บทที่ 3

ผล

1. วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

1.1 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลองอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $149x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 94.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ซึ่งสามารถมองเห็นการเรืองแสงของโปรโตพลาสต์ได้ โดยการย้อมด้วย FDA แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ (ภาพที่ 8) ดังนั้นในการทดลองแยกโปรโตพลาสต์ของใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในครั้งต่อไป จึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 ผลของชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

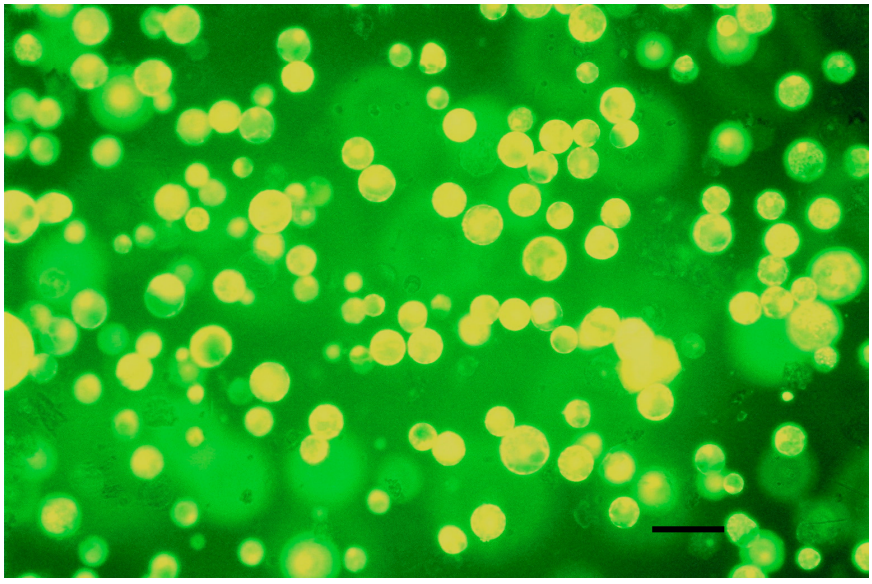
เอนไซม์		จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)	ความมีชีวิต (%)
CR-10 (%)	MR-10 (%)		
1	1	8.50c	72.33c
1	2	75.60b	80.70b
2	1	149a	94.78a
F-test		**	**
C.V. (%)		4.24	4.95

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

CR-10 = เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10

MR-10 = มาเซอโรไซม์อาร์-10



ภาพที่ 8 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ เห็นการเรืองแสงสีเขียว-เหลือง (บาร์ = 50 ไมโครเมตร)

1.2 การศึกษาผลของแหล่งของชิ้นส่วนพืชต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

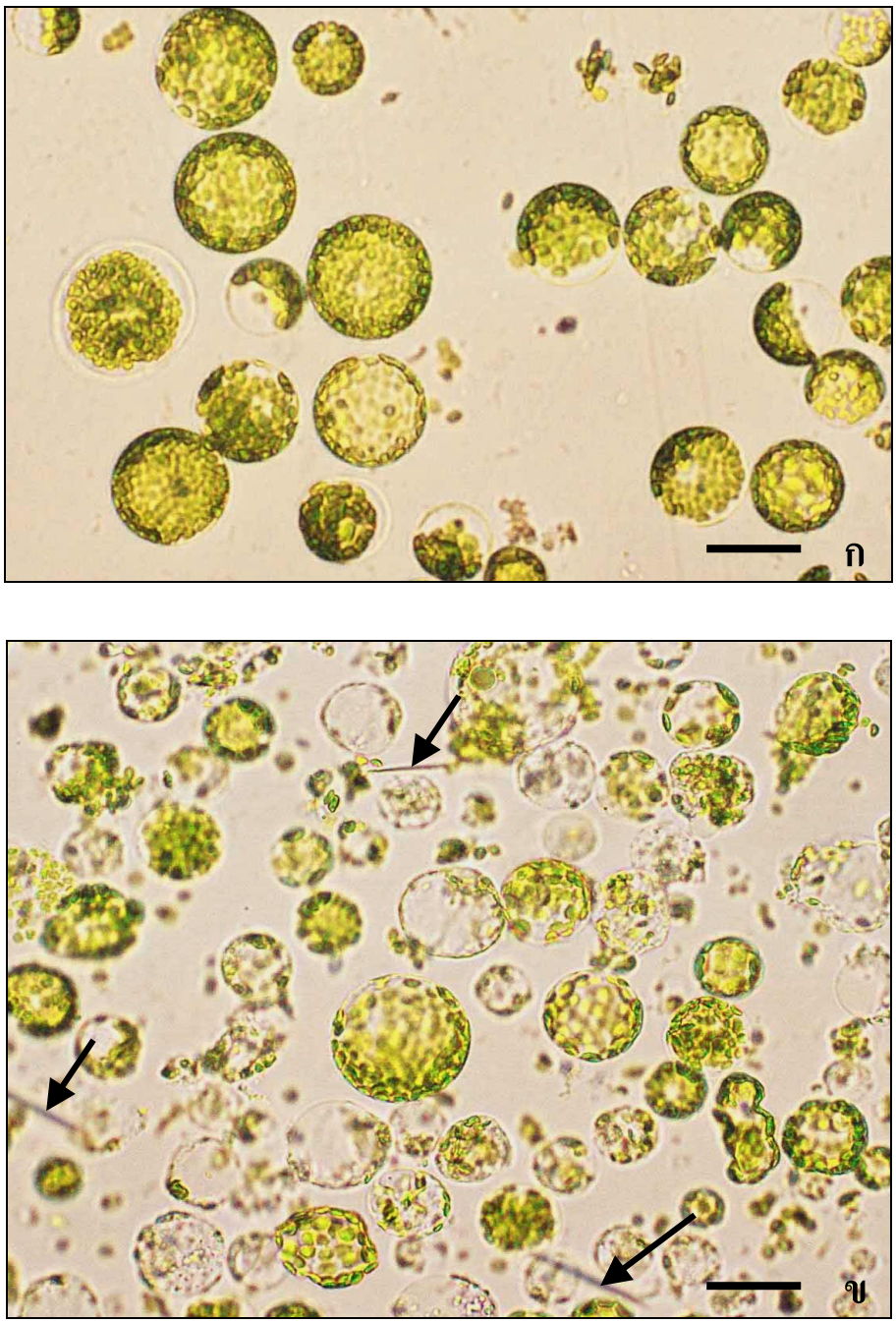
การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ราก และโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลองอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 ใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $149x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิตสูงสุด 94.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ โปรโตคอร์ม $5.32x10^5$ ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิตสูงสุด 68.32 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรากไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ (ตารางที่ 2) โปรโตพลาสต์จากใบมีขนาด 50-80 ไมโครเมตร (ภาพที่ 9ก) ในขณะที่โปรโตพลาสต์จากโปรโตคอร์มมีขนาด 30-100 ไมโครเมตร และพบผลึกรูปเข็มด้วย โดยในการสุ่มตรวจแต่ละจุดพบ 5-6 เซลล์ต่อจุด (ภาพที่ 9ข) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้ชิ้นส่วนใบ

ตารางที่ 2 ผลของแหล่งของชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ชิ้นส่วน	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)	ความมีชีวิต(%)
ใบ	149a	94.78a
ราก	0c	0c
โปรโตคอร์ม	5.32b	68.32b
F-test	**	**
C.V. (%)	4.39	5.68

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 9 โปรโตพลาสต์ที่แยกจากแหล่งต่างๆ ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรในหลอดทดลอง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอลเข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7

(ก) : โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ (บาร์ 50 ไมโครเมตร)

(ข) : โปรโตพลาสต์ที่แยกจากโปรโตคอร์ม (บาร์ 30 ไมโครเมตร) พบผลึกรูปเข็ม (ศรชี้)

1.3 การศึกษาผลของอายุใบต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุใบ 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 พบว่าชิ้นส่วนใบอายุ 4 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.49x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 94.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนใบอายุ 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติคือให้จำนวนโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ $1.32\text{-}1.49x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้ชิ้นส่วนใบอายุ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ผลของอายุใบต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

อายุใบ (สัปดาห์)	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^7$)	ความมีชีวิต (%)
1	0.72b	92.60a
2	1.32ab	94.21a
3	1.46a	94.56a
4	1.49a	94.78a
5	1.41ab	94.19a
F- test	*	ns
C.V. (%)	28.87	12.78

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ก ข ค ง จ

ภาพที่ 10 ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุต่างๆ ที่ใช้ชิ้นส่วนใบในการแยกโปรโตพลาสต์

(ก) : ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 1 สัปดาห์

(ข) : ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 2 สัปดาห์

(ค) : ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 3 สัปดาห์

(ง) : ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 4 สัปดาห์

(จ) : ต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 5 สัปดาห์

1.4 การศึกษาผลของเวลาการอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุใบ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 อินคูเบทเป็นระยะเวลา 4, 5 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการอินคูเบทที่ 5 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.49 x10^7 ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 94.78 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการ อินคูเบทที่ 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือให้โปรโตพลาสต์ตั้งแต่ 1.42-1.49 ต่อกรัมน้ำหนักสด และการอินคูเบทที่ 4 และ 5 ชั่วโมง ให้ความมีชีวิตใกล้เคียงกันคือ 94.76 และ 94.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้เวลาในการอินคูเบท 5 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ผลของเวลาการอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ชั่วโมงที่ทำการอินคูเบท	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด (x10^7)	ความมีชีวิต(%)
4	1.44a	94.76a
5	1.49a	94.78a
6	1.42a	75.35b
F-test	ns	*
C.V. (%)	16.16	9.24

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

1.5 การศึกษาผลของระดับความเป็นกรด-ด่างต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุใบ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างเป็น 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 และ 5.9 อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเป็นกรดด่าง 5.5 (ภาพที่ 11) ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.53x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 97.06 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามระดับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์ที่ 5.5, 5.6 และ 5.7 ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือให้จำนวนโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ 1.49-1.53 ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตตั้งแต่ 94.78-97.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกปรับระดับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์เป็น 5.5

ตารางที่ 5 ผลของระดับความเป็นกรด-ด่างต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ระดับความเป็นกรดด่าง	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^7$)	ความมีชีวิต (%)
5.5	1.53a	97.06a
5.6	1.50a	96.38a
5.7	1.49a	94.78a
5.8	1.12b	86.86b
5.9	1.11b	75.24c
F- test	*	**
C.V. (%)	14.59	5.20

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ก ข ค ง จ

ภาพที่ 11 โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรที่แยกจากใบด้วยเอนไซม์ที่ปรับระดับความเป็นกรดด่างต่างๆ

(ก) : ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.5

(ข) : ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.6

(ค) : ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7

(ง) : ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.8

(จ) : ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.9

1.6 การศึกษาผลของออสโมติคัมต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุใบ 4 สัปดาห์ ในหลอดทดลอง โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และซอร์บิทอลรวมกับแมนนิทอล ความเข้มข้นชนิดละ 0.225 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าการปรับความดันออสโมติกด้วยแมนนิทอล ให้จำนวนโปรโตพลาสต์

$1.53x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 97.06 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามการปรับความดันออสโมติกด้วยซอร์บิทอล ซอร์บิทอลร่วมกับแมนนิทอล และแมนนิทอล ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติคือ $1.62x10^7$, $1.55x10^7$ และ $1.53x10^7$ ตามลำดับ นอกจากนี้ แมนนิทอล และซอร์บิทอล ให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 97.06 และ 92.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัม เนื่องจากแมนนิทอลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าซอร์บิทอล

ตารางที่ 6 ผลของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ออสโมติคัม	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^7$)	ความมีชีวิต (%)
แมนนิทอล	1.53a	97.06a
ซอร์บิทอล	1.62a	92.45a
แมนนิทอล+ซอร์บิทอล	1.55a	74.56b
F- test	ns	**
C.V. (%)	18.44	5.35

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

1.1 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรด้วยความหนาแน่น $5x10^4$, $1x10^5$, $5x10^5$, $1x10^6$ และ $5x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าที่ความหนาแน่น $5x10^5$ ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยรวม 39 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างมาโครโคโลนีสูง

สุด 2.67 เปอร์เซ็นต์ และการแตกหน่อน้อยสุด 1.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การแบ่งเซลล์โดยรวม 26.33 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูงหรือต่ำกว่านี้ ส่งผลให้การตอบสนองต่อการเลี้ยงต่ำมาก (ตารางที่ 7) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่าโปรโตพลาสต์เหี่ยวและไม่มีพัฒนาต่อไปอีก ดังนั้นในการศึกษาการเพาะเลี้ยงต่อไปจึงเลือกปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ก่อนเลี้ยงเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 ผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%)				การแตกหน่อ (%)
	2 เซลล์	10-50 เซลล์	>50 เซลล์	รวม	
$5x10^4$	1d	0.67c	1c	2.67d	2.67cb
$1x10^5$	4.33c	0.67c	1.33bc	6.33c	2.13c
$5x10^5$	9a	27.33a	2.67a	39a	1.33d
$1x10^6$	7.33b	16.67b	2.33ab	26.33b	3.33b
$5x10^6$	2d	1.33c	1c	4.33d	4.96a
F-test	**	**	*	**	**
C.V. (%)	15.69	8.68	34.88	6.41	13.64

* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

1.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ

BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารเหลวที่เติม NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยรวม 41.12 เปอร์เซ็นต์ และการสร้างมาโครโคโลนีสูงสุด 2.67 เปอร์เซ็นต์ และการแตกหน่อน้อยสุด 1.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ NAA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์โดยรวม 30.46 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูงหรือต่ำกว่านี้ ส่งผลให้การตอบสนองต่อการเลี้ยงต่ำมาก (ตารางที่ 8) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่าโปรโตพลาสต์เหี่ยวและไม่มีพัฒนาต่อไปอีก

ตารางที่ 8 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบหลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		การแบ่งเซลล์ (%)				การแตกหน่อ (%)
NAA	BA	2 เซลล์	10-50 เซลล์	>50 เซลล์	รวม	
1	1	0c	1c	1.33c	2.33d	3.18ab
2	1	2.67b	1.67c	1.67bc	6.01c	2.67b
3	1	9.59a	28.86a	2.67a	41.12a	1.67c
4	1	6.33a	22b	2.13ab	30.46b	1.76c
5	1	3b	2c	1.76bc	6.76c	3.67a
F-test		**	**	**	**	**
C.V. (%)		14.12	12.61	17.32	8.77	13.61

**=แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

การใช้ไซโตไคนินชนิดอื่นๆ ได้แก่ BA, KN และ TDZ เข้มข้นชนิดละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกชนิดใช้ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ BA ให้การพัฒนาการในการแบ่งเซลล์โดยรวม 41.12 เปอร์เซ็นต์ และสร้างมาโครโคโลนีสูงสุด 2.67 เปอร์เซ็นต์ และการแตกหน่อน้อยสุด 1.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) รองลงมาคือ NAA ร่วมกับ KN

และ NAA ร่วมกับ TDZ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการใช้ NAA ร่วมกับ KN ให้พัฒนาการในการแบ่ง 2 เซลล์ มากกว่าการใช้ NAA ร่วมกับ BA คือ 10.67 และ 9.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อดูพัฒนาการในการแบ่ง 10-50 เซลล์ และมากกว่า 50 เซลล์ กลับพบว่าการใช้ NAA ร่วมกับ BA ให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่า และการแตกหน่อที่น้อยกว่า คือ 28.86, 2.67 และ 1.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ดังนั้นในการศึกษาการเพาะเลี้ยงต่อไปจึงเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 9 ผลของชนิดของไซโตไคนินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ เมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ไซโตไคนิน (มก./ล.)	การแบ่งเซลล์ (%)				การแตกหน่อ (%)
	2 เซลล์	10-50 เซลล์	>50 เซลล์	รวม	
3N1K	10.67a	26.67a	1.67b	39.01a	1.97ab
3N1T	4.36c	12.09b	2.03ab	18.48c	2.02ab
3N1B	9.59a	28.86a	2.67a	41.12a	1.67b
F-test	**	**	*	**	*
C.V. (%)	10.71	18.19	15.71	6.05	19.79

K = KN (Kinetine)

T = TDZ (thidiazuron)

N = NAA (1-naphthaleneacetic acid)

B = BA (6- benzyladenine)

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

1.3 การศึกษาผลของชนิดของน้ำตาลต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสร่วมกับฟรุคโตส ความเข้มข้นชนิดละ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล หรือซอร์บิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการใช้น้ำตาล แมนนิทอลเป็นออสโมติคัมให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์สูงสุด และการแตกหน่อน้อยสุดเมื่อเปรียบเทียบกับซอร์บิทอล น้ำตาลซูโครสให้การพัฒนาการในการแบ่งเซลล์สูงสุด 32.43 (สัปดาห์ที่ 1) และ 8.69 เปอร์เซ็นต์ (สัปดาห์ที่ 2) ตามลำดับ และการแตกหน่อน้อยสุด 1.03 (สัปดาห์ที่ 1) และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (สัปดาห์ที่ 2) ตามลำดับ รองลงมาคือ กลูโคส และฟรุกโตส ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ส่วนกลูโคสร่วมกับฟรุกโตสให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์ในสัปดาห์แรกต่ำสุด 5.34 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลฟรุกโตสส่งเสริมการแตกหน่อสูงสุด 5.43 เปอร์เซ็นต์ และโปรโตพลาสต์สามารถมีชีวิตอยู่ได้เพียง 1 สัปดาห์ ในขณะที่น้ำตาลชนิดอื่นๆ โปรโตพลาสต์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 2 สัปดาห์ จึงเลือกน้ำตาลซูโครสในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

ตารางที่ 10 ผลของชนิดของน้ำตาลต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

ชนิดของน้ำตาล	1 สัปดาห์		2 สัปดาห์	
	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)
แมนนิทอล				
ซูโครส	32.43a	1.03e	8.69b	0.30c
กลูโคส	10.95b	1.57de	11.47a	0.52c
ฟรุกโตส	8.53bc	5.43a	0d	0c
กลูโคส+ฟรุกโตส	5.34def	3.05bc	8b	2.13a
ซอร์บิทอล				
ซูโครส	6.95cd	2.42cd	4.32c	1.42b
กลูโคส	5.87cde	2.76c	3.95c	1.67ab
ฟรุกโตส	2.63f	3.69b	0d	0c
กลูโคส+ฟรุกโตส	3.94ef	3.81b	1.03d	1.97a
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	17	18.95	14.55	29.16

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2.4 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว 3 สูตร คือ MS, VW และ VW+1/2MS เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เติมหรือเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวให้การพัฒนาการของโปร

โตพลาสต์ในการแบ่งเซลล์ดีกว่าการเติมน้ำมะพร้าว และอาหารสูตร MS ให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์สูงสุด 32.43 (สัปดาห์ที่ 1) และ 8.69 เปอร์เซ็นต์ (สัปดาห์ที่ 2) ตามลำดับ และการแตกหน่อน้อยสุด 1.03 (สัปดาห์ที่ 1) และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (สัปดาห์ที่ 2) ตามลำดับรองลงมาคือ สูตร VW และ VW+1/2MS ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอาหารสูตร MS และ VW ให้การแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

สูตรอาหาร	1 สัปดาห์		2 สัปดาห์	
	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)
เติมน้ำมะพร้าว				
MS	21.78bc	1.97a	4.12c	0.94ab
VW	24.37b	1.94a	3.57c	0.78ab
VW+1/2 MS	18.94c	2.56a	1.36d	1.05a
ไม่เติมน้ำมะพร้าว				
MS	32.43a	1.03b	8.69a	0.3c
VW	28.67a	1.76ab	6.94b	0.67b
VW+1/2 MS	21.08bc	1.97a	3.69c	0.91ab
F-test	**	*	**	**
C.V. (%)	7.94	25.71	12.31	18.80

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2.5 การศึกษาวิธีการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงด้วยวิธีการต่างๆ ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารเหลวให้ผลดีที่สุด (32.53 และ 8.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่อาหารแข็งและกึ่งแข็งกึ่งเหลวไม่พบการแบ่งเซลล์ (ตารางที่ 12) การฝังเลี้ยงในอากาโรส ไฟตาเจล ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมอาหารเหลวก็ไม่พบการแบ่งเซลล์เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 13) คงพบแต่การแตกหน่อเกิดขึ้น สำหรับพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในแต่ละวิธีการเลี้ยงมีดังนี้คือ

- การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1-2 วัน โปรโตพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงไปเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มตาย แต่โปรโตพลาสต์ที่เหลือมีการแบ่งเซลล์ต่อไป มีการสร้างมาโครโคโลนีสูงสุด และมีชีวิตรอดถึง 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ตายทั้งหมด (ตารางที่ 12)

- การเพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารแข็ง 1 วัน โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว ไม่มีการแบ่งเซลล์ เม็ดคลอโรพลาสต์ยังคงมีสีเขียว วันที่ 2 โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยวและแตกมากขึ้น คลอโรพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล วันที่ 3 โปรโตพลาสต์เหี่ยวแตกตายทั้งหมด (ตารางที่ 12)

- การเพาะเลี้ยงแบบอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว 1 วัน โปรโตพลาสต์กลม ไม่มีการแบ่งเซลล์ เม็ดคลอโรพลาสต์ยังคงมีสีเขียว วันที่ 2 โปรโตพลาสต์เริ่มแตกและเหี่ยว คลอโรพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล วันที่ 3 โปรโตพลาสต์เหี่ยวแตกตายทั้งหมด (ตารางที่ 12)

- การเพาะเลี้ยงแบบบีดหรือดิสค์ ใช้วุ้นไฟตาเจล และอากาโรสหุ้มห่อโปรโตพลาสต์ ทั้งการเติมและไม่เติมอาหารเหลว ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันคือ หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่หุ้มด้วยไฟตาเจลส่งเสริมการแตกหน่อสูงสุด 8.69 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ (ตารางที่ 13) ส่วนการใช้วุ้นอากาโรสหุ้มโปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว สัปดาห์ที่ 2 โปรโตพลาสต์แตกตายทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบชนิดวุ้นที่ทำการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ พบว่าการใช้วุ้นไฟตาเจลหุ้มโปรโตพลาสต์ส่งเสริมการแตกหน่อมากกว่าการใช้วุ้นอากาโรสหุ้ม และการเติมอาหารเหลวให้ผลดีกว่าการไม่เติมอาหารเหลว

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการเติมอาหารเหลวที่ลดออสโมติคัมลงทุก 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ พบว่าการเติมอาหารที่ลดออสโมติคัมลงทุก 1 สัปดาห์ ให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์สูงสุด และพบการแตกหน่อน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมอาหาร

เหลวที่ลดออสโมติคัมลงทุก 2, 3 และ 4 สัปดาห์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากการเลี้ยงในอาหารเหลวโดยที่ไม่มีการเติมอาหารที่ลดออสโมติคัมทุกสัปดาห์ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไปได้เพียง 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ก็ตายในลักษณะเดียวกับการที่ไม่เติมอาหารที่ลดออสโมติคัม พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ตั้งแต่แบ่งเซลล์ครั้งแรกจนได้มาโครโคโลนีแสดงดังภาพที่ 12

- การเพาะเลี้ยงแบบเทคนิคฟีดเดอร์ โดยใช้โปรโตพลาสต์และเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบและกุหลาบมอญเป็นฟีดเดอร์เซลล์ พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้โปรโตพลาสต์และเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าการใช้โปรโตพลาสต์และเซลล์ซัสเพนชั่นของกุหลาบมอญเป็นฟีดเดอร์เซลล์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งการแบ่งเซลล์และการแตกหน่อ (ตารางที่ 14) โดยการใช้โปรโตพลาสต์เป็นฟีดเดอร์เซลล์ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าการใช้เซลล์ซัสเพนชั่นเป็นฟีดเดอร์ รวมถึงพบการแตกหน่อน้อยกว่าด้วย การเพาะเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงในอาหารที่เติมไฟตาเจลจะให้ผลดีกว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติมอากาโรส โดยการเติมอากาโรสในเซลล์ซัสเพนชั่นของกุหลาบมอญส่งเสริมการแตกหน่อสูงสุด 2.03 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ในโปรโตพลาสต์ของกุหลาบมอญ ในเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบ และในโปรโตพลาสต์ของยาสูบ ตามลำดับ

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ ที่แยกจากใบกล้วยไม้ หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

วิธีการเลี้ยง	1 สัปดาห์		2 สัปดาห์	
	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)
อาหารเหลว	32.53a	1.03b	8.59a	0.30a
อาหารแข็ง	0b	0c	0b	0b
อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว	0b	2.38a	0b	0b
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	11.93	27.60	17.73	15.28

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 13 ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบบีดหรือดิสค์ (bead or disc culture) หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

วิธีการเลี้ยง		1 สัปดาห์		2 สัปดาห์	
		แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)	แบ่งเซลล์ (%)	แตกหน่อ (%)
Phytagel	ไม่เติม*	0	2.38	แตกตายหมด	แตกตายหมด
	เติม**	0	8.69	แตกตายหมด	แตกตายหมด
Agarose	ไม่เติม*	0	ส่วนใหญ่เหี่ยว	แตกตายหมด	แตกตายหมด
	เติม**	0	5.63	แตกตายหมด	แตกตายหมด

* = ไม่เติมอาหารเหลวสูตร MS free

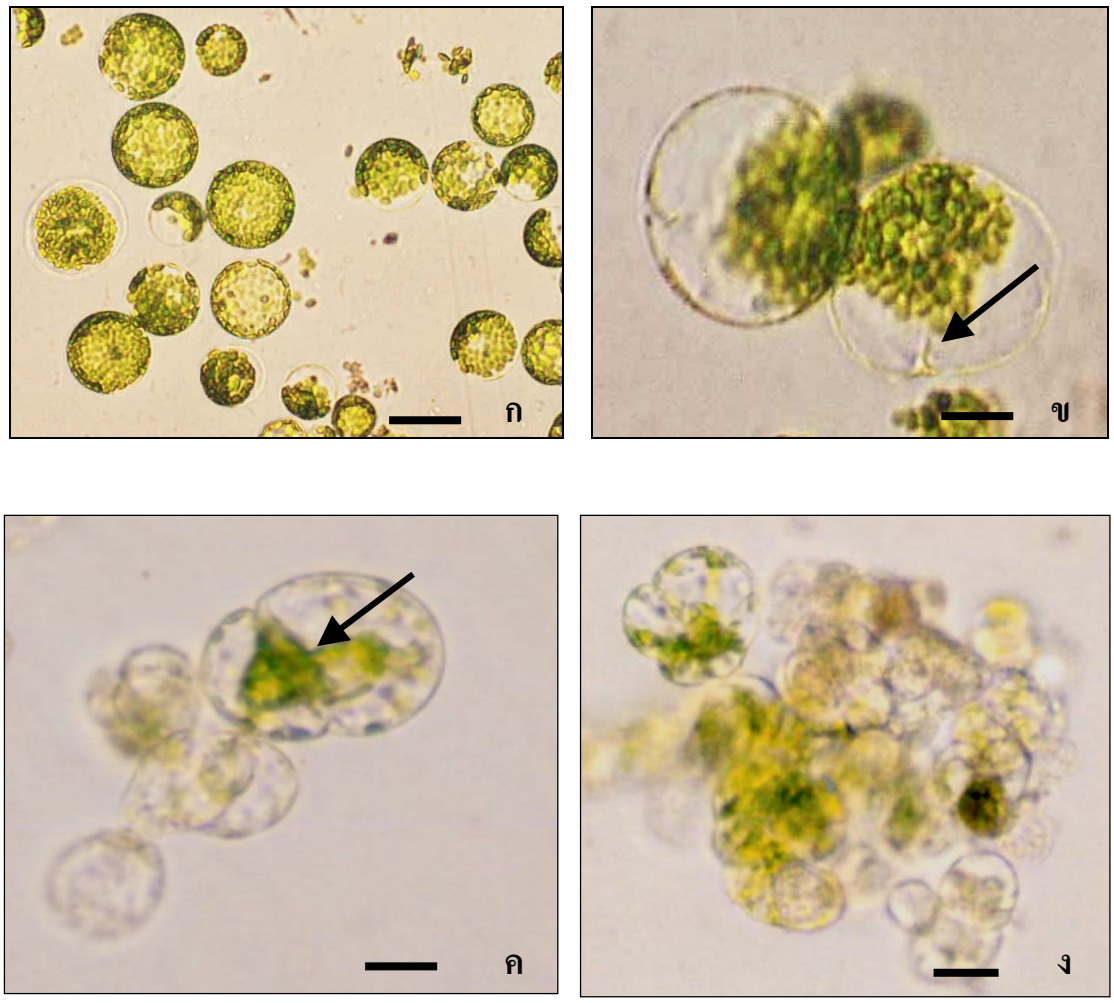
** = เติมอาหารเหลวสูตร MS free

ตารางที่ 14 ผลของเซลล์พี่เลี้ยง และวิธีการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

เซลล์พี่เลี้ยง/วิธีการเลี้ยง	การแบ่งเซลล์				การแตกหน่อ (%)
	2 เซลล์	10-50 เซลล์	>50 เซลล์	รวม	
โปรโตพลาสต์ของยาสูบ					
เติม Phytagel	9.12ab	27.65a	2.95a	39.72ab	1.02f
เติม Agarose	9.06ab	26.59ab	2.16b	37.81bc	1.62bcd
เซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบ					
เติม Phytagel	9.08ab	26.89ab	2.26ab	38.23b	1.23ef
เติม Agarose	8.95ab	24.36b	2.03bc	35.34c	1.87abc
โปรโตพลาสต์ของกุหลาบมอญ					
เติม Phytagel	7.74b	21.69c	1.32cd	30.75d	1.48de
เติม Agarose	5.44c	18.12d	1.03d	24.59e	1.96ab
เซลล์ซัสเพนชั่นของกุหลาบมอญ					
เติม Phytagel	5.97c	19.07d	1.02d	26.06e	1.57cde
เติม Agarose	2.43d	15.16e	0e	17.59f	2.03a
ชุดควบคุม	9.59a	28.86a	2.67ab	41.12a	1.33def
F-test	**	**	**	**	**
C.V (%)	10.48	6.35	24.79	4.86	12.96

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์ที่กำกับด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 12 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเกิดการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ (ศรชี้) ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ก) : โปรโตพลาสต์ก่อนการเพาะเลี้ยง (บาร์ = 50 ไมครอน)

(ข) : เป็นการแบ่งเซลล์ครั้งแรก (บาร์ = 50 ไมครอน)

(ค) : เป็นการแบ่งเซลล์จนได้ไมโครโคโลนี (บาร์ = 100 ไมครอน)

(ง) : เป็นการแบ่งเซลล์จนได้มาโครโคโลนี (บาร์ = 1000 ไมครอน)