ 1 เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 5.0 เซ็นติเมตร มีอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นวิธีที่ดีที่สุด โปรโตพลาสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี และวิธีนี้สามารถศึกษาการเจริญเติบโตได้ง่าย โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โปรโตพลาสต์ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์เหลืออยู่เลย เป็นโปรโตพลาสต์ที่แตกทั้งหมด เห็นเม็ดคลอโรพลาสต์กระจายเต็มบนอาหารวุ้น วิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน ลักษณะโปรโตพลาสต์กลม เต่ง มีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ เม็ดคลอโรพลาสต์มีสีเขียว ไม่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่เช่นกัน เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์อาหารค่อนข้างเหลว โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีชีวิต

ทุกวิธีที่เพาะเลี้ยง พบว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีกว่าที่สว่าง ดังนั้นในการทดลองเรื่องชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อไป จึงได้เลือกใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

3.3 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จำนวน $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารทั้งหมด 10 สูตร ใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าเฉพาะโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D กับ BA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน นำมาตรวจสอบ พบว่าโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีชีวิต โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ขึ้นเต็มเซลล์ ดังแสดงผลในรูปที่ 15 สังเกตการเรืองแสงของผนังเซลล์ได้ชัดเจน เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 21 วัน โปรโตพลาสต์จะมีการแบ่งเซลล์สร้างเซลล์เล็กๆ ขึ้นมาใหม่มากมาย จนสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า กลายเป็นเซลล์ซัสเพนชั่นขึ้นมา ดังแสดงผลในรูปที่ 16



รูปที่ 15 การเรืองแสงของผนังเซลล์เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ (x165)

รูปที่ 16 เซลล์แขวนลอยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

4. วิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนีย

อาหารพื้นฐานสูตร MS เป็นอาหารที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ดอกไม้ประดับ เช่น ลิลลี่ (Maesuto, *et al.*, 1991), เยอบีร่า (Laliberte, *et al.*, 1985 ; Meyer and Staden, 1988), พิทูเนีย (Sink, *et al.*, 1990), ปีโกเนีย (Takayama and Missawa, 1982), เฟื่องฟ้า (Swamy and Sahijram, 1988), อัฟริกันไวโอเล็ต (Grout, 1990) และแกลดิโอลัส (Dantu and Bhojwani, 1987) เป็นต้น

ในการเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของกล๊อกซิเนียในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนั้น พบว่าทุกชิ้นส่วนพืชทดลองไม่สามารถเกิดยอดรวมได้ เพียงแต่ในระยะแรกของการเลี้ยงจะมีการปรับตัวเข้ากับอาหารและเกิดรากขึ้นมา แต่ต่อจากนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ อีก เนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด แสดงว่าเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชช่วยในการกระตุ้นให้เกิดยอดรวม

เมื่อนำชิ้นส่วนกล๊อกซิเนียมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อชักนำยอดโดยมี BA เดี่ยวๆ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในทุกความเข้มข้นสามารถชักนำยอดรวมได้ ทั้งนี้เพราะว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีผลในการชักนำให้เกิดยอดรวมได้ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้มากที่สุดถึง 69 ยอดต่อใบ แสดงว่าเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดกล๊อกซิเนีย จากส่วนยอดอ่อน ลำต้น ก้านใบ และหัว ก็สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ แต่มีจำนวนน้อยลงตามลำดับ โดยส่วนก้านใบเกิดยอดได้น้อยที่สุด เพียง

10.6 ยอดต่อก้านใบ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียที่ต่างอวัยวะกัน จะมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่างกันสุดเพียง 10.6 ยอดต่อหัว สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียที่ต่างอวัยวะกัน จะมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่างกัน ทำให้เกิดยอดได้มากน้อยแตกต่างกันไปด้วย

อิทธิพลของ BA ที่มีต่อการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงกล๊อกซิเนียนั้นสอดคล้องกับการทดลองในพืชไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด เช่น Takayama และ Misawa (1982) รายงานถึงการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบของต้นบีโกเนียในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ BA ต่ำ (0.3-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะช่วยในการเกิดต้นที่สมบูรณ์ได้ดี เมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น (3-10 มิลลิกรัมต่อลิตร) การเกิดต้นจะลดน้อยลง

ชิ้นส่วนกล๊อกซิเนียที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซิน พบว่าอาหารที่มี NAA สามารถเกิดยอดจากทุกชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ และที่ NAA ความเข้มข้นมากขึ้น เช่น ที่ความเข้มข้น 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การเกิดแคลลัสจะเพิ่มขึ้น แต่การเกิดยอดจะน้อยลง นอกจากนี้รากที่เกิดจะมีลักษณะสั้นลงจากที่ความเข้มข้นน้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจาก NAA จะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการสร้าง root primordium ขึ้น (Nemeth, 1986) และจากการทดลองนี้ เนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียสามารถเกิดรากและเกิดยอดได้ด้วย แสดงว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียจะต่างไปจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอื่นๆ โดยจะได้ต้นกล๊อกซิเนียที่ประกอบด้วยยอดและรากพร้อมๆ กัน เพียงแต่รากที่ได้จะไม่ค่อยแข็งแรง

ในการทดลองที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA จะเกิดการสร้างยอดและรากในอาหารทุกสูตรที่ทำการทดลอง ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Ikeda และ Tanabe (1989) พบว่าเมื่อนำเนื้อเยื่อชิงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA

ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อทดลองเกิดยอดและรากได้ต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าอาหารที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดรวมได้มากที่สุด 92.0 ยอดต่อใบ และทุกชิ้นส่วนของพืชทดลองสามารถเกิดยอดรวมและรากได้เช่นกัน แสดงว่าเนื้อเยื่อกล๊อกซิเนียสามารถตอบสนองต่อฮอร์โมนพืชทั้งสองตัวได้ แต่จะมีความมากน้อยต่างกันไป จำนวนยอดรวมที่เกิดจากคอมบิเนชั่นของ NAA กับ BA นั้นมากกว่ายอดรวมที่เกิดจาก NAA หรือ BA เดี่ยวๆ แสดงว่า NAA และ BA นั้น แสดงผลแบบ synergistic กัน ผลที่ได้นี้เหมือนการทดลองของ Meynet และ Sibi (1984) ที่ทำการชักนำยอดจากก้านใบของ *Gerbera jamesonii* พบว่าการเกิดยอดจะเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนิน เช่น ให้ BA หรือ SD 8339 แต่ synergistic effect นี้ จะเกิดเพียงระดับหนึ่งเท่านั้น เพราะพบว่าเมื่อ NAA ความเข้มข้นมากขึ้น จะยับยั้งการสร้างยอด ถ้า BA ความเข้มข้นสูง ก็จะไปยับยั้งการสร้างรากเช่นกัน ดังเห็นได้จากในอาหารที่เป็นคอมบิเนชั่นระหว่าง NAA และ BA ความเข้มข้นสูงๆ เช่น NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดได้น้อยที่สุด

การนำยอดที่ได้มาชักนำให้เกิดรากนั้นสามารถใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซินได้หลายชนิด จากการทดลองนี้พบว่าอาหารสูตรที่ให้จำนวนรากมากที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รากที่ชักนำได้มีลักษณะอวบ สีขาว ขนาดใหญ่ และแข็งแรง ได้รากเฉลี่ย 40.0 รากต่อยอด ซึ่งดีกว่ารากที่ชักนำได้จากอาหารที่เติม IAA, NAA และในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช จึงเป็นไปได้ว่าในการชักนำรากนั้น กล๊อกซิเนียตอบสนองต่อออกซิน และเมื่อใช้ IBA ได้ผลดีกว่าใช้สารตัวอื่นๆ การทดลองนี้สอดคล้องกับ Meyer และ Staden (1988) ที่ทำการชักนำรากจากยอดรวมของ *Gerbera auranliaca* พบว่าการเจริญเติบโตของรากเกิดได้ดีถ้าในอาหารมี IBA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และการทดลองนี้ต่างกับการทดลองของไกรสร (2536) ซึ่งรายงานว่าการชักนำรากจากยอดกล๊อกซิเนียนั้น

พบว่าในอาหารสูตร VW ที่มี IAA เกิดรากได้ดีและมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นอาหารต่างสูตรกัน จึงมีผลให้การเกิดรากแตกต่างกันไป และเนื้อเยื่อพืชต่างชนิดกัน จะมีผลตอบสนองต่อการกระตุ้นให้เกิดรากจากออกซินต่างกัน ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ IBA ในการชักนำรากกล๊อกชิเนีย เพราะชักนำรากได้มากที่สุด ลักษณะรากที่ได้นั้นแข็งแรงและยาว

สรุปแล้วจากการทดลองนี้ สามารถใช้ทุกส่วนของกล๊อกชิเนียมาชักนำยอดรวมและรากได้ ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นกล้าได้เป็นจำนวนมาก เพียงพอต่อการทดลองในเรื่องโปรโตพลาสต์ต่อไป

2. การแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกชิเนีย

2.1 การศึกษาระดับออสโมลาริตี้

เมื่อต้องการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์พืช สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือระดับความดันภายนอกและภายในเซลล์ หรือที่เรียกกันว่า ระดับออสโมลาริตี้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีผนังเซลล์ การเลือกระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมเป็นการป้องกันไม่ให้โปรโตพลาสต์หดหรือแตกในระหว่างการย่อย ระดับออสโมลาริตี้ที่สูงเกินไปหรือต่ำเกินไป อาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์เสียหายจนไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้

Eriksson (1985) กล่าวว่า ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นถ้าใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีระดับออสโมลาริตี้สูงกว่าปกติเล็กน้อยจะทำให้แยกโปรโตพลาสต์ออกมาได้เร็วและมากขึ้น เนื่องจากเกิดการหดตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์ผละจากผนังเซลล์ เป็นโอกาสให้เอนไซม์เข้าไปย่อยผนังเซลล์ได้ดีขึ้นนั่นเอง

นอกจากนี้ชนิดของสารปรับระดับความดันก็มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์และมีอิทธิพลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ จากการทดลองของ Ruesink (1980) พบว่าน้ำตาลแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นไม่เหมาะสม ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกกระจายเป็นชิ้นเล็กๆ ในขณะที่น้ำตาลซูโครสทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาด แต่ไม่กระจายออกจากกัน ซึ่งเป็นข้อควรระวังในการใช้สารปรับระดับความดัน ทั้งในระยะการแยกโปรโต-

พลาสต์และระยะที่เพาะเลี้ยง Eriksson (1977) รายงานว่าการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ถ้าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูง จะทำให้การสร้างผนังเซลล์ใหม่และการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นช้าด้วย

ในการศึกษาระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนียนั้น ได้เลือกใช้น้ำตาลซอร์บิทอลเป็นสารออสโมติคัม เนื่องจากน้ำตาลซอร์บิทอลไม่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Evans and Cocking, 1977)

จากการทดลองออสโมลาริตี้ในระดับ 0.3, 0.4 และ 0.5 โมลาร์ พบว่า น้ำตาลซอร์บิทอลที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ มีผลทำให้โปรโตพลาสต์เสียลักษณะกลม เนื่องจากโปรโตพลาสต์เกิดพลาสโมไลซีสจนไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้และตายในที่สุด แสดงว่าเป็นระดับออสโมลาริตี้ที่สูงเกินไป Ruesink (1977) อ้างโดย Dan และ Stephen (1991) กล่าวว่า ระดับออสโมลาริตี้ที่สูงเกินไป ทำให้เมแทบอลิซึมและการเติบโตของโปรโตพลาสต์เสียไป เนื่องจากการนำกรดอะมิโนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นผลให้การสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ลดลงด้วย

ส่วนออสโมลาริตี้ที่ระดับ 0.3 โมลาร์นั้น มีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แตกมาก เนื่องจากมีการแพร่ของน้ำเข้าสู่โปรโตพลาสต์มากจนโปรโตพลาสต์แตก แสดงว่าเป็นระดับออสโมลาริตี้ที่ต่ำเกินไป Evans และ Cocking (1977) กล่าวว่า การใช้ระดับออสโมลาริตี้ที่ต่ำเกินไป จะทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีหลายนิวเคลียส ซึ่งอาจเกิดจากการรวมตัวกันเองของโปรโตพลาสต์ (spontaneous fusion) ในระหว่างที่เอนไซม์กำลังย่อยผนังเซลล์นั่นเอง และการรวมตัวกันเองนี้ลดลง เมื่อใช้ระดับออสโมลาริตี้ที่สูงขึ้น

สำหรับน้ำตาลซอร์บิทอลที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ นั้นได้โปรโต-พลาสต์จำนวนมาก ลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ได้กลมเต่งและไม่ค่อยแตก แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม

โดยทั่วไปแล้วในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ มักเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายเอนไซม์ เนื่องจากแคลเซียมเป็นส่วนประกอบของ

เยื่อหุ้มเซลล์ที่ช่วยสร้างความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แตกง่าย (Gamborg, 1986) จากการทดลองนี้ได้เติมแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณ 10 มิลลิโมลาร์ลงในสารละลายเอนไซม์ เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตกมากเกินไป แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์มากเกินไปมีรายงานว่า มีผลทำให้เนื้อเยื่อของพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Shekhawat and Galston, 1983) Koh, *et al.* (1988) พบว่าโปรโตพลาสต์จากใบอะแรนด้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูง ให้เปอร์เซ็นต์การฟื้นกลับคืนสู่สภาพเดิมของโปรโตพลาสต์ 17 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ขณะที่โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ ให้เปอร์เซ็นต์การกลับคืนสู่สภาพเดิม 55 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Shekhawat และ Galston (1983) รายงานว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแคลเซียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ moth bean คือ 1 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นในระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์ ควรเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายเอนไซม์และวอชชิ่งโซลูชั่นด้วย เพื่อไม่ให้โปรโตพลาสต์แตกมากเกินไป แต่ไม่ควรเติมในปริมาณที่สูง เพราะจะทำให้การฟื้นกลับคืนสู่สภาพเดิมของโปรโตพลาสต์ลดลง

2.2 ชนิดของเอนไซม์

เมื่อเปรียบเทียบการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีกล (mechanical isolation) และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) Power, *et al.* (1976) พบว่าการใช้เอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์ มีข้อได้เปรียบ คือ ทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก การหดตัวของไซโทพลาสซึมเนื่องจากแรงดันออสโมติกมีน้อย และไม่มีเซลล์แตกหัก

ปัจจุบันนี้มีเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้ในการย่อยโปรโตพลาสต์ ที่นิยมใช้กันมาก คือ เซลลูเลส ไดรซีเลส และคอมบิเนชั่นของกลุ่มเซลลูเลสกับกลุ่มเพกติเนส (Eriksson, 1977) การทดลองนี้ได้ใช้เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส 2 ชนิด คือ เซลลูเลสและไดรซีเลส ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากเห็ดรา ใช้ได้ดีกับ

เซลล์ใบและเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองของ Nagata และ Takebe (1970) ที่แยกโปรโตพลาสต์จากใบของยาสูบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ CLA 623 หรือ พัฐวดี ทองสีดำ (2536) แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้าจักก้วนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เทน ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากเช่นกัน ส่วนเอนไซม์ไดรซีเลสนั้นพบว่าแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์ใบไม่ค่อยดีเหมาะกับการแยกเซลล์เพาะเลี้ยงมากกว่า (Evans and Cocking, 1977) เช่น Boss, *et al.* (1984) ใช้ไดรซีเลสย่อยเซลล์ซัสเพนชั่นแดรอท หรือ จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2534) ใช้ไดรซีเลสในการย่อยเซลล์ซัสเพนชั่นโกโก้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่นั้น ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นหลายอย่าง เช่น ชนิดพืช หรือความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ดังเช่นการทดลองของ Shekhawat และ Galston (1983) ที่ใช้ไดรซีเลสแยกโปรโตพลาสต์จากใบ moth bean ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก เขากล่าวว่าเอนไซม์ไดรซีเลสที่หยาบ (crude enzyme) นั้นเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อใบและโปรโตพลาสต์ ดังนั้นก่อนแยกโปรโตพลาสต์ จึงต้องทำให้เอนไซม์นั้นบริสุทธิ์เสียก่อน

จากการศึกษาคอมบิเนชั่นของเอนไซม์ที่ใช้ พบว่าคอมบิเนชั่นของเซลลูเลส และไดรซีเลสที่เวลา 5 ชั่วโมง ย่อยได้โปรโตพลาสต์จำนวนที่มากกว่าไดรซีเลสเดี่ยวๆ แต่ไม่มากกว่าเซลลูเลสเดี่ยวๆ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในคอมบิเนชั่นมีเซลลูเลสผสมอยู่ด้วย ทำให้เกิดการย่อยได้ อย่างไรก็ตามการมีไดรซีเลสในคอมบิเนชั่นนั้น อาจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยผนังเซลล์ในพืชบางชนิดได้ เช่น Loh และ Roa (1985) และ Koh, *et al.* (1988) พบว่าการเติมไดรซีเลสร่วมกับเซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้า เป็นการเพิ่มจำนวนโปรโตพลาสต์ได้มากขึ้น

จากการทดลองนี้ จะเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเดียวนั้นย่อยโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากกว่า แสดงว่าเซลลูเลสเหมาะกับเซลล์ใบกล้อกชิเนีย ถึงแม้ความเข้มข้นที่ใช้จะสูงไปเล็กน้อย แต่เวลาในการอินคูเบท

เพียง 5 ชั่วโมง ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่เป็นอันตราย ซึ่งต่างจากการทดลองของพัฐวดี ทองสีดำ (2536) ที่ใช้เซลลูเลสย่อยเซลล์ใบกล้วยไม้อะแรนด้าจักก๊วนเป็นเวลาถึง 7 ชั่วโมง การอินคูเบชั่นนานเกินไปทำให้เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ โดยทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย (Theodoropoulos and Roubelakis - Angelakis, 1990)

2.3 ระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสและช่วงเวลาที่เหมาะสม

เมื่อทราบชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนียแล้วนำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ มาศึกษาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการย่อย 5 ชั่วโมง เหมาะสำหรับแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ใบกล๊อกซิเนีย ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่ำกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้จำนวนของโปรโตพลาสต์ที่ได้ลดลง เวลาที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์เป็นปัจจัยสำคัญ ถ้าใช้เวลาน้อยเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้มีจำนวนน้อย และถ้าใช้เวลามากเกินไปถึงแม้ว่าจะได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้น แต่จะทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง เพราะการที่โปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์นานเกินไป จะทำอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ การทดสอบความมีชีวิตทำได้โดยนำโปรโตพลาสต์ไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต โมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจะซึมผ่านพลาสมาเมมเบรนเข้าไปข้างใน ถ้าเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต จะปล่อยเอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterase) ไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ทำให้เกิดสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) ซึ่งเมื่อนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบว่าเกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียว แสดงว่าโปรโตพลาสต์ที่ได้มีชีวิต เมื่อโปรโตพลาสต์ที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง โอกาสที่โปรโตพลาสต์จะแบ่งตัวเกิดเป็นแคลลัสย่อมมีสูงเพิ่มขึ้นด้วย

2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการอินคูเบชั่น

ในการแยกโปรโตพลาสต์ สภาวะการอินคูเบทของสารละลายเอนไซม์มีความสำคัญมาก เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งต้องมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งอาจทำให้ย่อยผนังเซลล์ได้ช้าหรือน้อย ส่งผลให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปก็มีผลเสียคือ ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ (denature) ได้

จากการทดลอง แยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถย่อยผนังเซลล์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่า แสดงว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจำเพาะของบริษัท Yakult Honsha Co., Ltd. และการทดลองของพัฐวดี ทองสีดำ (2536) ที่แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้าจักก๊วน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นอกจากอุณหภูมิแล้ว การเขย่าเบาๆ ประมาณ 30-40 รอบต่อนาที พบว่าช่วยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์หลุดออกมามากขึ้น เนื่องจากการเขย่าทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของเนื้อเยื่อใบ ทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเนื้อเยื่อของใบได้ง่ายขึ้น แต่ถ้าเขย่าด้วยความเร็วสูงเกินไป เช่น มากกว่า 60 รอบต่อนาที ก็มีผลเสีย คือ แรงกระแทกที่เกิดขึ้นจะทำให้โปรโตพลาสต์แตกได้ นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจากครบกำหนดเวลาของการอินคูเบทแล้ว ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ขึ้นลงหลายๆ ครั้ง เพื่อช่วยให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเนื้อเยื่อของใบมากขึ้น

การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ นอกจากขึ้นกับอุณหภูมิและการเขย่าแล้ว ยังขึ้นกับพีเอชด้วย ระดับพีเอชที่ไม่เหมาะสมมีผลทำให้ความสามารถในการทำงาน

ของเอนไซม์ลดลงเช่นกัน การทดลองนี้ไม่ได้ศึกษาเรื่องการเขย่าและพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลส แต่ได้ใช้ข้อมูลที่พัฐวดี ทองสีดำ (2536) ศึกษามาแล้ว

2.5 เปรียบเทียบขนาดของใบ

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น การเลือกใช้แหล่งโปรโตพลาสต์เป็นเรื่องสำคัญ แหล่งโปรโตพลาสต์ที่ดี ควรเป็นแหล่งที่ให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเป็นจำนวนมาก มีความแข็งแรงไม่แตกง่าย ทนทานอยู่ในสารละลายเอนไซม์ได้ดี

จากการทดลองนี้ได้เลือกใช้แหล่งโปรโตพลาสต์จากใบ พบว่าใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

สำหรับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบ ส่วนใหญ่มีแวคิวโอลขนาดใหญ่และคลอโรพลาสต์มักจะรวมกันเป็นกลุ่มแยกจากแวคิวโอล นอกจากนี้การย่อยโปรโตพลาสต์จากใบมีเศษเซลล์ต่างๆ มาก เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากใบที่มีความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร เทียบกับใบที่มีความยาวน้อยกว่า 2.5 เซ็นติเมตร พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร มีแวคิวโอลขนาดใหญ่ เนื่องจากเป็นใบแก่จึงมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ ในขณะที่ใบที่มีความยาวน้อยกว่า 2.5 เซ็นติเมตร จะมีความอ่อนมากกว่า ไม่อาจทนต่อเอนไซม์ได้ เมื่อการแยกใช้เวลานานถึง 5 ชั่วโมง จะพบว่าโปรโตพลาสต์แตกมากกว่าจึงนับจำนวนได้น้อยกว่า

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล๊อกซิเนีย จะมีความแตกต่างจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้อย่างหนึ่งที่เห็นได้ชัด คือ ไม่มีเซลล์สะสมผลึก (idioblast cell) ที่เกิดจากการสะสมของเสียจากขบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ idioblast cell เป็นเซลล์พิเศษที่ต่างจากเซลล์อื่นๆ คือ ภายในสะสมสารแคลเซียมออกซาเลตในรูปของผลึกต่างๆ หลายแบบ แต่โปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนีย จะมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ที่สะสมพวกรงควัตถุต่างๆ แทน ทำให้เห็นโปรโตพลาสต์เป็นสีตามรงควัตถุที่สะสม เช่น สีชมพู

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า การใช้ชิ้นส่วนพืชที่เจริญเติบโตสมบูรณ์และมีระยะพัฒนาการแตกต่างกันมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ ทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มี

ความแตกต่างกันในระยะพัฒนาการด้วย ถ้าเป็นโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีลักษณะเหมือนกัน (heterogenous) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจะมีการเจริญเติบโตไม่พร้อมกัน นอกจากนี้เซลล์ของพืชที่โตสมบูรณ์แล้วจะมีการสะสมของเสียไว้ในเซลล์มาก เช่น ผลึกรูปเข็ม รงควัตถุ และผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น เม็ดแป้ง เช่นเดียวกับแคลลัสที่แก่มีเม็ดแป้งสะสมไว้ในเซลล์มากเช่นกัน ซึ่งสิ่งเหล่านี้กำจัดออกไปจากเซลล์ได้ยาก และมีผลเสียต่อโปรโตพลาสต์ที่นำไปเพาะเลี้ยง Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) พบว่าอายุของใบมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ด้วย

2.6 การเก็บใบไว้ในที่มืดก่อนทำการแยกโปรโตพลาสต์

นอกจากแหล่งโปรโตพลาสต์ จะมีความสำคัญต่อการได้มาซึ่งโปรโตพลาสต์แล้ว สภาวะในการเจริญเติบโตของต้นที่จะเอามาแยกโปรโตพลาสต์ ก็มีความสำคัญไม่น้อย เช่น Shepard และ Totten (1977) ได้แสดงให้เห็นว่าสภาวะการเจริญของต้นมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) ก่อนแยกโปรโตพลาสต์จะมีผลต่อการเจริญและการพัฒนาอย่างยั่งยืนของโปรโตพลาสต์ เขาได้เก็บต้นมันฝรั่งไว้ที่ความเข้มแสง 15,000 ลักซ์ โดยให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4-10 วันก่อนแยกโปรโตพลาสต์ จากนั้นย้ายต้นมันฝรั่งดังกล่าวไปไว้ที่ความเข้มแสงที่ลดลง คือ 7,000 ลักซ์ โดยให้แสงวันละ 6 ชั่วโมง พบว่าการทรีตดังกล่าว ทำให้ได้โปรโตพลาสต์มากขึ้นและอัตรารอดของโปรโตพลาสต์สูงกว่าต้นที่ไม่ได้ทรีตแบบนี้ การทดลองนี้ก็เช่นกัน พบว่าต้นที่เก็บในที่มืด 24 ชั่วโมงก่อนทำการแยกโปรโตพลาสต์ จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าต้นที่ไม่เก็บในที่มืด

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย

3.1 จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้ประสบผลสำเร็จนั้น ขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการมีชีวิตรอด

และการเจริญเติบโตต่อไปของโปรโตพลาสต์ จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้ เนื่องจากมีจำนวนน้อยเกินไปตรงกันข้ามกับผลการทดลองของพัฐวดี ทองสีด่า (2536) ที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อะแรนด้าจักก๊วน โดยใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรหรือการทดลองของ Pupilli, *et al.* (1990) ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *Lotus sp* ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วจำนวน $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ทำให้โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และมีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ได้ดีกว่าการใช้จำนวนเริ่มต้น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ส่วนการทดลองที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้ 1 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยงเท่านั้น อาจเนื่องจากโปรโตพลาสต์มีความหนาแน่นมากเกินไป ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองของ Theodoropoulos และ Roubelakis - Angelakis(1990) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น ใช้จำนวนเริ่มต้นที่สูงถึง $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์เจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Wallin และ Johansson (1989) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบแอปเปิ้ล ใช้จำนวนเริ่มต้น $2x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งตัวได้ 12 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการทดลองนี้ พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง คือ $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์มีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตได้ดี Loudon, *et al.* (1989) รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *Brassica napus* และ *Brassica oleracea* โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ $5x10^4$, $8x10^4$, $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์ของ *Brassica napus* เจริญได้ดีเมื่อใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง $8x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่วนโปรโตพลาสต์ของ *Brassica oleracea*

เจริญได้ดีเมื่อใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าพืชสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยงก็ต่างกันด้วย การเพาะเลี้ยงโดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ไม่เหมาะสม เช่น จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงน้อยเกินไป ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แบ่งตัวและตายในเวลาต่อมา เนื่องจากโปรโตพลาสต์แต่ละอันมีการแพร่สารพวกเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่จำเป็นลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสารนี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao and Michayluk, 1975)

3.2 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทั้ง 3 วิธีพบว่าโปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้นานที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากวิธีนี้โมเลกุลของอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ทันที ทำให้ไม่ขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวนี้ เป็นที่นิยมกันแพร่หลาย (Nagata and Takebe, 1970; Wallin and Eriksson, 1973; Ratushnyak, *et al.*, 1989; Poulsen and Nielsen, 1989; Price and Earle,1984; Loh and Rao,1985; Koh, *et al.*,1988) เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์แล้ว จึงย้ายเลี้ยงลงอาหารแข็ง

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสะดวกต่อการศึกษาการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ ไม่ต้องเสี่ยงกับการปนเปื้อนเนื่องจากจุลินทรีย์ Evans และ Cocking (1977) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวช่วยลดระดับออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) ของอาหารทีละน้อย และช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เกิดใหม่ด้วย นอกจากนี้ Wallin, *et al.* (1977) พบว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวช่วยให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้เร็วขึ้น และแบ่งตัวได้เร็วกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yan-Xiu, *et al.* (1991) ที่รายงานว่า

โปรโตพลาสต์ของชะบาจีน (*Hibiscus syriacus*) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเกิดการแบ่งเซลล์ได้ 64 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธีอื่นๆ

ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์แตกเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบนั้น มักมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่บางและแตกง่าย นอกจากนี้บางโปรโตพลาสต์ที่ไม่แตกแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากโมเลกุลของสารอาหารถูกยึดเกาะอยู่กับวุ้นแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ยาก โปรโตพลาสต์จึงขาดสารอาหารและตายได้

จากการทดลองพบว่าโปรโตพลาสต์เจริญได้ดีในที่มืด อาจเนื่องมาจากเมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในที่สว่าง พบว่ามีหยดน้ำจำนวนมากจับอยู่ที่ฝาด้านในของจานเพาะเลี้ยง หยดน้ำที่จับอยู่นี้เป็นผลมาจากการระเหยของน้ำในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เมื่อมีการระเหยของน้ำในอาหารมาก ทำให้ระดับออสโมลาริตี้เปลี่ยนไป จึงทำให้โปรโตพลาสต์เจริญได้ไม่ดี ต่างจากเมื่อเลี้ยงในที่มืด การระเหยของน้ำในอาหารเกิดขึ้นน้อยมาก ทำให้ระดับออสโมลาริตี้เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีกว่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้คล้ายกับการทดลองของ Wallin และ Eriksson (1973); Hurwitz และ Agrios (1984)

3.3 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ขึ้นกับชนิดของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปความต้องการสารอาหารพื้นฐานของโปรโตพลาสต์จะเหมือนกับพวกเซลล์เพาะเลี้ยง และมีการดัดแปลงสูตรอาหารตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด

จากการทดลอง พบว่าโปรโตพลาสต์จากใบกล้อกซิเนียที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ นั้นมีชีวิตรอดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D และ BA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์แทนน้ำตาลซอร์บิทอล ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคส หรือ ซูโครส เป็นแหล่งที่ให้พลังงานที่สำคัญแก่โปรโตพลาสต์ ดังนั้นน้ำตาลที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น

จึงนิยมใช้กลูโคส หรือ ซูโครส หรือใช้ร่วมกัน ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน และไซโทไคนิน จำเป็นต่อการเจริญของพืช และมีส่วนสำคัญในการชักนำการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืชว่าต้องการอะไร เนื่องจากโปรโตพลาสต์บางชนิดต้องการออกซินอย่างเดียว ในขณะที่โปรโตพลาสต์บางชนิดต้องการทั้งออกซินและไซโทไคนิน Yoneda (1990) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบเลี้ยงของต้น Japanese morning glory (*Pharbitis nil* Choisy) ในอาหารสูตร Durand ที่มี 2,4-D, BA และซูโครส พบว่าภายใน 6 วัน เกิดการแบ่งเซลล์ และเมื่อเลี้ยงไปได้ 3-4 สัปดาห์ เขาย้ายเซลล์ซัสเพนชั่นไปยังอาหารแข็งสูตร Nakata และ Takebe ที่มี NAA BA และซูโครส พบว่าเกิดเป็นแคลลัสและมีการสร้างรากขึ้นมา ซึ่งคล้ายกับการทดลองนี้ กล่าวคือ โปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย ต้องการทั้ง 2,4-D, BA และ ซูโครส โดยทั่วไปแล้ว 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้กันมากในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เพราะ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน และช่วยในเรื่องการแบ่งตัว แต่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่นบ้างเหมือนกัน เช่น Mii และ Cheng (1982) อ้างโดย Mii, *et al.* (1990) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์คาร์เนชั่นในอาหารสูตร MS ที่มี NAA 54 ไมโครโมลาร์และ BA 2.2 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์แบ่งตัว เกิดเป็นโคโลนีของเซลล์ได้ แต่โปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งตัวนั้นเป็นโปรโตพลาสต์ที่แยกมาจากใบอ่อนเท่านั้น ถ้ามาจากใบแก่จะไม่มีการแบ่งตัวภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมือนกัน Krikorian, *et el.* (1990) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Daylily ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2,4-D 2.2 ไมโครโมลาร์ และไคเนติน 4.3 ไมโครโมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 3-4 สัปดาห์ จะได้กลุ่มเซลล์ซัสเพนชั่นที่มีความหนาแน่นเกิดขึ้นมาใหม่

5. สรุป

1. การชักนำยอดรวมจากส่วนต่าง ๆ ของกล๊อกซิเนีย ได้แก่ ใบ, ก้านใบ, ยอดอ่อน, หัวและลำต้น พบว่าส่วนใบของกล๊อกซิเนียให้ยอดรวมสูงสุด โดยในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ได้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 69.0 ยอดต่อใบ ส่วนในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ได้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 47.0 ยอดต่อใบ และในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นอย่างละ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 92.0 ยอดต่อใบ

2. การชักนำรากจากยอดของกล๊อกซิเนีย พบว่าในอาหารสูตร MS ที่มี IAA, IBA และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้รากเฉลี่ย 35.5, 40.0 และ 30.0 รากต่อยอด ตามลำดับ

3. ระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ 0.4 โมลาร์ จะได้โปรโตพลาสต์ที่กลม เต่ง โปรโตพลาสต์ที่แตกมีน้อย

4. เวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ 5 ชั่วโมง

5. ขนาดของใบที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนีย คือ ใบที่มีความยาวมากกว่า 2.5 เซ็นติเมตร

6. เอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนีย คือ เอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 3.5×10^5 และความมีชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์

7. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล๊อกซิเนีย คือ 30 องศาเซลเซียส

8. เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ ที่ได้จากใบที่เก็บไว้ในที่มืดและที่สว่าง พบว่าใบที่เก็บไว้ในที่มืดให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงกว่า

9. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง คือ 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

10. เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ความ

เข้มข้นอย่างละ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซูโครส 0.4 โมลาร์ ในที่มืด โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เมื่อมีอายุได้ 5 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไปอีก 21 วัน โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์กลายเป็นเซลล์ซัสเพนชั่นขึ้นมา

เอกสารอ้างอิง

ไกรสร พุ่มพวง. 2536. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากยอดกล๊อกซิเนีย โครงงานทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์. 2534. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เจริญ สิงห์ลอ. 2534. การขยายพันธุ์กล๊อกซิเนียโดยการเพาะเลี้ยงก้านใบ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร วิทยาลัยเกษตรกรรมพังงา. กรมอาชีวศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ หน้า 163-170.

พัฐวดี กองสีดำ. 2536. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รงรอง วิเศษสุวรรณ และอรดี สหวัชรินทร์. 2534. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน. หน้า 96-99.

วรรณรัตน์ นองมณี. 2533. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเยอบีร่า โครงงานทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2525. การปลูกไม้ดอก. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. หน้า 141-152.

AboEl-Nil, M. M. and Hildebrandt, A. C. 1976. Cell wall regeneration and colony formation from isolated single geranium protoplasts in microculture. Can. J. Bot. 54 : 1530-1534.

AboEl-Nil, M. M., Hildebrandt, A. C. and Evert, R. F. 1976a. Effect of auxin-cytokinin interaction on organogenesis in haploid callus of *Pelargonium x hortorum*. In Vitro. 12:602-604.

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.

Backer, C. A. and Bakhvizen Van Den Brink Jr., R. C. 1965. Flora of Java. Vol. 2 N. V. P. Noordhoff-groningen. pp. 354.

Bajaj, Y. P. S. 1977. Protoplast isolation, culture and somatic hybridization. *In* : Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Reinert, J. and Bajaj, Y. P. S., eds.), Springer-Verlag, 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 Agric. Asso. of Chi. 129 : 55-66.

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

Cooke, R. C. 1977. Tissue culture propagation of African Violet. HortScience. 12(6) : 549.

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.

Dantu, P. K. and Bhojwani, S. S. 1987. *In vitro* propagation and corm formation in gladiolus. Gartenbauwissenschaft. 52 : 90-93.

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

Eriksson, T. 1985. Protoplast isolation and culture. *In* : Plant Protoplast (Fowke, L. C. and Constabel, F., eds.), CRC Press, U.S.A. pp. 1-20.

Evans, D. A. and Bravo, J. E. 1983. Protoplast isolation and culture. *In*: Handboook of Plant Cell Culture, Vol. 1. (Evans D. A., Sharp W.R., Ammirato, P. V. and Yamada, Y., eds.), Macmillan Publishing, New York. pp.124-176.

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

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

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

Grout, B. W. W. 1990. African Violet. *In*: Handboook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y., eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 181-205.

Hackett, W. P. and Anderson, J. M. 1967. Aseptic multiplication and maintenance of differentiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 90: 365-369.

Harney, P. M. 1982. Tissue culture propagation of some herbaceous horticultural plants. *In* : Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry (Tomes, D. T., Ellis, B. E., Harney, P. M., Kasha, K. J. and Peterson, R. L., eds.), Univ. of Guelph, Guelph, Ont. Canada. pp. 187-208.

Harney, P. M. and Knap, A. 1990. African Violet. *In*: Handboook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y.,eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 181-205.

Hughes, K. W. 1981. Ornamental Species. *In*: Cloning Agricultural Plants via *In vitro* Techniques. (Conger, B. V., ed.). CRC Press, Inc., U. S. A. pp. 6-33.

Hurtwitz, D. C. and Agrios, N. G. 1984. Isolation and culture of protoplasts from apple callus and cell suspension culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109(3) : 348-350.

Ikeda, L. R. and Tanabe, M. J. 1989. *In vitro* subculture application for ginger. HortScience. 24(1) : 142-143.

Kakeshi, M. 1979. Studies on the tissue culture of carnation. Vol.5. Induction of redifferentiated plants from the petal tissue. Bull. Hiroshima Agric. Coll. 6 : 159-166.

Kameya, T. 1975. Culture of protoplasts from chimeral plant tissue of nature. Jap. J. Gen. 50 : 417-420.

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.

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

Krikorian, A. D., Kann, R. P. and Fitter Corbin, M. S. 1990. Daylily. *In*: Handboook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y., eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 375-412.

Laliberte, S., Chretien, L. and Vieth, J. 1985. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. HortScience. 20(1) : 137-139.

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

Loudon, P. T., Nelson, R. S. and Ingram, D. S. 1989. Studies of protoplast culture and plant regeneration from commercial and rapid-cycling *Brassica* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 19 : 213-224.

Maesuto, K., Sarma, K. S., Fukui, H. and Hara, T. 1991. *In vitro* bulblet introduction from shoot apices of *Lilium japonicum*. HortScience. 26(2) : 211.

Meyer, H. J. and van Staden, J. 1988. The *in vitro* culture of *Gerbera aurantiaca* Sch. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 14 : 25-30.

Meyer, H. J. and van Staden, J. 1991. Rapid *in vitro* of *Aloe barbadensis* Mill. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 26 : 167-171.

Meynet, J. and Sibi, M. 1984. Haploid plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Gerbera jamesonii*. Z. Pflanzenphysiol. 93 : 78-85.

Mii, M., Buiatti, M. and Gimelli, F. 1990. Carnation. *In*: Handboook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y., eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 284-318.

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

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-149.

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.

Nemeth, G. 1986. Induction of rooting. *In*: Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 1 : Trees 1 (BaJaj, Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin. pp 49-64.

Norton, M. E. and Boe, A. A. 1982. *In vitro* propagation of ornamental rosaceous plants. HortScience. 17(2) : 190-191.

Poulsen, G. B. and Nielsen, S. V. S. 1989. Regeneration of plants from hypocotly protoplasts of rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 17 : 153-158.

Power, J. B., Frearson, E. M., George, D., Evans, P. K., Berry, S. F., Hayward, C. and Cocking, E. C. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. Plant Sci. Lett. 7 : 51-55.

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.

Ratushnyak, Y. I., Piven, N. M. and Rudas, V. A. 1989. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 17 : 183-190.

Ruesink, A. W. 1980. Protoplasts of plant cells. Methods Enzymology. 69 : 69-84.

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.

Shepard, J. F. and Totten, R. E. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato : Isolation, proliferation, and plant regeneration. Plant Physiol. 60: 313-316.

Sink, K. C., Izhar, S. and Zelcer, A. 1990. Petunia *In* : Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y., eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 654-692.

Swamy, R. D. and Sahijram, L. 1988. Tissue culture propagation of bougainvillea. Gartenbauwissenschaft. 53(4) : 174-176.

Takayama, S. 1990. Begonia. *In* : Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y., eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 253-283.

Takayama, S. and Missawa, N. 1982. Factors affecting differentiation *in vitro*, and a mass-propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. Scientia Horticulturae. 16: 65-75.

Takeda, Y. 1974. Studies on the establishment of pathogen-free stocks by use of shoot tip culture and its application to the commercial carnation production. Special Rept. Shiga Pref. Agric. Exp. Sta. 11:1-124.

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

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.

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., Glimelius, K. and Eriksson, T. 1977. Pretreatment of cell suspension as a method to increase the protoplast yield of *Happlopappus gracilis*. Physiol. Plant. 40 (4) : 307-311.

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.

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.

Yoneda, Y. 1990. Japanese Morning Glory. *In* : Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5. (Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y., eds.), McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 509-533.

ภาคผนวก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	440
KNO_3	1,900
KH_2PO_4	170
NH_4NO_3	1,650
$MgSO_4.7H_2O$	370
ธาตุอาหารรอง	
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
KI	0.830
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
เหล็ก	
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25
สารอินทรีย์	
Nicotinic acid	0.5
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine HCl	0.5

สารอินทรีย์	มิลลิกรัมต่อลิตร
Myo-inoital	100.0
Glycine	2.0
น้ำตาล	30,000
pH	5.7

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางมยุรี วุฒิสิทธิ์	
วัน เดือน ปีเกิด	13 มิถุนายน 2500	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การศึกษาบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา	2523

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

อาจารย์ 2 ระดับ 6 โรงเรียนหาดใหญ่วิทยาลัย อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา