15295

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

A Preliminary Study on Protoplast Isolation of Lotus cv. "Buntharik"

T098479

โดย

นางสาว มณฑารพ สุธาธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ. ดร. สุเม อรัญนารถ

วท.
ม1221
2540

เสนอ

เลขหมู่.....
เล[illegible]เบียน.....98479
วั[illegible]น,ปี.....11 Jun 2003

ภาควิชา พืชสวน

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1832

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชา พืชสวน

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
A Preliminary Study on Protoplast Isolation of Lotus cv. "Buntharik"

โดย

นางสาว มณฑารพ สุชาธรรม

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ผศ. ดร. สุเม อรัญนารถ)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(ผศ. ดร. สมชาย กล้าหาญ)
หัวหน้าภาควิชา พืชสวน
วันที่ 16 เดือน มิ.ย. พศ. 41

15295
28 มิ.ย. 2541
ม.พ.
ม 132 ก
2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : **การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก**
(A Preliminary Study on Protoplast Isolation of Lotus cv.“Buntharik”)

โดย : **นางสาว มณฑารพ สุธาธรรม**
อาจารย์ที่ปรึกษา : **ผศ. ดร. สุเม อรัญนารถ**
ภาควิชาพืชสวน : **สาขาวิชา พืชสวน**
คณะ : **เทคโนโลยีการเกษตร**

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยการนำส่วนของใบอายุตั้งแต่ 9 วัน และส่วนของกลีบดอกในระยะเก็บเกี่ยว มาทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุด เพื่อแยกโปรโตพลาสต์ ผลการทดสอบพบว่า การสกัดโปรโตพลาสต์จากใบจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์มากกว่า การสกัดโปรโตพลาสต์จากกลีบดอก และวิธีลอกชั้น lower epidermis ของใบและกลีบดอก จะได้โปรโตพลาสต์ที่มีปริมาณมากกว่าการสับใบและสับกลีบดอก นอกจากนี้ยังได้โปรโตพลาสต์ที่มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกัน ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการแช่เอนไซม์คือ 10 ชั่วโมง และความเร็วรอบในการ ปั่นเหวี่ยง เพื่อสกัดโปรโตพลาสต์คือ 300 rpm นาน 3 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : **A Preliminary Study on Protoplast Isolation of Lotus cv.“Buntharik”**

By : **Miss Montarop Sudhadham**

Adviser : **Assistant Professor Doctor Sumay Arunyanart**

Major : **Horticulture**

Department : **Horticulture**

Faculty of Agricultural Technology

King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang

Bangkok

ABSTRACT

A preliminary study on protoplast isolation of lotus cv. “Buntharik” was undertaken. Leaves 9 days old,and petals from mature flowers were observed for protoplast isolation. The number of protoplasts from lower epidermis of leaves or petals was greater than the number from chopped leaves or petals. The best method for protoplast isolation was 10 hour incubation of leaves and petals in enzyme solution and centrifugation was 300 rpm for 3 minutes.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในระดับปริญญาตรี การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ เป็นผลของความกรุณาให้คำแนะนำปรึกษา การเสนอแนวทางแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆ ของ ผศ. ดร. สุเม อรัญนารถ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณ ชำนะ เปลี่ยนประเสริฐ ที่คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการหาท่อนพันธุ์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ขอบคุณ คุณสยามรัฐ สง่าวงศ์ เจ้าหน้าที่ ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาพืชสวน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการ

ขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ที่ให้การศึกษาและสถานที่ในการปฏิบัติงาน

ขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่เป็นกำลังใจให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดในห้องปฏิบัติการ

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณย่า รศ. สมนึก สุธาธรรม ที่ให้การสนับสนุนปัจจัยต่างๆ ในการเรียน คำสอน พร้อมทั้งกำลังใจตลอดมา

นางสาว มณฑารพ สุธาธรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญตารางภาคผนวก	ค
สารบัญภาพ	ง
คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้	จ
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
สรุปผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่ได้จากการแช่เอนไซม์ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 - ชั่วโมงที่ 15	20
ตารางที่ 2. แสดงผลโปรโตพลาสต์จากการปั่นเหวี่ยงที่เวลา 3,4,5 และ 6 นาที ตามลำดับ	21
ตารางที่ 3. แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการลอกใบชั้น lower epidermis และการสับใบ	22
ตารางที่ 4. แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการลอกกลีบดอกชั้น lower epidermis และการสับกลีบดอก	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1. วิเคราะห์ทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 1 จากการลอกชั้น lower epidermis ของใบ และการสับใบ	33
ตารางภาคผนวกที่ 2. วิเคราะห์ทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 2 จากการลอกชั้น lower epidermis ของใบ และการสับใบ	34
ตารางภาคผนวกที่ 3. วิเคราะห์ผลทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 1 จากการลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอก และการสับกลีบดอก	35
ตารางภาคผนวกที่ 4. วิเคราะห์ผลทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 2 จากการลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอก และการสับกลีบดอก	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1. โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)
ที่ได้จากการลอกใบชั้น lower epidermis (400x) 25

ภาพที่ 2. โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)
ที่ได้จากการสับใบ (400x) 25

ภาพที่ 3. โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)
ที่ได้จากการลอกกลีบดอกชั้น lower epidermis (400x) 26

ภาพที่ 4. โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)
ที่ได้จากการสับกลีบดอก (400x) 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้

CPW	Composition of Media Used for the Washing of Protoplast
rpm	Round Per Minute
mg/l	Milligram Per Liter
M	Molar
mM	Milli Molar
g	Gravity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

A Preliminary Study on Protoplast Isolation of Lotus cv. "Buntharik"

คำนำ

ความคิดที่จะนำเอาโปรโตพลาสต์มาใช้ให้เป็นประโยชน์ในด้านชีววิทยาและเกษตรกรรมนั้น ได้เริ่มมาจากการที่นักวิทยาศาสตร์ได้พบว่า ผนังเซลล์เป็นเครื่องกีดกั้นความยืดหยุ่นในการทำงานของเซลล์เป็นตัวกีดขวางการเคลื่อนที่เข้าออกของสารระหว่างสิ่งแวดล้อมและไซโตปลาซึม จากการดึงเอาผนังเซลล์ออกเสีย พบว่า โปรโตพลาสต์ได้แสดงแนวโน้มที่จะมีประโยชน์มากมายในด้านต่างๆ เช่นใช้ศึกษาในด้านชีววิทยาของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพันธุกรรม หรือพันธุศาสตร์ระดับเซลล์เป็นต้น โปรโตพลาสต์ยังสามารถรักษาคุณสมบัติเฉพาะของพืช คือสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ หลังจากนั้นเซลล์พืชนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เดียวเป็นหลายเซลล์ เป็นแคลลัส และเป็นต้นพืชในที่สุด การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใดๆที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นในขณะที่ยังเป็นโปรโตพลาสต์อยู่ ย่อมเป็นการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของต้นพืชและลูกหลานของมัน ที่มีกำเนิดมาจากโปรโตพลาสต์นั้น ในขณะที่อยู่ในสภาพเปลือยเปล่าปราศจากผนังเซลล์นั้น จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้โปรโตพลาสต์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ด้านเกษตรกรรม อาทิเช่น ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของพืชพันธุ์เดิม เช่น ทนดินเค็ม ทนแล้ง ทนดินกรด ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อให้ปราศจากโรค ผลิตพืชเพื่อให้ได้พันธุ์พืชตามที่เราต้องการโดยการสอดใส่ยีนส์เข้าไปโดยตรง ใช้ศึกษาทางด้านไวรัสพืช เป็นต้น

ในการทดลองนี้มุ่งศึกษาการสกัดโปรโตพลาสต์ จากบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกเนื่องจากบัวเป็นไม้น้ำ (สุชาดา,2530) เจริญเติบโตได้ดีในทุกพื้นที่ของประเทศไทย เกษตรกรจำนวนมากในหลายจังหวัดยึดการปลูกบัวเป็นอาชีพหลักเป็นพืชที่ใช้เงินลงทุนต่ำโดยต้นทุนการปลูกดอกบัว 1 ไร่ ในการลงทุนครั้งแรก ราคาประมาณไร่ละ 7,200-10,000 บาท (กระทรวงพาณิชย์ สำนักงานพาณิชย์จังหวัด ชลบุรี,2538) นอกจากบัวจะสามารถใช้ประโยชน์ในแง่ไม้ตัดดอกได้แล้ว ยังสามารถปลูกเพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆ เช่น เก็บเมล็ด ขายฝักอ่อน ใบแห้ง ขายส่วนของไหลหรือเรียกว่ารากบัว ขายส่วนก้านใบหรือเรียกว่าสายบัว หรือปลูกประดับเพื่อความสวยงาม แม้ว่าบัวจะมีประโยชน์ในหลายๆด้าน แต่ยังมีปัญหาในด้านการตลาดคือ ดอกบัวมีน้ำหนักมาก ทำให้การขนส่งเป็นไปได้ยาก อายุการใช้งานค่อนข้างสั้นเพราะกลีบดอกจะเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล,2531) รูปทรงของดอกและสีที่มีให้เลือกจำกัด (จารีย์,2519) จึงต้องมีการปรับปรุงให้ได้ต้นบัวหลวงที่มีคุณภาพและผลผลิตมากพอที่จะส่งเสริมให้มีการปลูกเพื่อเป็นการค้า ดังนั้น การทดลองนี้จึงมุ่งศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ เพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) Nymphaeceae ซึ่งเป็นวงศ์ของพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปีที่เป็นพืชน้ำทั้งหมด (สุชาดา,2530; Correl and Correl,1975) โดยพืชในวงศ์นี้มี 8 สกุล 50 ชนิด (สุชาดา,2530 ; Gilbert,1982) และมีผู้รวบรวมสกุลบัวที่พบในประเทศไทยมี 4 สกุล คือ Nelumbo, Nymphaea, Victoria และ Braelaya (กสิน,2500) แต่ที่นิยมปลูกมีเพียง 3 สกุล คือ Nelumbo, Nymphaea และ Victoria (อำไพ,2513)

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในสกุล(Genus) *Nelumbo* Adans. (Backer and Bakhuizen, 1963 ; Subramanyam,1962) Gilbert (1962) และ Lawrence (1967) ได้แยกพืชสกุลบัวหลวงออกเป็น 2 ชนิด (Species) คือ *Nelumbo lutea* Pers. และ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Core,1955; Suvatabandhu,1958; Burkill,1966)

Nelumbo Lutea Pers. หรือ *Nelumbium luteum* Willd. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกา (Core,1955) มีชื่อสามัญว่า American Lotus, Water Chinkapin หรือ Yellow Lotus (Harris and Leavy,1975) มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของสหรัฐอเมริกา (Core, 1955 ; Suvatabandhu, 1958) ดอกมีสีเหลืองอ่อนขนาด 6-10 นิ้ว ดอกจะชูขึ้น 3 ฟุต จากพื้นน้ำ ใบมีสีน้ำเงินอมเขียว และใบมีความกว้าง 1-2 ฟุต (Gilbert,1982) บัวหลวงชนิดนี้ขึ้นได้เฉพาะที่มีอากาศหนาวเท่านั้น มีรายงานว่าเคยมีผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย แต่ไม่สามารถเจริญได้ (วินิจวนันดร, 2498 ; Suvatabandhu, 1958)

Nelumbo Nucifera Gaertn. หรือ *Nelumbium speciosum* Willd. หรือ*Nelumbo indica* Pers. หรือ *Nelumbium nelumbo* (L) Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred Lotus , East Indian Lotus, Egyptian Lotus มีถิ่นกำเนิดในเอเชียเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนแถบทะเลสาบแคสเบียนจนถึงญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม,2537) จีน ทิเบต (Core,1955 ; Hutchinson,1959) และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย (Gilbert, 1982)

สำหรับในประเทศไทยตามรายงานพบพืชสกุลบัวหลวงเพียงชนิดเดียวคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. ซึ่งเรียกโดยทั่วไปว่า "บัวหลวง หรือ ปทุมชาติ" (วินิจวนันดร,2498 ; กสิน ,2500 ; Suvatabandhu, 1958) สามารถเจริญได้ดีในน้ำจืดที่มีสภาพเป็นน้ำนิ่งแต่การไหลถ่ายเทได้และมีความลึก 72.5-106.5 เซนติเมตร pH ของน้ำ 7.45 และงอกงามดีเมื่อไม่มีวัชพืชน้ำปะปน (จารีย์,2519) จากการศึกษาของวาสนา (2527) พบว่ามีหลายพันธุ์และหลายชื่อซึ่งอาจแยกออกตามลักษณะรูปร่างและสีของดอกได้ 6 พันธุ์ คือ

- พันธุ์ที่ 1 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู ปทุม ปัทมา หรือ โกกระณต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- พันธุ์ที่ 2 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวหลวงขาว บุณฑริก หรือ ปุณฑริก
- พันธุ์ที่ 3 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ป้อม ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวหลวงชมพูซ้อน สัตตบงกช หรือ บัวฉัตรชมพู
- พันธุ์ที่ 4 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 3 สีขาว มีชื่อว่า บัวหลวงขาวซ้อน สัตตบุษย์ หรือ บัวฉัตรขาว
- พันธุ์ที่ 5 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวเข็มขาว บัวปักกิ่งขาว หรือ บัวหลวงจีนขาว
- พันธุ์ที่ 6 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนพันธุ์ที่ 5 ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวเข็มชมพู บัวปักกิ่งชมพู หรือ บัวหลวงจีนชมพู

ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

วาสนา (2527) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ดังนี้

ลำต้น : ลำต้นอยู่ในดินใต้น้ำเรียกว่าเหง้า อยู่ในดินลึกปริมาณ 5-15 เซนติเมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาว หรือค่อนข้างแดงมีจุดประปราย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีจุดสีน้ำตาล ปล้องรูปทรงกระบอกยาว 3.0-4.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25-3.60 เซนติเมตร ตรงข้อมีตา ที่ให้กำเนิดใบและดอก ส่วนล่างมีราก ในลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น

ราก : เป็นระบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีขาว และหมวกรากใหญ่ เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ใบ : ใบเป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อตั้งตรงชูขึ้นมาเหนือน้ำ โดยจะอยู่ที่ผิวน้ำและชูใบเหนือน้ำหลายระดับ ใบมีรูปร่างเกือบกลม (Suborbicular) เป็นแบบ Peltate leaf มีส่วนที่เว้าเข้ามาตรงข้ามกันที่ขอบใบ 2 ตำแหน่ง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ Palmately Netted Venation ก้านใบแข็งมีหนามสั้นๆขนาดเล็กสีน้ำตาลประปราย และจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านใบ โดยทั่วไปก้านใบมีสีเขียวแต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำจะมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาวเมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น ก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่างของใบ

ดอก : เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่สีขาว สมบูรณ์เพศ มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ดอกออกตรงข้อของลำต้นใต้ดินคู่กับใบแล้วส่งดอกขึ้นมาอยู่เหนือน้ำ ดอกมีขนาดใหญ่ ขณะที่ดอกตูมจะมีลักษณะเป็นรูปไข่ปลายเรียว เมื่อบานมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13-18.5 เซนติเมตร กลีบดอกมี 4-5 กลีบ เรียงตัวเป็น 2 ชั้น สับหว่างกัน ด้านนอกของกลีบมีสีขาวปนเขียว ส่วนด้านล่างมีสีจางลง เส้นบนกลีบมีขนาดใกล้เคียงกันและมีจำนวนมากแต่ไม่นูนเด่นชัด กลีบนอกมีรูปร่างโค้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป่องตรงกลาง กลีบในมี 12-14 กลีบ เรียงตัวเป็นชั้นประมาณ 8 ชั้น โดยรอบของฐานรองดอก กลีบในชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง ด้านนอกของกลีบจะมีสีเหลืองปนเขียว ด้านในมีสีอ่อนกว่าเห็นเส้นบนกลีบมีสีขาว และมีขนาดใกล้เคียงกันเป็นจำนวนมาก ชั้นที่อยู่ตรงกลางจะมีขนาดใหญ่ที่สุด มีรูปร่างรูปไข่แต่มีส่วนกว้างอยู่ตอนบน(Obovate) เห็นเส้นบนกลีบในชัดเจนประมาณ 5 เส้น มีสีขาวนวลโดยตลอด ทั้งด้านนอกและด้านในยกเว้นส่วนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีเหลือง เกสรตัวผู้มี 90-117 อัน อยู่เหนือกลีบชั้นใน ก้านเกสรตัวผู้เรียวเล็ก มีสีเหลืองนวลตอนบนมีอับเรณูสีเหลืองสด ติดตามความยาวของแกนเหนืออับเรณูขึ้นไปมีส่วนปลายสีขาว ขุ่น รูปร่างเรียวเล็กที่ฐานและใหญ่ที่ส่วนปลาย ความยาวของส่วนปลาย 0.25-0.30 เซนติเมตร เกสรตัวผู้มีกลิ่นหอม เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่สูงกว่าเกสรตัวผู้ มีสีเหลืองนวล มีผนังหนาฝังอยู่ส่วนบนของฐานรองดอกมีลักษณะรูปกรวยและมีสีเหลือง ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น ยอดเกสรตัวเมียแบนกลม สีเหลืองเป็นมัน แข็ง ในดอกหนึ่งจะมี Carpel 15-30 อัน และอยู่กระจายไม่ติดกัน ภายในแต่ละรังไข่จะมีไข่อยู่ 1 อัน (จารีย์, 2519) ก้านดอกแข็งเหมือนก้านใบคือ ก้านดอกแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายและจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านดอก โดยทั่วไปก้านดอกมีสีเขียว แต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาว เมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น

กลีบเลี้ยง : ลักษณะเป็นรูปไข่รี เหี่ยว และร่วงง่าย แต่บางครั้งก็อยู่จนติดเป็นผล กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกันมากแยกจากกันได้ยาก กลีบเลี้ยงจะมีสีขาวอมเขียว

ผล : เป็นผลกลุ่ม (Aggregate Fruit) มักเรียกกันว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อยๆ เมื่ออ่อนเปลือกหนาสีเขียว ด้านในสีขาว พอแก่เปลือกเป็นสีดำและแข็ง ผลอ่อนแต่ละผลเป็นแบบ Nut มักเรียกกันว่า เมล็ดบัว

เมล็ด : มีเปลือกหุ้มบางสีขาว อ่อนนุ่ม ภายในมีใบเลี้ยงหนา มีสีขาวนวล 2 ใบ ไม่มี Endosperm (Exalbuminous Seed) ต้นอ่อนมีสีเขียวเข้มมักเรียกกันว่า ดีบัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast Culture)

โปรโตพลาสต์หมายถึง เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ (Cell wall) เซลล์พืชทุกชนิดนอกจากจะมีเซลล์เมมเบรนแล้ว ยังมีผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยสารพวก Cellulase และ Hemicellulase เซลล์พืชแต่ละเซลล์ที่อยู่ติดกันจะเชื่อมด้วยชั้น Middle lamella ซึ่งประกอบด้วยสารพวก Pectin (ประศาสตร์ ,2538 ; รังสฤษดิ์ ,2540)

คำว่าโปรโตพลาสต์ถูกนำมาใช้โดย Hanstein ในปี คศ. 1880 เพื่ออธิบายถึงสารมีชีวิตต่างๆ ซึ่งถูกล้อมรอบอยู่ภายในผนังเซลล์ของพืช โปรโตพลาสต์ที่ถูกแยกออกมานั้นไม่ใช่ลักษณะปกติของพืช เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นสิ่งเดียวที่หุ้มสารต่างๆ ในเซลล์นั้นแตกได้ง่าย ดังนั้น ความสำเร็จในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการรักษาระดับความดันออสโมซิสของโปรโตพลาสต์

การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เริ่มมาตั้งแต่สมัย Klercher (1982) ซึ่งแยกออกมาโดยวิธีกล โดยใช้ใบมีดโกนตัดเซลล์ ส่วนโปรโตพลาสต์จะแยกหลุดออกมาได้ แต่การแยกด้วยวิธีนี้ จะได้โปรโตพลาสต์ออกมาน้อยจึงไม่เป็นที่นิยม ปัจจุบันนี้โปรโตพลาสต์สามารถแยกออกมาได้เป็นจำนวนมาก โดยการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชซึ่งCocking ในปี คศ. 1968 ได้นำเอาวิธีกลรวมกับการใช้เอนไซม์ มาแยกโปรโตพลาสต์ทำให้สามารถแยกโปรโตพลาสต์ออกมาได้เป็นจำนวนมาก

ประโยชน์ของโปรโตพลาสต์ในแง่เกษตรกรรม

1. ใช้คัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อให้ปราศจากโรค
2. ปรับปรุงพันธุ์เพื่อทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของพืชพันธุ์เดิม เช่น ทนดินเค็ม ทนแล้ง ทนดินกรด เป็นต้น
3. การผสมพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พืชสายพันธุ์ใหม่
4. การผลิตพืชเพื่อให้ได้พันธุ์พืชตามที่เราต้องการสอดใส่ยีนส์เข้าไปโดยตรง
5. ใช้ศึกษาหรือทดสอบสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช
6. ใช้ศึกษาทางด้านไวรัสพืช
7. ใช้ขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมาก
8. ใช้ศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เช่น ศึกษาทางชีวเคมี, สรีรวิทยา, กายภาพหรือขบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (ศาลักษณ์,2539)

เทคนิคการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นี้ ในระยะแรกของการศึกษาพบว่าประสบความสำเร็จค่อนข้างสูงในพืชตระกูล Solanaceae เท่านั้น พืชแรกที่มีรายงานว่าสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาเลี้ยงให้เจริญเป็นต้น หลังจากแยกมาอยู่ในสภาพโปรโตพลาสต์แล้ว ตลอดจนนำมาศึกษาด้านต่างๆ ที่เกี่ยวกับการผสมพันธุ์ และการใช้ประโยชน์ทางด้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส คือ ยาสูบชนิดต่างๆ หลังจากนั้น เทคนิคนี้ก็ได้นำมาใช้กับพืชชนิดอื่นๆ แต่ในระยะแรกกลับพบว่าเทคนิคที่เคยใช้ได้ดีกับยาสูบนั้น ใช้ไม่ค่อยได้ผลหรือได้ผลไม่ดีนักกับพืชอื่นๆ อย่างไรก็ตาม หลังจากการทุ่มเทความพยายามของนักวิชาการทั้งหลาย ปัจจุบันพบว่าสามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดอื่นได้ดีเช่นเดียวกับยาสูบ ทำให้การศึกษาด้านนี้กับพืชชนิดอื่นๆ ขยายวงกว้างออกไปอย่างรวดเร็ว ความสำเร็จดังกล่าวนี้จะขึ้นกับปัจจัยต่างๆ คือ

1. สภาพของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์

เนื่องจากการแยกโปรโตพลาสต์ แม้ว่าจะสามารถแยกได้จากส่วนต่างๆของพืช เช่น ใบ เกสรตัวผู้ หัว เป็นต้น แต่ส่วนมากแล้วนิยมแยกจากส่วนของใบ คือ ส่วนที่เป็น **mesophyll cells** ดังนั้น บางรายงาน จึงอาจใช้คำว่า **mesophyll protoplasts** แทนคำว่า **protoplast** เพียงอย่างเดียว

ปัจจัยที่เกี่ยวกับพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์นี้ จะขึ้นกับสภาพแวดล้อมและช่วงอายุที่พืชเจริญอยู่ กล่าวคือ ถ้าพืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีเท่าไร โอกาสที่จะได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากและดี คือ สามารถเลี้ยงได้รอดได้มากก็สูงตามไปด้วย ดังนั้นผู้ที่ทำการศึกษาจะต้องระมัดระวังให้ปุ๋ยและน้ำกับพืชอย่างสม่ำเสมอ เพื่อไม่ให้การเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงักลงช่วงใดช่วงหนึ่ง ปุ๋ยที่ให้อาจใช้สูตร 20-20-20 ในอัตรา 1 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร รดทุกวัน ทั้งนี้จะขึ้นกับชนิดของพืชและช่วงอายุของพืชที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วย

นอกจากปุ๋ยแล้ว สภาพอุณหภูมิ ความเข้มของแสงที่พืชได้รับ ช่วงเวลาสั้น-ยาว ของวันและความชื้นสัมพัทธ์ ต่างก็มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้เช่นกัน ในกรณีที่สามารถควบคุมปัจจัยเหล่านี้ได้ เช่น มีตู้พิเศษที่ใช้เลี้ยงต้นพืช (**growth chamber** หรือ **Phytotron**) อาจปรับให้ระดับอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24-28 °ซ ความเข้มของแสงประมาณ 10,000-20,000 ลักซ์ ความยาวของวันไม่ต่ำกว่า 15 ชั่วโมง และให้มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70-75 % ในสภาพดังกล่าว จะทำให้พืชเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีใบแผ่ขยายกว้าง ตลอดจนความหนาของเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดที่จะต้องลอกออกในขั้นตอนของการแยกโปรโตพลาสต์นั้นพอเหมาะไม่บางจนขาดได้ง่ายเหมือนพืชที่ได้รับแสงที่ความเข้มต่ำๆ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยดังกล่าวอาจแปรตามชนิดของพืชซึ่งแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย สำหรับในสภาพของห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่มีงบประมาณในการจัดซื้อเครื่องมือดังกล่าวได้ อาจปลูกพืชในเรือนกระจกธรรมดา ให้ปุ๋ยและน้ำอย่างสม่ำเสมอ ก็สามารถนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ได้ดีเช่นกัน เพียงแต่ควรระมัดระวังในการทำความสะอาดใบก่อนที่จะแยกโปรโตพลาสต์ให้รอบคอบ เพื่อกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในภายหลังของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชบางชนิดหลังจากที่ลอกเซลล์ชั้นนอกออกแล้ว อาจนำใบมาเลี้ยงในอาหารก่อนที่จะแยกโปรโตพลาสต์จริงๆ ก็ได้ ซึ่งจะเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างกระทันหันเกินไป นอกจากนี้จะป้องกันการปนเปื้อนเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างดีอีกด้วย

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า ช่วงอายุการเจริญของพืชที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ก็มีส่วนอย่างมากต่อการแยกโปรโตพลาสต์โดยเฉพาะในแง่ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้ จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากพืชที่มีอายุต่างๆกันพบว่า พืชที่มีอายุมาก โดยเฉพาะในช่วงที่เริ่มออกดอกจะได้โปรโตพลาสต์ดีกว่าช่วงอื่นๆ ทั้งนี้สันนิษฐานว่าในช่วงดังกล่าวเซลล์ของพืชส่วนมากมีการเจริญเต็มที่ ดังนั้นการที่จะซ่อมหรือสร้างส่วนที่ถูกทำลายในระหว่างขบวนการย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของการแยกโปรโตพลาสต์นั้น จะทำได้ช้า จึงทำให้โปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาแล้วมักแตกสลายตัวได้ง่าย ซึ่งส่งผลให้ได้โปรโตพลาสต์น้อยกว่าช่วงที่พืชยังมีอายุน้อยหรือในช่วงที่พืชกำลังเจริญอย่างรวดเร็ว (ประสาทพร,2528)

เนื่องจากความยาก ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของใบธัญพืช และพืชบางชนิด โดยใช้ท่อนพันธุ์ที่แตกต่างกัน ปริมาณของโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยขึ้นอยู่กับ อัตราการเจริญเติบโตและระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์บ่อยๆ (ทุกๆ 3 วัน) และเซลล์ที่นำมาสกัดจากระยะ log phase ตอนต้น จะเหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์มากที่สุด (Razdon and Bhojwani,1983)

2. Pre-enzyme treatment

เป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญที่จะฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อจากพืชที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่ไม่ปลอดเชื้อ นอกจากนี้ยังทำให้การซึมแผ่กระจายเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ของใบของสารละลายเอนไซม์ทำได้สะดวกขึ้น ซึ่งมีความจำเป็นและมีผลต่อการย่อยของเอนไซม์ วิธีง่ายๆ ที่นิยมใช้คือ ลอกชั้น lower epidermisออก แล้วนำไปแช่ในสารละลายเอนไซม์ โดยให้ใบด้านที่ถูกลอกชั้น lower epidermis ออกสัมผัสกับสารละลาย (Razdon and Bhojwani,1983)

3. เอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์

มีเอนไซม์หลายชนิดที่ขายเป็นการค้าและสามารถใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ได้ ชนิดของเอนไซม์ที่จะเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้อาจเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันเพื่อทำลายองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ เช่น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเปคติน (pectin) เอนไซม์เซลลูโลส อาร์เอส (cellulose RS) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และเป็นเอนไซม์เซลลูโลสชนิดที่แรงที่สุดในทางการค้า นิยมใช้ในการย่อยผนังเซลล์หนาๆ ของเซลล์แขวนลอย ส่วนไมเซลเลส (meicelase) ซึ่งเป็นเอนไซม์เซลลูโลสที่อ่อนกว่า แต่ก็เหมาะสมต่อการย่อยผนังเซลล์ที่บางกว่าของเซลล์มีโซฟิลล์ของใบโดยไม่ทำอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์เซลลูโลสร่วมกับเปคติเนสในการสกัดโปรโตพลาสต์แบบขั้นตอนเดียว มาเซอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(macerase) เป็นเอนไซม์ที่อ่อนมักใช้ร่วมกับเปคติเนส อย่างไรก็ตาม เปคติเนส วาย-23 (pectinase Y-23) ควรเลือกใช้กับพืชที่สกัดโปรโตพลาสต์ได้ยาก เอนไซม์ที่ขายเป็นการค้ามักจะมีสารพิษเจือปนอยู่ด้วยไม่มากก็น้อย เช่น นิวคลีเอส (nuclease) ซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ ดังนั้นบริษัทหลายแห่งจึงได้ดึงเกลือออกจาก (desalt) เอนไซม์ก่อนนำไปใช้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเซลลูเลสที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรโตพลาสต์ต่ำกว่าเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ปานกลาง ซึ่งแสดงว่านอกเหนือจากเซลลูเลสแล้ว คงต้องมีสารตัวอื่นๆ ที่ไม่อาจบ่งบอกได้ซึ่งจำเป็นในการสกัดโปรโตพลาสต์ (ประภา,2539)

การทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับค่า pH ด้วยค่า pHที่เหมาะสมของเอนไซม์โอโนซูกะ เซลลูเลส อาร์-10 (Onozuka Cellulase R-10) และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 (Macerozyme R-10) ซึ่งเปิดเผยโดยผู้ผลิตคือ pH ที่ 5-6 และ pH ที่4-5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติค่า pH ของสารละลายเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีค่าระหว่าง pH 4.7-6.0 (Razdon and Bhojwani ,1983)

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อปริมาณของโปรโตพลาสต์คือความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ต่อจำนวนของเนื้อเยื่อที่ใช้ โดยทั่วไป สารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อเนื้อเยื่อ 1 กรัม เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ (Razdon and Bhojwani,1983)

4. ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซิส

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีแรงดันออสโมซิสแตกต่างกัน ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้จึงจำเป็นต้องทดสอบก่อนที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์จำนวนมากๆ นอกจากนี้ชนิดของสารเคมีที่นำมาใช้ จะให้ผลแตกต่างด้วยเช่นกัน สารบางชนิดอาจเหมาะกับพืชชนิดหนึ่ง แต่ไม่เหมาะกับพืชชนิดอื่นก็ได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันนิยมใช้สารประกอบประเภทน้ำตาล-แอลกอฮอล์ แทนสารอนินทรีย์เดี่ยวๆ ดังที่เคยใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการแยกโปรโตพลาสต์ในระยะแรกๆ เนื่องจากได้ผลดีกว่าและสามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิด

สารที่ใช้ในการรักษาความดันออสโมซิสนี้ เซลล์พืชอาจนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น glucose หรือ sucrose หรือไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น manitol ข้อดีของการที่พืชนำมาใช้ประโยชน์ได้คือ จะลดแรงดันออสโมซิสลงเรื่อยๆ ซึ่งจะทำให้ไม่เกิดการชะงักการเจริญในช่วงของการเปลี่ยนอาหารในระยะหลังของการเจริญ คือ ในระยะที่เป็นแคลลัส หรือช่วงที่เริ่มเจริญเป็นยอดหรือต้นที่สมบูรณ์แล้ว (ประสาทพร,2528)

5. องค์ประกอบของสารประกอบที่มีภายในเซลล์พืช

องค์ประกอบในที่นี้หมายถึง สารประกอบบางอย่างที่พืชสะสมไว้ภายในเซลล์ ของพืชเอง ไม่ว่าจะในรูปของผลึกต่างๆ หรือในรูปของสารละลายเข้มข้น เพราะจะมีผลต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์หลังจากแยกได้แล้ว ตัวอย่างของพืชที่พบว่ามีผลึกของสารประกอบอยู่ภายในเซลล์ คือ ลำโพง (*Datura spp.*) เป็นต้น ผลึกดังกล่าวมักจะเริ่มทิ่มแทงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาดและเป็นเหตุให้โปรโตพลาสต์แตกได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์

เนื่องจากพืชแต่ละกลุ่มต้องการเทคนิคในการแยกโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน เช่น ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เราไม่สามารถลอกเอาเซลล์ชั้นนอกออกได้ ต้องใช้วิธีหั่นให้เป็นฝอยด้วยมีดโกนที่คมๆแทน ซึ่งพบว่า ถ้าหั่นชิ้นหนาเกินไปจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์น้อยตามไปด้วย เนื่องจากการแทรกซึมของเอนไซม์ไปยังเซลล์ต่างๆเป็นไปได้น้อย

การแยกโปรโตพลาสต์โดยวิธีอาศัยการเขย่าช่วยก็เช่นกัน ถ้าปรับจำนวนรอบของการเขย่าสูงเกินไป ก็จะทำให้โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก ถ้าปรับให้ช้าเกินไปจะเสียเวลานานในการแยก เป็นต้น

7. อุณหภูมิที่ใช้ในการแยก

เท่าที่เคยทดลองพบว่า ปัจจัยในข้อนี้ไม่ค่อยมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มากนัก เว้นแต่จะปรับให้อุณหภูมิสูงเกินไปจนทำให้เอนไซม์ที่ใช้เสื่อมคุณสมบัติ หรือทำให้โปรโตพลาสต์เสียชีวิตหมด อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิสูง (ประมาณ 30°ซ) จะช่วยทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ สั้นลงกว่าอุณหภูมิต่ำ (25°ซ) ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ก็ได้ แต่อุณหภูมิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ คือ 28°ซ

8. บุคคลที่แยกโปรโตพลาสต์

อาจนับได้ว่าเป็นปัจจัยที่ค่อนข้างจะสำคัญที่สุด เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับ โปรโตพลาสต์เป็นงานที่ต้องการความละเอียด และความใจเย็นเป็นอย่างยิ่ง ถ้าผู้แยกโปรโตพลาสต์ขาดคุณสมบัติทั้ง 2 ประการนี้ จะทำการศึกษาให้ดีได้ยาก ดังที่เคยพบเสมอว่า ในระหว่างขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ โดยเฉพาะในช่วงการถ่ายโปรโตพลาสต์หลังจากที่ปั่นให้ตกตะกอนแล้วนั้น ถ้าทำแรงเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้แตกเสียหายได้ง่าย เพราะเยื่อหุ้มเซลล์ในขณะนั้นค่อนข้างบางและฉีกขาดได้ง่าย (ประสาทพร,2528)

<u>การสกัดโปรโตพลาสต์</u>

การสกัดโปรโตพลาสต์ (Protoplast isolation) จากพืชชั้นสูงจะต้องคำนึงถึงหลักการที่สำคัญ 2 ประการคือ 1) ในการทำลายผนังเซลล์เพื่อปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกจากเซลล์จะต้องไม่ทำให้เกิดอันตรายกับโปรโตพลาสต์ และ 2) จะต้องรักษาแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ให้เหมาะสมเพื่อโปรโตพลาสต์คงตัวอยู่ได้ ไม่แตกหรือเหี่ยวเฉา (ประภา,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์

เนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ได้ เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบ ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และผล แต่เนื้อเยื่อชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll tissue) ของใบ และเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยง (culture cell suspention) เป็นเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่นิยมใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ เนื่องจากทั้งสองแหล่งให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูง และเป็นแหล่งที่ใช้สกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด (ประภา ,2539)

วิธีการสกัดโปรโตพลาสต์ แบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

1) **วิธีกล (Mechanical isolation)**

ในระยะแรกๆ การสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อพืชกระทำโดยวิธีนี้ ซึ่งขั้นตอนแรกของการกระทำจะต้องชักนำให้เซลล์เกิดการพลาสโมไลซิส(plasmolysis) เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์ร่นจากผนังเซลล์ ซึ่งจะทำให้โปรโตพลาสต์มีรูปร่างกลมๆ อยู่ตรงกลางเซลล์ ต่อจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่มีเซลล์อยู่ในสภาพพลาสโมไลซิสมาตัดให้เป็นแผ่นบางๆ นำไปแช่ในสารละลายเพื่อให้โปรโตพลาสต์ดูดน้ำจนเซลล์เต่ง ซึ่งจะมีผลทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากผนังเซลล์ อย่างไรก็ตาม การสกัดโปรโตพลาสต์โดยวิธีนี้มีข้อจำกัด คือ โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มีปริมาณน้อย และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ที่ได้รับความเสียหายจะปลดปล่อยสารบางชนิดออกมา ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์อื่นๆ นอกจากนั้น วิธีการนี้ใช้ได้ผลดีกับเนื้อเยื่อบางชนิดที่เซลล์มีขนาดใหญ่ และมีช่องว่าง (vacuole) ภายในเซลล์ หรือเซลล์ที่มีรูปร่างยาว เช่น เซลล์ของใบ หัวกลีบ (bulb scale) เนื้อเยื่อชั้นผิวนอกสุด (epidermis) ของผล และเนื้อเยื่อที่มีการสะสมอาหาร (storage tissue)

2) **วิธีสกัดโดยใช้เอนไซม์ (Enzyme Isolation)**

Cocking (1960) เป็นคนแรกที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Myrothecium verrucaria* ย่อยสลายผนังเซลล์ เพื่อสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อรากมะเขือเทศ ต่อมามีการใช้เอนไซม์ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อของพืชชนิดอื่นๆ อีกมากมาย การสกัดโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์จะให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตในปริมาณสูงโดยไม่ทำอันตรายต่อ โปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) ไดรเซลเลส (dricellase) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสและเปคติเนส (pectinase) มาเซอโรไซม์ (macerozyme) ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของพืชนั้นๆ การสกัด โปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์กระทำได้ 2 วิธี ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. วิธีสองขั้นตอน (Sequential or Two-step Method) ทำได้โดยขั้นตอนแรกจะต้องนำเนื้อเยื่อใบที่ลอกผิวใบชั้นล่าง (lower epidermis) ออกไปแล้วมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วแช่ในสารละลายมาเซอโรไซม์ ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเปคติเนส เอนไซม์นี้จะทำลายมิดเดิล ลาเมลลา (middle lamella) ที่เชื่อมระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์มีโซฟิลล์ (mesophyll cell) ของใบแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ขั้นตอนที่สอง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในสารละลายเซลลูเลส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งจำทำให้โปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยออกมา

ข. วิธีขั้นตอนเดียว (Direct or One-step Method) ทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อพืชแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์สองชนิดปนกันอยู่ คือ เปคติเนส และเซลลูเลส เอนไซม์ทั้งสองจะย่อยสลายมิดเดิลลาเมลลาที่เชื่อมระหว่างเซลล์และผนังเซลล์พร้อมกันไป ทำให้โปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์อย่างรวดเร็ว วิธีนี้จึงได้รับความนิยมมากกว่าวิธีแรก เนื่องจากทำได้สะดวก รวดเร็วกว่าและลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (ประภา,2539)

<u>การทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์</u>

ภายหลังการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบหรือเซลล์แขวนลอยแล้ว จะต้องมีการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ (purification) ซึ่งกระทำได้โดยการกรอง (filtration) การปั่นแยก (centrifuge) และการทำให้โปรโตพลาสต์ลอยตัว (flotation) การกรองซึ่งเป็นขั้นตอนแรกจะทำได้โดยการนำสารละลายซึ่งประกอบด้วยโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ และเศษชิ้นส่วนต่างๆของเซลล์ (debris) มากรองผ่านเครื่องกรอง (filter) หยาบๆ ที่มีรูขนาด 50-70 ไมครอน ซึ่งอาจเป็นผ้าหรือไนลอน เมส (nylon mesh) เซลล์ที่ไม่ถูกย่อยหรือเศษชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่จะถูกกรองไว้อยู่ด้านบนของเครื่องกรอง ส่วนโปรโตพลาสต์ เศษชิ้นส่วนขนาดเล็ก และสารละลายเอนไซม์ซึ่งผ่านเครื่องกรองออกไปทางด้านล่างจะถูกนำไปปั่นโดยเครื่องแยกสาร (centrifuge) ที่ความเร็ว 75-100 X g นาน 2-3 นาที เพื่อทำให้ โปรโตพลาสต์ตกตะกอน (precipitate) ส่วนเศษชิ้นส่วนต่างๆ จะลอยอยู่ด้านบน เทสารละลายเอนไซม์พร้อมกับเศษชิ้นส่วนต่างๆ ทิ้งไป เติมสารละลายใหม่ที่มีออสโมติคัมลงบนโปรโตพลาสต์ แล้วปั่นที่ความเร็ว 50 X g นาน 3-5 นาที ทำเช่นนี้อีก 2-3 ครั้ง เพื่อล้างทำความสะอาดโปรโตพลาสต์และขจัดเอนไซม์ที่หลงเหลืออยู่ หลังจากนั้นจึงนำโปรโตพลาสต์ไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป วิธีการนี้เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ เพราะว่าได้ใช้ออสโมติคัมชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ตลอดขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ (Razdon and Bhojwani,1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยด้านโปรโตพลาสต์

พงศ์ยุทธ และคณะ (2537) ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) รายงานว่าแคลลัสแบบ friable ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4- D และ BA เท่านั้นที่สามาถใช้เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์ได้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสคือ ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอโรไซม์ 4 : 0.5 %แมนนิทอล 11 และ 13 % และ pH 5.6 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง และการเติบโตของเซลล์อยู่ในช่วง log phase ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยคือความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3 : 0.5 % แมนทินอล 10 % pH 5.2 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมงการเติบโตของเซลล์อยู่ในช่วง log phase เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่ไม่ใส่ฮอร์โมนจะสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายใน 4 วัน แต่โปรโตพลาสต์ไม่มีการเจริญเติบโตต่อ

รงรอง (2540) ได้ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบลูกผสมพันธุ์ *Rosa x hybrida* cv. Gelb Dagmer Hastrap กับ *R. chinensis* mutabilis โดยเลี้ยง callus ซึ่งเจริญมาจากต้นอ่อน (immature embryo) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.01 mg/l และ glutamine 1 g/l จากนั้นศึกษาแยก protoplasts โดยแช่กลุ่มเซลล์ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย Cellulase onozuka RS 2 % , Macerozyme R-10 0.5% ,Pectolyase y-23 0.05% นานประมาณ 6 - 8 ชั่วโมง และทำให้ protoplast ที่แยกได้บริสุทธิ์ โดยกรองผ่านตะแกรงไนลอน 60 ไมครอน และปั่นด้วยความเร็ว 800 rpm นาน 3 นาที แล้วกรองอีกครั้งด้วยตะแกรงขนาด 40 ไมครอน จากนั้นนำไปปั่นและล้างอีก 2 ครั้ง ด้วย Washing solution (mannitol 0.6M ,$CaCl_2.2H_2o$ 5mM) นำไปนับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย hemocytometer ได้ประมาณ $1.01x10^6$ เซลล์ต่อ 1 กรัมน้ำหนักสด

Shepard and Totten (1975) ได้ทำการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบชั้น mesophyll ของใบยาสูบ (*Nicotiana tobacum* L. cv. Xanthi-nc) พบว่า น้ำหนักใบที่ใช้ประมาณ 2 กรัม ใน evacuation flask ขนาด 250 ml ที่บรรจุด้วยสารละลาย 100 ml ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งประกอบด้วย 0.5 % macerozyme (Yakult Biochemicals Ltd.) , 4% Cellulase (Onozuka SS, Yakult Biochemicals) , 2% PVP (mol wt 10,000 , Sigma Chemical Co.) และ 0.2 M sucrose ที่ pH 5.4 โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 21 °ซ บน Model G-76 Gyrorotary shaker (New Brunswick) ที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 4 ถึง 6 ชั่วโมง เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มานับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย hemocytometer พบว่าได้โปรโตพลาสต์ประมาณ 2 $\times 10^6$ cells/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shepard and Totten (1977) ได้ทำการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบชั้น mesophyll ของมะเขือเทศ (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank) ความเข้มของสารละลายที่เหมาะสมคือ sucrose 0.3 M, Maccrozyme R-10 0.1 กรัม (Kinki Yakult Co., Nishinomiya,Japan) , Cellulase R-10 0.5 กรัม (Kinki Yakult Co.) PVP 2 กรัม (mol wt 10,000, Sigma Chemical Co. St. Louis,Mo.) ในสารละลายเกลือ 0.01 M MES (Sigma Chemical Co.) ในสภาพบัฟเฟอร์, ปรับ pH ที่ 5.6 ด้วย KOH แช่ไว้นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ซ บน gyratory shaker ความเร็ว 40 rpm จากนั้นนำไปสกัดแยกโปรโตพลาสต์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 35 g นาน 8 นาที ความหนาแน่นของ โปรโตพลาสต์ 6 $\times 10^5$ cells / ml

Franceschi *et al.* (1984) ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ จากใบชั้น mesophyll และ PVMP (paravenial mesophyll protoplasts) จากใบของถั่ว (*Glycine max* L. Merr. Cv. Wye) ความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมคือ 2 % (w / v) Cellulase CEL หรือ 2.65 % (w / v) Cellulase CELF (Worthington Diagnostics, NJ) , 0.5 % (w /v) Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co. Japan) , 0.4 M mannitol , 10 mM $CaCl_2$,1 % (w/v) BSA และ 5 mM 2(N-morpholine) ethanesulfonic acid (MES) ที่ pH 5.8 นาน 3-4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เมื่อนำโปรโตพลาสต์ไปทำการปั่นเหวี่ยง ที่ 300 g นาน 5 นาที

Moreno *et al.* (1984) ได้สกัดโปรโตพลาสต์จากใบของแตงเมลอน (MELON) (*Cucumis melo* L.) เพื่อนำมาเลี้ยงให้เป็นแคลลัส พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมคือ 2 % Cellulase Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Ltd.), 0.6 M-mannitol ในสารละลายเกลือ MS ซึ่งในสารละลาย MS นี้ประกอบด้วย 4 % sucrose, 2.5 mg/l naphthalene acetic acid, 1 mg/l G-benzyla minopurine, 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l thiamine-HCL และ 0.8 % agar บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 5 ชั่วโมง โดยบ่มบน reciprocal shaker ความเร็ว 100 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 75 g และสามารถย่อยโปรโตพลาสต์ได้ประมาณ 7$\times 10^6$ ถึง 12$\times 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อ 1 กรัมน้ำหนักสด

Paltin *et al.* (1984) ได้สกัดโปรโตพลาสต์จากใบของพิทูเนีย (*Petunia parodii* W.C.S. and *Petunia hybrida* (Hook) Vilm. โดยลอกชั้น lower epidermis ออก ความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมคือ 0.3 % Cellulase R-10, 0.15 % Macerozyme R-10 (Maruzen Chem. Co., Osaka, Japan, 13 % manitol และ inorganic salts บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ใต้แสงไฟ 100 lux (daylight fluorescent tubes, Tadiran, Tel Aviv, Israel)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bhadra (1994) ได้สกัดโปรโตพลาสต์ จาก hypocotyl ของ *Vigna sublobata* L. ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้คือ 20 g/l Rhozyme HP 150 (Rhom and Haas, Co.,Philadelphia,USA) ,20 g/l Meicelase (Meiji Seika kaisha , Tokyo, Japan) , และ 300 mg/l Macerozyme R10 (Yakult Homsha Co. Ltd., Nishinomiya Hyogo, Japan) ในสารละลาย CPW 13 M โดยบ่มไว้นาน 16-18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 30 rpm ภายใต้ความเข้มแสง 4.6 μ mol s^{-1} m^{-2} ของแสง cool white fluorescent จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ไปกรองบน nylon sieve ขนาด 64 μm mesh ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 60 g นาน 7 นาที

Sando and Goto (1994) ได้ทำการสกัดโปรโตพลาสต์ จากใบชั้น mesophyll ของ *Arabidopsis thaliana* line WS พบว่าความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมคือ 1 % potassium dextran sulfate (Meito Sangyo, Nagoya, Japan), 0.05 % Pectolyase Y-23 and 0.5 % Cellulase Y-C (Seishin Pharmaceutical , Tokyo , Japan) ในสารละลาย 0.1 M manitol บ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ นาน 50 นาที ภายใต้สภาพมีแสง จากนั้นนำไปกรองผ่าน nylon mesh (108 μm and 62 μm) แล้วนำสารละลายไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงนาน 7 นาที ใช้ความเร็วรอบ 10×g จากนั้นนำสารละลายที่มีโปรโตพลาสต์ไปทำความสะอาด โดยใช้ 0.4 M manitol และ 0.2 M $CaCl_2.2H_2O$ ปั่นเหวี่ยงนาน 5 นาที โดยใช้ความเร็วรอบ 10×g โปรโตพลาสต์ที่ได้มีประมาณ 4-7 × 10^5 Cells/ml

Wang *et al.* (1994) ได้ทำการสกัดโปรโตพลาสต์จากลำต้นของต้น Simon poplar (*Populus simonii*) ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้คือ 1 % Cellulase Onozuka RIO, 0.5 % Cellulase Onozuka RS, 1% Macerozyme R-10 และ 0.1 % Pectolyase Y-23 ในสารละลาย 0.4-0.7 M manitol, 10.02 mM $CaCl_2.2H_2O$, 0.62 mM KH_2PO_4 และ 3.07 mM MES ที่ pH 5.7 บ่มไว้นาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายไปกรองผ่าน nylon sieve ขนาด 45 μm แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 rpm นาน 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
    - ใบ อายุตั้งแต่ 9 วัน
    - ดอก ระยะเก็บเกี่ยว (อายุประมาณ 75-90 วัน หลังจากปลูก)
2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์
    - pastaur pipette
    - จานแก้ว (petri-dish)
    - ปากคีบ (forcep) , มีดผ่าตัด (scalpel) , ใบมีดผ่าตัด (blades)
    - หลอดแก้ว (tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมสาร
    - บีกเกอร์
    - ปิเปต
    - กระบอกตวง
    - แท่งแก้วคนสาร
    - ลูกยาง
4. เครื่องวัดค่าต่างๆ ได้แก่
    - เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 2 ตำแหน่ง สำหรับชั่งสารเคมี
    - เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง สำหรับชั่งสารเคมี
    - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. Hemocytometer
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำ
7. กล้องบันทึกภาพ
8. กล้องจุลทรรศน์
9. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ปากกา กระดาษfoil กระดาษกรอง น้ำกลั่น นาฬิกาจับเวลา กระจกslide cover slip เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์

CPW salts:

KH_2PO_4	27.2	mg/l
KNO_3	101.0	mg/l
$CaCl_2.7H_2O$	1480.0	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	246.0	mg/l
KI	0.16	mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	mg/l
pH 5.8		

CPW 13 M medium - CPW salts with 13% manitol
CPW 10 M medium - CPW salts with 10% manitol
CPW 20 S medium - CPW salts with 20% sucrose
pH 5.8 in all cases. (Dixon,1985)

2. ส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ จากใบและกลีบดอก

Enzyme A:

Cellulase R-10	2%
Mcerozyme R-10	1%
Manitol	0.5 M (1 M = 182.18 g)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>วิธีการ</u> แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 : การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ลอกส่วน lower epidermis ของใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำไปวางบน Solution CPW + 13 % Manitol แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นใช้ pastaur pipette ดูด Solution เดิมออก แล้วใส่ Enzyme A (ดูส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้) ลงไปแทน เก็บไว้ 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
3. เมื่อครบ 5 ชั่วโมง ดูดสารละลายเอนไซม์มาส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจหาโปรโตพลาสต์

<u>การบันทึกข้อมูลของการทดลองที่ 1</u>

ตรวจสอบลักษณะและนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่พบ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 ถึงชั่งโมงที่ 15 โดย ดูดสารละลายเอนไซม์มาตรวจหาโปรโตพลาสต์ ครั้งละ 4 ตัวอย่าง แล้วนำจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

การทดลองที่ 2 : การทดสอบความเร็วและเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมที่สุดในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ลอกส่วน lower epidermis ของใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำไปวางบน Solution CPW + 13 % Manitol แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นใช้ pastaur pipette ดูด Solution เดิมออก แล้วใส่ Enzyme A (ดูส่วนประกอบสารเคมี ที่ใช้) ลงไปแทน เก็บไว้ 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
3. เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบ แล้วเอียง petridish ทำมุม 15° กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
4. ดูด protoplast suspension ไปใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แบ่งให้ได้ 4 หลอด
5. ทำการ centrifuge ที่ 300 rpm โดย

หลอดที่ 1 centrifuge นาน 3 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

98479

หลอดที่ 2	centrifuge	นาน	4	นาที
หลอดที่ 3	centrifuge	นาน	5	นาที
หลอดที่ 4	centrifuge	นาน	6	นาที

การบันทึกข้อมูลของการทดลองที่ 2

ตรวจสอบลักษณะและนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นของหลอดที่ 1,2,3 และ 4 ตามลำดับ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด ทั้งส่วนที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ 1 สไลด์

การทดลองที่ 3 : การทดสอบหาวิธีที่สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด โดยการแบ่งการทดลองออกเป็น 4 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1

ลอกส่วน lower epidermis ของใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกชั่งให้ได้น้ำหนักสด 1.5 กรัม

วิธีการที่ 2

นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาสับให้ละเอียด ชั่งให้ได้น้ำหนักสด 1.5 กรัม

วิธีการที่ 3

ลอกส่วน lower epidermis ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ชั่งให้ได้น้ำหนักสด 3 กรัม

วิธีการที่ 4

นำกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาสับให้ละเอียด ชั่งให้ได้น้ำหนักสด 3 กรัม

ทุกวิธีการ ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำไปแช่ใน Solution CPW + 13 % Manitol นาน 1 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นใช้ pastaur pipette ดูด Solution เดิมออก แล้วใส่ Enzyme A (ดูส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้) ลงไปแทน ทิ้งไว้นาน 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
3. เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบ แล้วเอียง petri-dish ทำมุม 15° กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
4. ดูด protoplast suspension ไปใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
5. ทำการ centrifuge ที่ 300 rpm นาน 3 นาที
6. ดูดส่วนที่เป็นสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอนไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์
7. ใส่ Solution CPW + 20 % Sucrose ทำ resuspension แล้วนำไปปั่นที่ 300 rpm นาน 3 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านนอกมาใส่ใน Solution CPW + 10 % Manitol แล้วปั่นที่ 300 rpm นาน 3 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

<u>การบันทึกข้อมูลของการทดลองที่ 3</u>

ตรวจสอบลักษณะและนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่พบด้วย Hemocytometer นับจำนวนโปรโตพลาสต์ของแต่ละวิธีการ วิธีการละ 20 ครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้วิธีการทดสอบสมมุติฐาน (Test of Hypothesis) แบบ T-test

<u>เวลาและสถานที่</u>

เวลา เริ่มทำการทดลอง เดือนมกราคม 2541
สิ้นสุดการทดลอง เดือนมีนาคม 2541

สถานที่ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน
ภาควิชาพืชสวนคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 **การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก**

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ยจากการแช่เอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 - ชั่วโมงที่ 15

ระยะเวลา (ชม.)	จำนวนโปรโตพลาสต์ (เซลล์)
5	0.5
6	1.0
7	0.0
8	2.75
9	18.5
10	84.25
11	81.75
12	86.00
13	95.50
14	92.00
15	86.00

จากตารางที่1 จากการสุ่มตัวอย่างและนับจำนวนโปรโตพลาสต์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 5 ถึงชั่วโมงที่ 8 โปรโตพลาสต์ที่พบมีปริมาณน้อย ที่ชั่วโมงที่ 5 สามารถตรวจพบสายของ **middle lamella** แต่เซลล์ส่วนใหญ่ที่ตรวจพบคือเซลล์เดี่ยวๆ ที่ยังมีผนังเซลล์ ชั่วโมงที่ 6 ถึง ชั่วโมงที่ 7 ตรวจไม่พบสายของ **middle lamella** พบแต่เซลล์เดี่ยวๆ ที่ยังมีผนังเซลล์ บางเซลล์ ผนังเซลล์ยังอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ แต่บางเซลล์ผนังเซลล์เริ่มหายไป ชั่วโมงที่ 8 ถึง ชั่วโมงที่ 9 ตรวจไม่พบสายของ **middle lamella** พบแต่เซลล์เดี่ยวๆ ส่วนใหญ่ผนังเซลล์อยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ ในชั่วโมงที่ 9 นั้น สามารถพบโปรโตพลาสต์เพิ่มมากขึ้นแต่ยังตรวจพบเซลล์ที่ยังอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์อยู่บ้าง นั่นแสดงว่า ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 9 พบเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีผนังเซลล์ แสดงว่าการทำงานของ **macerozyme** ยังไม่เสร็จในการทดลองนี้ใช้วิธีขั้นตอนเดียว **(Direct or One-step Method)** โดยการนำเนื้อเยื่อพืชแช่ในสารละลายเอนไซม์ 2 ชนิด อยู่ปนกันคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15295

macerozyme และ cellulase โดย macerozyme จะเป็นตัวย่อยสาย middle lamella และ cellulose จะเป็นตัวย่อยผนังเซลล์ (Barz *et al.*,1977) macerozyme สามารถย่อยสลาย middle lamella ได้ เนื่องจาก middle lamella มี pectin เป็นองค์ประกอบ pectin เป็นสารโพลีเมอร์ซึ่งประกอบด้วย Methyl-D-galacturonate เชื่อมต่อด้วยพันธะ α-1,4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000-36,000 d (Evans *et al.*,1983) และผนังเซลล์มีองค์ประกอบหลักคือ cellulose โดย cellulose เป็นสารโพลีเมอร์ ประกอบด้วย D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000-2,500,000 d โดยน้ำหนักโมเลกุลนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เมื่อ middle lamella ถูกย่อยแล้วจะทำให้เซลล์กลายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้น cellulaseจะทำการย่อยผนังเซลล์จนได้เป็นโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์

ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 เป็นต้นไป ตรวจไม่พบสายของ middle lamella และเซลล์ที่ผนังเซลล์ยังไม่ถูกย่อย โปรโตพลาสต์ที่พบมีลักษณะกลม สีเขียวใสเนื่องจากเม็ดสีคลอโรพลาสต์ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 11 เป็นต้นไปโปรโตพลาสต์เริ่มมีรูปร่างบิดเบี้ยวโดยเห็นชัดในชั่วโมงที่ 13 และเริ่มพบโปรโตพลาสต์ที่แตก นั่นแสดงว่าแรงดันออสโมติกมีผลต่อโปรโตพลาสต์ เราจึงรักษาแรงดันออสโมติกโดยการผสม manitol ลงไปในสารละลายเอนไซม์ โดยทั่วไปความเข้มข้นของ manitol ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.23-0.90 M ซึ่งความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติกจะมีผลเท่าใดย่อมขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการแช่เอนไซม์และแรงดันออสโมติกของพืชด้วย (Evans *et al.*,1983)

ผลการทดลองที่ 2 : การทดสอบความเร็วรอบและเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมที่สุดในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ตารางที่ 2 แสดงผลโปรโตพลาสต์จากการปั่นเหวี่ยงที่เวลา 3,4,5 และ 6 นาที ตามลำดับ

เวลาที่ใช้ (นาที)	เปอร์เซ็นต์โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์
3	78.57%
4	59.77%
5	35.45%
6	13.79%

เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาแช่เอนไซม์ A เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300 rpm โดยใช้เวลาต่างๆ กัน พบว่า การปั่นเหวี่ยงที่ 3 นาทีได้โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์มากที่สุด ประมาณ 80 เปอร์เซนต์ พบโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

ที่แตกบ้างซึ่งอาจเป็นเพราะโปรโตพลาสต์แตกเนื่องจากแรงดันออสโมติกขณะที่แช่อยู่ในสารละลายเอนไซม์ เมื่อเพิ่มเวลาการปั่นเหวี่ยงมากขึ้น โปรโตพลาสต์จะแตกมากขึ้น พบออร์แกเนลล์ลอยอยู่มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับประสาทพร(2528) ที่กล่าวว่า การแยกโปรโตพลาสต์โดยวิธีอาศัยการเขย่า ถ้าปรับจำนวนรอบของการเขย่าสูงเกินไป ก็จะทำให้โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก ถ้าปรับให้ช้าเกินไป จะเสียเวลานานในการแยก

ผลการทดลองที่ 3: การทดสอบหาวิธีที่สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด โดยการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 วิธีการ

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการลอกใบชั้น lower epidermis และ การสับใบ

วิธีการ	ใบ		ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
ลอก	562,800	289,400	426,100
สับ	2,100	900	1,500
ค่าเฉลี่ย	282,450	145,150	213,800
T-test	**	**	

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.01$

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการลอกกลีบดอกชั้น lower epidermis และการสับกลีบดอก

วิธีการ	กลีบดอก		ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
ลอก	11,800	52,400	32,100
สับ	1,100	500	800
ค่าเฉลี่ย	5,450	26,450	16,450
T-test	**	**	

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.01$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 3 ผลการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 วิธีการลอกชั้น lower epidermis ของใบ ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 562,800 และ 289,400โปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ และจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการสับใบคือ 2,100 และ 900โปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการลอกใบมากกว่าจำนวนโปรโตพลาสต์จากการสับใบ และข้อมูลจากตารางที่ 4 จากการลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอกทั้ง 2 ครั้ง ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ 11,800 และ 52,400 โปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร และจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการสับใบ คือ 1,100 และ 500 โปรโตพลาสต์ต่อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอก ให้ผลดีกว่าการสับกลีบดอกเช่นกัน

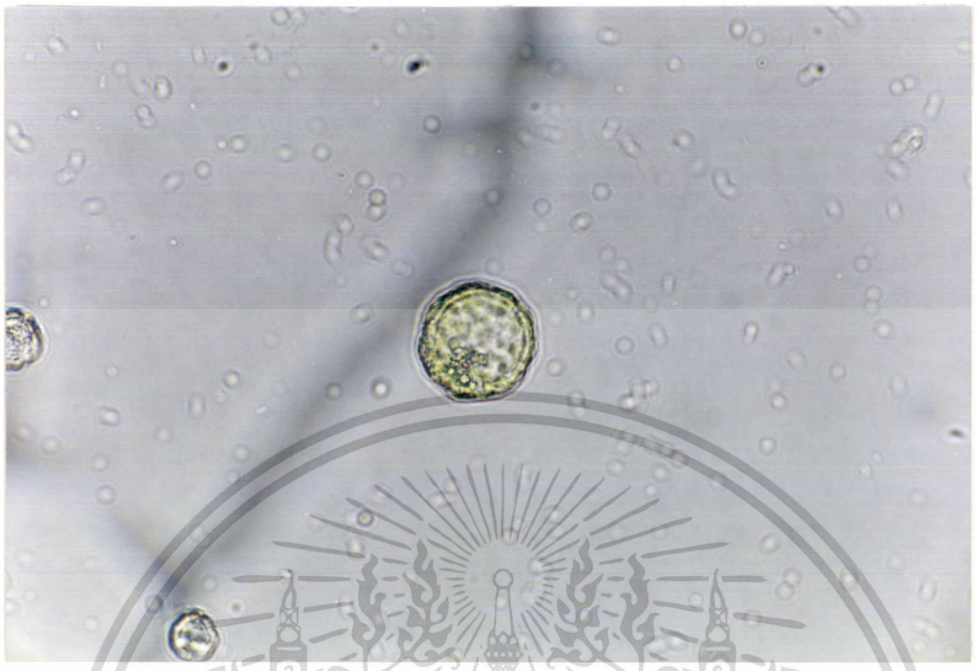
จากตารางที่ 3 และตารางที่ 4 เมื่อนำใบและกลีบดอก มาเปรียบเทียบกันพบว่า ปริมาณโปรโตพลาสต์รวมเฉลี่ยของวิธีการลอกชั้น lower epidermis ของใบและการสับใบ คือ 213,800 โปรโตพลาสต์ ต่อ 1 มิลลิลิตร และปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยของวิธีการลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอก และการสับกลีบดอก คือ 16,450 โปรโตพลาสต์ ต่อ 1 มิลลิลิตร นั่นแสดงว่า การใช้ใบเป็นแหล่งท่อนพันธุ์ เพื่อใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์มากกว่าการใช้กลีบดอก ซึ่งสอดคล้องกับประภา (2539) ที่กล่าวว่า เนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ได้ เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบ ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และผล แต่เนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบและเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยง (culture cell suspension)เป็นเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่นิยมใช้ในการสกัด โปรโตพลาสต์ เนื่องจากทั้งสองแหล่งให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูง และเป็นแหล่งที่ใช้สกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด

จากการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกของจารีย์(2519) และวาสนา(2527) ได้รายงานว่า โครงสร้างของใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ประกอบด้วยชั้น 1) upper epidermis 2) lower epidermis และ 3) mesophyll ในชั้น mesophyll จะประกอบด้วย palisade parenchyma เป็นเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงตัวกันแน่น ประมาณ 1-2 ชั้น เซลล์ภายในมี chloroplast มาก ถัดลงไปเป็น spongy parenchyma ประกอบด้วยเซลล์ขนาดไม่เท่ากัน รูปร่างค่อนข้างกลม ภายในมี chloroplast น้อย เรียงตัวเป็นแถวในบริเวณที่อยู่ใกล้ palisade parenchyma เมื่ออยู่ห่างออกไปจะอยู่หลวมๆ ทำให้เกิดช่องว่างอากาศขนาดใหญ่มาก และมีเป็นจำนวนมากเรียงเป็นแถวเดียวติดๆกัน ซึ่งมักจะเกิดจาก spongy parenchyma ที่เรียงตัวเป็นแถวเดียวจากด้านบนมาหาส่วนมี่อยู่ทางด้านล่าง ในชั้นนี้จะมี sclereid และ vascular bundle ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป โปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบมีสีเขียวใสเนื่องจากเม็ดสีคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 1 และ 2) โปรโตพลาสต์ที่ได้จากกลีบดอกมีสีใสเนื่องจากกลีบดอกมีสีขาว (ภาพที่ 3 และ 4) การที่โปรโตพลาสต์จะมีสีเช่นไรขึ้นอยู่กับท่อนพันธุ์ที่นำมาใช้และโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบมีปริมาณมากกว่าโปรโตพลาสต์ที่ได้จากดอกเนื่องจากในเซลล์ของใบมีปริมาณของ mesophyll cell มากกว่า เซลล์กลีบดอก (Esau,1964) ซึ่งสอดคล้องกับภูวดล

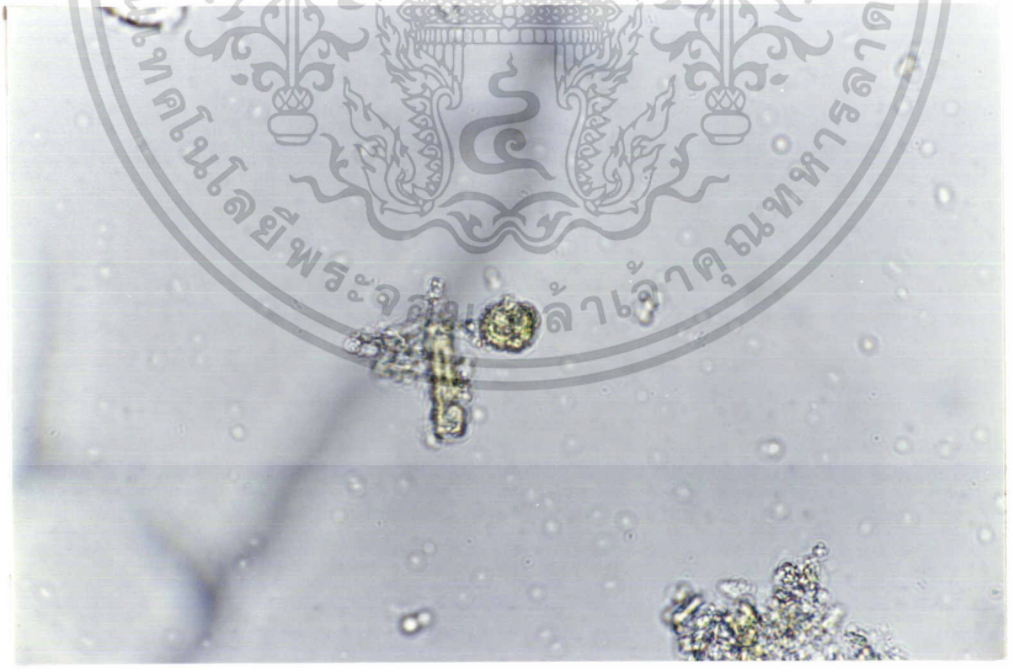
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2538) ที่กล่าวว่า ในกลีบดอกโครงสร้างของกลีบดอกจะคล้ายกับโครงสร้างของใบเพียงแต่ไม่มีชั้น palisade parenchyma ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ parenchyma ผนังบาง มีรงควัตถุเข้าไปอยู่ใน vacuole เช่น พวก flavonoid ทำให้กลีบดอกมีสีสันสวยงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

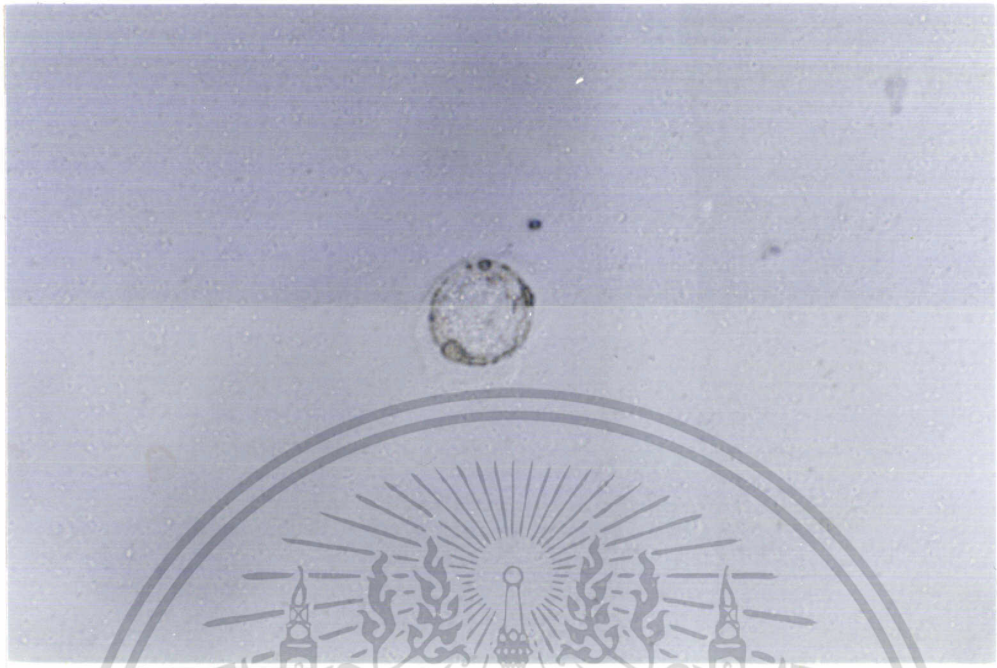


ภาพที่ 1 โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ที่ได้จากการลอกใบชั้น lower epidermis (400x)

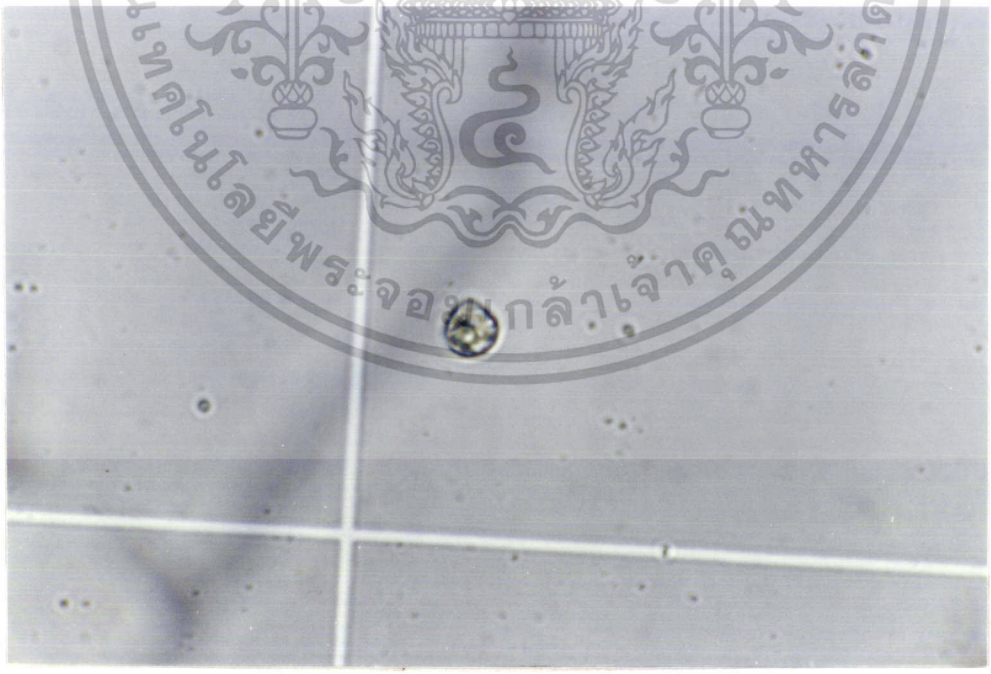


ภาพที่ 2 โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ที่ได้จากการสับใบ (400x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ที่ได้จากการลอกกลีบดอกชั้น lower epidermis (400x)



ภาพที่ 4 โปรโตพลาสต์จากบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ที่ได้จากการสับกลีบดอก (400x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

1. ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการแช่เอนไซม์เพื่อสกัดโปรโตพลาสต์คือ 10 ชั่วโมง
2. ความเร็วรอบที่ 300 rpm เวลา 3 นาที เป็นความเร็วรอบที่ดีที่สุด และเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการปั่นเหวี่ยง
3. โปรโตพลาสต์ที่ได้จากการลอกใบชั้น lower epidermis ออก จะได้ปริมาณ โปรโตพลาสต์ที่มากที่สุด
4. โปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบจะมีสีเขียวเนื่องจากในใบมีคลอโรฟิลล์ ทำให้เราเห็นโปรโตพลาสต์เป็นสีเขียว
5. โปรโตพลาสต์ที่ได้จากดอกมีสีใสเนื่องจากกลีบดอกมีสีขาว ทำให้มองเห็นโปรโตพลาสต์มีสีใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์ สำนักงานพาณิชย์จังหวัดชลบุรี. 2538. เอกสารเผยแพร่เรื่อง ไม้ดอกไม้ประดับตามโครงการพัฒนาตลาด เพื่อสนับสนุนการกระจายการผลิตในระดับจังหวัด จังหวัดปีงบประมาณ 2538,ชลบุรี.32 น.

กสิน สุวตะพันธ์.2500 บัวนานาพันธุ์. พฤกษชาติ 1(1) : 40-47

จารีย์ หอยทอง.2519. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

ประภา ศรีพิจิตต์.2539.การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์,น. 6-9. ใน เนาวรัตน์ ปานแย้ม.เอกสารประกอบการเรียนการสอนเรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์.ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี.2538.เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ .219 น.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2528.โปรโตพลาสต์ เทคนิคและการประยุกต์ใช้. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.124 น.

พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง,วันชัย ดีเอกนามกุล และ สัณห์ พณิชยกุล.2538. การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) . วารสาร เกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์) . 29:8-15.

ภูวดล บุตรรัตน์.2538.โครงสร้างภายในของพืช.ไทยวัฒนาพานิช,กรุงเทพฯ.57 น.

รงรอง วิเศษสุวรรณ.2540.การชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 36, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ร่วมกับ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ทบวงมหาวิทยาลัย,กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 249 น.

วาสนา มิตรานนท์.2527. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสกุลบัวหลวง (*Nelumbo adans.)* ในประเทศไทย.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วินิจวนันดร,พระยา.2498.ไม้ประดับบางชนิดของไทย.โรงพิมพ์รุ่งเรืองธรรม,กรุงเทพฯ.81น.

ศาลักษณ์ พรรณศิริ.2539.เทคนิคการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์พืช. น. 35. ใน เนาวรัตน์ปานแย้ม.เอกสารประกอบการเรียนการสอนเรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

สายชล เกตุษา.2531.เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้.บริษัทสารมวลชน,กรุงเทพฯ. 233 น.

สุชาดา ศรีเพ็ญ.2530.พรรณไม้น้ำ.ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ. 233 น.

สุเม อรัญนารถ.2537.ปทุมชาติ บัวตัดดอกที่อนาคตยังสดใส.ชัยพฤกษ์ศาสตร์ 291:30-32.

อำไพ ยงบุญเกิด.2513.บัว.กสิกร.49(1):3-8.

Backer, C.A. and R.C. Bakhuizen Van den Brink.1963.Flora of Java. Etherland. (Groningen) : N.V.P. Noordhoff.

Barz, W.,E. Reinhard and M.H. Zenk.1977.Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application.New York: Springer.419p.

Bhadra, K.S.,N. Hammatt,J.B. Power,and M.R. Davey.1994.A Reproducible Procedure for Plant Regeneration from Seedling Hypocotyl Protoplast of *Vigna Sublobata* L.Plant Cell Reports.14:175-179.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Burkill, I. H. 1966.A Dictionary of The Economic Products of the Maley Peninsula. Vol. 11. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Kuala Lumpur.

Core, L.E..1955. Plant Taxonomy. Eglewood Cliffs, Prentice-Hall,Inc. New Jersey.459 p.

Corell, D.S. and H.B. Corell. 1975. Aquatic and Wetland Plants of Southwestern United States. Standford. 1,777 p.

Dixon, A.R.. 1985.Plant Cell Culture a Practocal Approach.Oxford Washington DC.236p.

Esau, K..1964.Plant Anatomy.2 th ed.University of Califonia.177p.

Evans, A.D.,W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada.1983.Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1. New York, United States of America.970p.

Franceschi R.V.,S.B. Maurice and V.A. Wittenbach.1984.Isolation of Mesophyll and Paravenial Mesophyll Protoplasts from Soybean Leaves.Plant Science Letters,36:181-186.

Gilbert, S. 1982. The culture of water lilies and water lotuses. Horticulture.August:16-23.

Harris,W.H. and J.S. Levey.1975.The new Columbia Encyclopedia.4 th ed.New York:Columbia University Press.

Hutchinson,J.1959.The Family of Flowering Plants. The Clarendohn Press, Oxford.510p.

Lawrence, H.M.1967.Nymphaeaceae Taxonomy of Vascular Plants. Oxford & IBH. Publishing Company,Calcutta.823p.

Moreno V.,L. Zubeldiu and L.A. Roig.1984.A Method for Obtaining Callus Cultures from Mesophyll Protoplasts of Melon (*Cucumis melo* L.).Plant Science Letters,34:195-201.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paltin, E.R.,S. Izhar,D. S. Zberg and Y. Tabib.1984.Growth Hormones As a Selection Tool F0or Somatic Hybridization In Petunia.Plant Science Letters,35:231-235.

Razdon,K.M. and SS. Bhojwani.1983.Plant Tissue Culture Theory and Practice.Elsevier Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.502p.

Sando,S. and N. Goto.1994.A novel method for regeneration plants from mesophyll protoplast of *Arabidopsis Thaliana* Line WS.Plant Cell Reports.14:75-80.

Shepard,F.J. and R. E. Totten.1975.Isolation and Regeneration of Tobacco Mesophyll Cell Protoplasts under low Osmotic Conditions. Plant Physiol.55:689-694.

Shepard,F.J. and R. E. Totten.1977.Mesophyll Cell Protoplasts of Potato. Plant Phisiol.60:313-316.

Suvatabandhu, K. 1958.On the Nymphaeaceae of Thailand. Nat. Hist. Bull. Siam. Soc. 17:11-15.

Wang Y.,M.R. Huang ,Z.M. Wei,Y.R. Sun,D.M. Chem,Z.H. Xu,L.M. Zhang,and N. Xu. 1995.Regenation of Simon poplar (*Populus simonii*) from Protoplasts culture.Plant Cell Report.14:442-445.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่1

วิเคราะห์ทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 1 จากการลอกชั้น lower epidermis ของใบ และการสับใบ

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	ลอกใบ	*สับใบ*
Mean	562800	2100
Variance	2.2549E+10	4831578.95
Observations	20	20
Hypothesized Mean Difference	0	
df	19	
t Stat	16.6969564	
P(T<=t) one-tail	4.1188E-13	
t Critical one-tail	1.72913133	
P(T<=t) two-tail	8.2377E-13	
t Critical two-tail	2.0930247	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2

วิเคราะห์ทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 2 จากการลอกชั้น lower epidermis ของใบ และการสับใบ

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	ลอกใบ	*สับใบ*
Mean	289400	900
Variance	2.832E+09	1042105.26
Observations	20	20
Hypothesized Mean Difference	0	
df	19	
t Stat	24.241715	
P(T<=t) one-tail	4.702E-16	
t Critical one-tail	1.7291313	
P(T<=t) two-tail	9.403E-16	
t Critical two-tail	2.0930247	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3

วิเคราะห์ผลทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 1 จากการลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอก และการสับกลีบดอก

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	ลอกกลีบดอก	*สับกลีบดอก*
Mean	11800	1100
Variance	69852632	3568421.05
Observations	20	20
Hypothesized Mean Difference	0	
df	21	
t Stat	5.5845537	
P(T<=t) one-tail	7.644E-06	
t Critical one-tail	1.7207435	
P(T<=t) two-tail	1.529E-05	
t Critical two-tail	2.0796142	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4

วิเคราะห์ทางสถิติผลการทดลองครั้งที่ 2 จากการลอกชั้น lower epidermis ของกลีบดอก และการสับกลีบดอก

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	ลอกกลีบดอก	*สับกลีบดอก*
Mean	52400	500
Variance	734147368	789473.684
Observations	20	20
Hypothesized Mean Difference	0	
df	19	
t Stat	8.5616476	
P(T<=t) one-tail	3.015E-08	
t Critical one-tail	1.7291313	
P(T<=t) two-tail	6.03E-08	
t Critical two-tail	2.0930247	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้