สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

PROTOPLAST CULTURE OF LOTUS

(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CV. BUNTHARIK

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี

SUMET TREESAKSREE

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49409
วัน, เดือน, ปี 20 ก.พ. 2547
.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชสวน

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-924-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PROTOPLAST CULTURE OF LOTUS

(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CV. BUNTHARIK

SUMET TREESAKSREE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN HORTICULTURE

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2003

ISBN 974-324-924-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	**การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก**
นักศึกษา	**นาย สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี**
รหัสประจำตัว	42066212
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	**พืชสวน**
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	**ผศ.ดร. สุเม อรัญนารถ**

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวง โดยนำใบในสภาพปลอดเชื้อมาทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้โดยทำการสับใบแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka R-10 2 % (w/v) , macerozyme onozuka R-10 1 % (w/v) และ 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid 5 mM ละลายในสารละลาย CPW ที่เติม mannitol 0.5 โมลาร์ ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 33 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และการทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานและความหนาแน่นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่างๆกัน เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ KM8P(B) และใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ $2.5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแตกสลายน้อยที่สุดและพบโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น และการทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ กัน 4 แบบ คือ 2,4-D ร่วมกับ BA , 2,4-D ร่วมกับ TDZ , NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ TDZ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โดยเกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น 4 แบบ คือแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน , แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ , แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว, แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรจะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์แบบต่างๆมากที่สุดคือ 18.29 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Protoplast Culture of Lotus(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)cv.Buntharik
Student	Sumet Treesaksree
Student ID.	42066212
Degree	Master of Science
Programme	Horticulture
Year	2003
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Sumay Arunyanart

ABSTRACT

Protoplast culture of Lotus was conducted in 3 experiments. In first experiment, preliminary factors on protoplast isolation were studied. The best method for protoplast isolation was the incubation of thin strips of young leaves in enzyme solution containing 2 % (w/v) cellulase onozuka R-10 , 1 % (w/v) macerozyme onozuka R-10 and 5 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid in CPW with 0.5 M mannitol at pH 5.4 for 6 hours and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes,$33x10^4$ protoplasts per gram fresh weight were achieved. In second experiment, the basic medium and protoplast density were studied. It was found that the lowest number of blasted and brown protoplasts and protoplast division were obtained on KM8p (B) medium and the density was $2.5x10^4$ protoplasts per ml. In third experiment, the suitable plant growth regulators for protoplast culture were observed by using four different combinations of following auxin and cytokinin : 2,4-D and BA , 2,4-D and TDZ , NAA and BA , NAA and TDZ. The first division of protoplast was occurred within 1 day of incubation. There were 4 different types of division (equal division, budding division with multiple cells, budding division with single cell and changed form division) after 2 weeks of incubation. The highest percentages of cell division was 18.29 which obtained from mesophyll protoplasts cultured on KM8p medium containing 2 mg/l NAA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุเม อรัญนารถ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทดลองจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ และน้องๆ ที่เป็นกำลังใจในการทำการทดลองตลอดมา พร้อมทั้งขอขอบคุณ ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การศึกษาและสถานที่ปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนปัจจัยต่างๆในการเรียนตลอดมา

งานวิจัยนี้ ส่วนหนึ่งได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณ ของโครงการวิจัยย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... VI

สารบัญภาพ..... VII

สารบัญตารางภาคผนวก..... VIII

คำย่อและสัญญาลักษณ์..... XII

บทที่1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 2

1.3 ขอบเขตการศึกษา..... 2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา..... 2

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก..... 4

2.2 การแยกโปรโตพลาสต์..... 6

2.3 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์..... 9

2.4 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์..... 11

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 14

บทที่3 วิธีการดำเนินงาน..... 20

3.1 อุปกรณ์..... 20

3.2 วิธีการ..... 22

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง..... 33

3.4 สถานที่ทำการทดลอง..... 33

3.5 ระยะเวลาในการทำการทดลอง..... 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่4 ผลการทดลอง..... 35

4.1 ผลการทดลอง..... 35

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 78

บทที่5 สรุปผลการทดลอง..... 83

บรรณานุกรม..... 84

ภาคผนวก..... 90

ภาคผนวก ก..... 91

ภาคผนวก ข..... 93

ประวัติผู้เขียน..... 106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงผลของเวลาที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสตจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	36
4.2	แสดงผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	37
4.3	แสดงผลของ ระดับ osmoticum ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	39
4.4	แสดงผลของความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเกิดโปรโตพลาสสต์สีน้ำตาล	45
4.5	แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA	55
4.6	แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี 2,4-D ร่วมกับ TDZ	63
4.7	แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี NAA ร่วมกับ BA	69
4.8	แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี NAA และ TDZ	75
ก.1	องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์	91
ข.1	การวิเคราะห์ทางสถิติผลของเวลาที่ใช้ในการแยกที่มีต่อจำนวนโปรพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	93
ข.2	การวิเคราะห์ทางสถิติผลของเวลาที่ใช้ในการแยกที่มีต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพ.ปลอดเชื้อ	93
ข.3	การวิเคราะห์ทางสถิติผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการแยกที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	94
ข.4	การวิเคราะห์ทางสถิติผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการแยกที่มีต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	94
ข.5	การวิเคราะห์ทางสถิติผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.6	การวิเคราะห์ทางสถิติผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ที่มีต่อที่มีต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ.....	95
ข.7	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโต-พลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	96
ข.8	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จาก ใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BAแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	96
ข.9	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	97
ข.10	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BAแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	97
ข.11	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	98
ข.12	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	98
ข.13	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ$\sqrt{(X+1)}$.....	99
ข.14	การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$.....	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 100

ข.16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 100

ข.17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโต-พลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BAแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 101

ข.18 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BAแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 101

ข.19 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BAแปลงข้อมูลแบบ$\sqrt{(X+1)}$..... 102

ข.20 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ$\sqrt{(X+1)}$..... 102

ข.21 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จาก ใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 103

ข.22 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโต-พลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ$\sqrt{(X+1)}$..... 103

ข.23 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.24 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 104

ข.25 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 105

ข.26 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$..... 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	แสดงลักษณะใบที่ใช้ในการทดลองและการทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์.....	34
4.1	แสดงการทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ที่ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงระดับต่างๆ.....	38
4.2	แสดงลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	41
4.3	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน.....	42
4.4	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P (A) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	43
4.5	แสดงลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นระดับต่างๆ.....	48
4.6	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารKM8P (A)..	49
4.7	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารKM8P (B).	50
4.8	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์แบบต่างๆ.....	57
4.9	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์แบบต่างๆ.....	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

CPW	cell and protoplast wash solution
g	gravitation force
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
PVP-10	polyvinylpyrrolidone(MW 10,000)
rpm	revolutions per minute

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)cv.Buntharik เป็นพืชน้ำอายุหลายปีที่อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530) มีถิ่นกำเนิดในแถบ เอเชียเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน แถบทะเลสาบเขตร้อน จนถึง ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม อรัญนารถ. 2537) จีน ไทย (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) ทิเบต (Core. 1955)ลักษณะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) คล้ายบัวพันธุ์ปทุมสีขาวประกอบด้วยกลีบดอกชั้นนอกสีขาวอมเขียวปลายกลีบดอกสีชมพูเรื่อๆ(สุเม อรัญนารถ. 2537)นิยมใช้บูชาพระและประกอบพิธีกรรมทางศาสนาเป็นไม้ดอกที่คนไทยใช้กันทุกครัวเรือนในปัจจุบันในบางพื้นที่นิยมปลูกบัวหลวงแทนนาข้าวเพราะสามารถให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า (กวินหาญ ผลหาญ. 2534) เกษตรกรจำนวนมากในหลายจังหวัดยึดการปลูกบัวเป็นอาชีพหลักเพราะเป็นพืชที่ใช้เงินลงทุนต่ำ โดยต้นทุนในการทำนาบัวเก็บเมล็ดราคาประมาณไร่ละ 1,600 บาท ให้ผลตอบแทน ไร่ละ 15,760 บาท (เพ็ญศิริ ดุษฎีเมธา. 2546) บัวหลวงนอกจากจะใช้ประโยชน์เป็นไม้ตัดดอกแล้วส่วนอื่นของบัวหลวงยังนำไปใช้ประโยชน์หรือนำไปจำหน่ายได้ เช่น เกสรตัวผู้ กลีบดอก ฝักบัว เมล็ดบัว เปลือกเมล็ดบัว รากบัวหรือไหล ใบบัว(กวินหาญ ผลหาญ. 2534)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าบัวจะมีประโยชน์ในหลายๆด้านแต่ยังมีปัญหาบางประการ เช่น ดอกมีอายุการใช้งานที่สั้นประมาณ 2-3 วัน กลีบดอกจะเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล เกตุษา. 2531) รูปทรงของดอกและสีมีให้เลือกจำกัด (จารีย์ หอยทอง. 2519) ผลผลิตต่อไร่ต่ำควรคัดเลือกพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ โดยเฉพาะจากบัวพันธุ์พื้นเมือง (เพ็ญศิริ ดุษฎีเมธา. 2546)

จากสภาพปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาพันธุ์บัวหลวงให้มีคุณภาพด้านสีสรร รูปทรงดอก และ ปรับปรุงพันธุ์ให้มีความหลากหลาย เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงลักษณะคุณภาพของผลผลิต (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540) เนื่องจากโปรโตพลาสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน โดยเฉพาะด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยสามารถใช้โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนี้ (คำนูญ กาญจนภูมิ. 2524)

1. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการคัดเลือกจากการแปรผันที่เกิดขึ้น
2. การสร้างสายพันธุ์ใหม่โดยการรวมโปรโตพลาสต์
3. การสร้างสายพันธุ์ใหม่โดยการใส่ยีนเข้าไปในโปรโตพลาสต์
4. คัดเลือกพันธุ์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวของโปรโตพลาสต์จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์เพื่อสามารถนำโปรโตพลาสต์มาใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

1.2.2 เพื่อศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อโดยแยกโปรโตพลาสต์ ภายใต้ปัจจัยต่างๆ คือ ระยะเวลา , ความเร็วของการปั่นเหวี่ยง และ ระดับความเข้มข้นของ osmoticum ที่ใช้ในการแยก

1.3.2 ศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่เหมาะสมต่อ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดย นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ สูตรอาหารพื้นฐานที่ต่างกัน และ ระดับความความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน

1.3.3 เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 แบบ คือ 2,4-D ร่วมกับ BA , 2,4-D ร่วมกับ TDZ , NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 ตรวจเอกสาร

1.4.2 เตรียมอุปกรณ์

1.4.3 ทำการทดลอง

1.4.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

1.4.5 จัดทำรูปเล่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

1.5.2 ทราบสูตรอาหารพื้นฐานและระดับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมการเกิดแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.5.3 ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

บัวหลวงเป็นพืชน้ำอายุหลายปี (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) Nymphaeaceae (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530; Correll and Correll. 1975) พืชวงศ์นี้มีทั้งหมด 8 สกุล (Genus) 50 ชนิด (Species) (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530 ;Gilbert. 1982) พบในประเทศไทย 4 สกุล คือ Nelumbo , Nymphaea , Victoria , Barclaya (กสิน สุวตะพันธ์. 2500)

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในสกุล Nelumbo Adans. (Backer and Bakhuizen. 1963) พืชในสกุลนี้โดยทั่วไปมี 2 ชนิดคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. และ *Nelumbo lutea* Pers. (Core. 1955 ;Burkill. 1966) แต่ที่พบในประเทศมีเพียงชนิดเดียว คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530)

Nelumbo nucifera Gaertn. หรือ *Nelumbo speciosum* Willd. หรือ *Nelumbo indica* Pers. หรือ *Nelumbium nelumbo* (L) Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred Lotus , East Indian Lotus , Egyptian Lotus (สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520) มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนแถบทะเลสาบเขตร้อนจนถึง ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม อรัญนารถ. 2537) จีน ไทย (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) ทิเบต (Core. 1955) และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย (Gilbert. 1982) สามารถเจริญได้ดีในน้ำจืดที่มีสภาพเป็นน้ำนิ่งแต่มีการไหลถ่ายเทได้และมีความลึก 72.5-106.5 เซนติเมตร pH ของน้ำ 7.45 (จารีย์ หอยทอง. 2519) บัวหลวงสามารถจำแนกออกเป็น 8 สายพันธุ์ โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของวิชาพฤกษอนุกรมวิธาน และ พันธุศาสตร์ ดังนี้ (สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520)

พันธุ์ที่ 1 มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู ปทุม ประทุม ปทุมวาลย์ โกกระณต โกกนุท บัวแหลมแดง บัวหลวงแดง หรือ ปัทมา ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว ดอกรา กลีบสีชมพู

พันธุ์ที่ 2 มีชื่อว่า บุณฑริก บัวหลวงขาว บัวแหลมขาว ดอกมีขนาดใหญ่ ลักษณะใบ และรูปทรงของดอกเหมือน บัวปทุม แต่กลีบสีขาว

พันธุ์ที่ 3 มีชื่อว่า สัตตบงกช สัตบงกฎ บัวหลวงชมพูพุดซ้อน บัวหลวงป้อมแดง บัวฉัตรแดง หรือ บัวฉัตรชมพู ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อมเวลาดอกบาน จะเห็นกลีบเล็กๆ สีขาวปนชมพูซ้อนอยู่ข้างในใกล้ฝัก กลีบสีชมพู

พันธุ์ที่ 4 มีชื่อว่า สัตตบุษย์ บัวหลวงขาวซ้อน บัวฉัตรขาว หรือ บัวป้อมขาว ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อมเช่นเดียวกับ สัตตบงกช กลีบดอกสีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ที่ 5 มีชื่อว่าบัวเข็มสีชมพู ดอกขนาดกลาง ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีชมพู

พันธุ์ที่ 6 มีชื่อว่าบัวเข็มสีขาว ดอกขนาดกลาง ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีขาว

พันธุ์ที่ 7 มีชื่อว่าบัวหลวงจีน บัวหลวงชมพู บัวปักกิ่งชมพู ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีชมพู กลีบน้อย บาน และ โรยเร็ว

พันธุ์ที่ 8 มีชื่อว่าบัวปักกิ่งขาว บัวได้หวัน หรือ บัวหลวงจีนขาว ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมรูปไข่ ดอกสีขาว กลีบน้อย บาน และ โรยเร็ว

ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงพันธ์บุณฑริก(เสริมลาภ วสุวัต. 2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Nelumbo nucifera* Gaertn.
ชื่อสามัญ	HINDU LOTUS
ชื่อวงศ์	NYMPHEAECEAE
ชื่อทั่วไป	บุณฑริก , ปุณฑริก , บัวหลวงขาว , บัวแหลมขาว

ลักษณะทั่วไป(วาสนา มิตรานนท์. 2527)

ลำต้น อยู่ใต้ดินใต้น้ำเรียกว่าเหง้าในลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น อยู่ในดินลึกประมาณ 5-150 เซนติเมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาวหรือค่อนข้างแดง มีจุดแดงประปราย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ปล้องรูปทรงกระบอกยาว 3-45 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25-3.60 เซนติเมตร ตรงข้อมีตาที่ให้กำเนิดใบและดอก ส่วนล่างมีราก

ราก เป็นแบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้นรากอ่อนมีสีขาวและหมวกรากใหญ่ เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อตั้งตรงชูขึ้นมาเหนือน้ำ โดยจะอยู่ที่ผิวน้ำและชูใบเหนือน้ำหลายระดับ ใบมีรูปร่างเกือบกลม (suborbicular) (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530) มีส่วนที่เว้าเข้ามาตรงข้ามกันที่ขอบใบ 2 ตำแหน่ง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อยผิวใบด้านบนสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ palmately netted venation ก้านใบแข็งมีหนามสั้น ๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายและจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านใบ โดยทั่วไปก้านใบมีสีเขียวแต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำจะมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาวเมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น ก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่างของใบ

ดอก เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่สีขาวงอกขึ้นมาอยู่เหนือน้ำดอกมีขนาดใหญ่ขณะที่ดอกตูมจะมีลักษณะเป็นรูปไข่ปลายเรียว เมื่อบานมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13-18.5 เซนติเมตร กลีบดอกมี 4-5 กลีบเรียงตัวเป็น 2 ชั้น สับหว่างกัน ด้านนอกของกลีบมีสีขาวปนเขียว ส่วนด้านล่างมีสีจางลง เส้นบนกลีบมีขนาดใกล้เคียงกันและมีจำนวนมากแต่ไม่นูนเด่นชัด กลีบนอกมีรูปร่างโค้งป่องตรงกลาง กลีบในมี 12-14 กลีบ เรียงตัวเป็นชั้นประมาณ 8 ชั้น โดยรอบของฐานรองดอก กลีบชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง ด้านนอกของกลีบจะมีสีเหลืองปนเขียว ด้านในมีสีอ่อนกว่าเห็นเส้นบนกลีบสีขาว และมีขนาดใกล้เคียงกันเป็นจำนวนมาก ชั้นที่อยู่ตรงกลางจะมีขนาดใหญ่ที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรูปร่างไข่แต่มีส่วนกว้างอยู่ตอนบน (obovate) เห็นเส้นบนกลีบในชัดเจนประมาณ 5 เส้น มีสีขาวนวลโดยตลอด ทั้งด้านนอก และ ด้านใน ยกเว้นส่วนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีเหลือง เกสรตัวผู้มี 90-117 อัน อยู่เหนือกลีบชั้นใน ก้านเกสรตัวผู้เรียวเล็ก มีสีเหลืองนวลตอนบนมีอับเรณูสีเหลืองสดติดตามความยาวของแกน เหนืออับเรณูขึ้นไปมีส่วนปลายสีขาวขุ่น รูปร่างเรียวเล็กที่ฐาน และ ใหญ่ที่ส่วนปลาย ความยาวของส่วนปลาย 0.25-0.30 เซนติเมตร เกสรตัวผู้มีกลิ่นหอม เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่สูงกว่าเกสรตัวผู้มีสีเหลืองนวล มีผนังหนาฝังอยู่ส่วนบนของฐานรองดอกมีลักษณะรูปกรวย และมีสีเหลือง ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น ยอดเกสรตัวเมียกลมแบนสีเหลืองเป็นมันแข็ง ในดอกหนึ่งจะมี carpel 15-30 อัน และ อยู่กระจายไม่ติดกันภายในแต่ละรังไข่จะมีไข่อยู่ 1 อัน(จารีย์ หอยทอง. 2519) ก้านดอกแข็งเหมือนก้านใบ คือ ก้านดอกแข็งมีหนามสั้น ๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปราย และจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านดอก โดยทั่วไปก้านดอกมีสีขาว แต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาว เมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้น (วาสนา มิตรานนท์. 2527)

กลีบเลี้ยง ลักษณะเป็นรูปไข่รี เหี่ยว และ ร่วงง่าย แต่บางครั้งก็อยู่จนติดเป็นผล กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกันมากแยกจากกันได้ยาก กลีบเลี้ยงจะมีสีขาวอมเขียว

ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) มักเรียกกันว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อยๆ เมื่ออ่อนเปลือกหนาสีเขียว ด้านในสีขาวพอแก่เปลี่ยนเป็นสีดำ และ แข็ง ผลอ่อนแต่ละผลเป็นแบบ nut มักเรียกกันว่า เมล็ดบัว

เมล็ด มีเปลือกหุ้มบางสีขาวอ่อนนุ่มภายในมีใบเลี้ยงหนามีสีขาวนวล 2 ใบไม่มี endosperm (exalbuminous seed) ต้นอ่อนมีสีเขียวเข้มมักเรียกกันว่า ดีบัว

2.2 การแยกโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ (protoplast) หมายถึง เซลล์ของพืชที่แยกออกมาเดี่ยวๆ และ ย่อยเอาผนังเซลล์ (cell wall) ออก (ประสาทพร สมิตามาน. 2540) ซึ่งโครงสร้างผนังเซลล์จะประกอบไปด้วยสารพวกเซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) เซลล์พืชแต่ละเซลล์ที่อยู่ติดกันจะเชื่อมด้วย มิดเดิล ลาเมลลา (middle lamella) ซึ่งประกอบด้วยสารพวก เปคติน (pectin) (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538 ; รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540)

คำว่าโปรโตพลาสต์ถูกนำมาใช้โดย Hanstein ในปี ค.ศ. 1880 เพื่ออธิบายถึงสารที่มีชีวิตที่อยู่ในผนังของเซลล์พืช โปรโตพลาสต์ที่ถูกแยกนั้นไม่ใช่ลักษณะปกติของพืช เพราะว่าเยื่อหุ้มเซลล์ที่กั้นระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับสารมีชีวิตภายในนั้นสามารถแตกได้ง่าย ดังนั้น ความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์จึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการรักษาระดับความดันออสโมซีสของโปรโตพลาสต์ (Fowke and Constabel. 1989)

การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เริ่มมาตั้งแต่สมัย Klercher ในปี ค.ศ.1882 ซึ่งแยกโปรโตพลาสต์ออกมาโดยวิธีกล โดยการใช้ใบมีดโกนตัดเซลล์(ประสาทพร สมิตามาน. 2540)ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันโปรโตพลาสต์สามารถแยกออกมาได้เป็นจำนวนมากโดยการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ซึ่งถูกพัฒนาวิธีการโดย Cocking ในปี ค.ศ. 1960 (Fowke and Constabel. 1985) ซึ่งเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์นี้ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สัมผัสกับสารละลายภายนอกโดยตรงจึงสามารถศึกษาการดูดสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เข้าเซลล์และการขนส่งได้เป็นอย่างดี (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.2.1 ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์

เนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ได้ เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร ผล แคลลัส และ เซลล์แขวนลอยแต่เนื้อเยื่อชั้นมีโซฟีลล์ (mesophyll) ของใบ และ เซลล์แขวนลอยเป็นแหล่งที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์เนื่องจากเป็นแหล่งที่ให้ผลผลิตสูง และ เป็นแหล่งที่ใช้สกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.2.2 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

2.2.2.1 วิธีกล(mechanical methods)

เป็นวิธีแรกที่มนุษย์พยายามแยกโปรโตพลาสาต์ออกมาจากเซลล์พืช โดยการแช่โปรโตพลาสต์ในสารละลายน้ำตาล สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1) ใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าสารละลายภายในเซลล์เพื่อให้เซลล์เกิดการพลาสโมไลซีส (plasmolysis) เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์ร่นจากผนังเซลล์แล้วใช้เข็มเล็กๆ เขี่ยแยกโปรโตพลาสต์ออกมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) ใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าสารละลายภายในเซลล์เพื่อให้เซลล์เกิดการออสโมติก(osmotic) ทำให้เซลล์เกิดการพองตัวขยายขนาดขึ้นแล้วหลุดออกมาตรงรอยแผลที่ถูกตัดด้วยใบมีด(ประภา ศรีพิจิตต์. 2539 ; ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

อย่างไรก็ตามการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการนี้จะได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยและมีเศษชิ้นส่วนและเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการปะปนออกมามาก ไม่สะดวกที่จะใช้ในการศึกษาปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมใช้แยกโปรโตพลาสต์(ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; Fowke and Constabel. 1985)

2.2.2.2 วิธีใช้เอนไซม์(enzymatic methods)

Cocking เป็นคนแรกที่ใช้เอนไซม์ เซลลูเลส (cellulase) ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Myrothecium verrucaria* ย่อยสลายผนังเซลล์เพื่อสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อรากของมะเขือเทศ การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์จะให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตในปริมาณที่สูงเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่จะมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ cellulase ซึ่งใช้ย่อยผนังเซลล์ และ เปคติเนส (pectinase) ที่ใช้ย่อย โครงสร้างที่เชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันที่เรียกว่า middle lamella ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ในการแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโตพลาสต์ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์เป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก ประหยัดเวลาได้โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์และ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539 ; ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; รังสฤษฏ์ กาวีตั๊ะ. 2540 ; Fowke and Constabel. 1985) ซึ่งการใช้เอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์สามารถกระทำได้ 2 วิธีการคือ

1) วิธีสองขั้นตอน (two - step or sequential methods)

ทำได้โดยตัดเนื้อเยื่อที่ต้องการแยกโปรโตพลาสต์ออกเป็นชิ้นเล็กๆแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ pectinase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะแยกเซลล์ที่เกาะกันออกโดยทำลาย middle lamella ทำให้เซลล์พืชถูกแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวจากนั้นนำเซลล์ที่ถูกแยกมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ cellulase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยผนังเซลล์ทำให้โปรโตพลาสต์ปลดปล่อยออกมา (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539)

2) วิธีขั้นตอนเดี่ยว (one – step methods)

ทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อที่ต้องการแยกโปรโตพลาสต์แช่ในสารละลายเอนไซม์ทั้งสองชนิดปนกัน คือ pectinase และ cellulase โดย pectinase จะทำลาย middle lamella ทำให้เซลล์พืชถูกแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว และ cellulase จะทำลายผนังเซลล์ทำให้สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว และ เป็นที่นิยมกว่าวิธีสองขั้นตอนเนื่องจากสะดวก และประหยัดเวลา (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539 ; ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; รังสฤษฏ์ กาวีตั๊ะ. 2540 ; Fowke and Constabel. 1985)

2.2.2.3 การทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์

หลังจากแยกโปรโตพลาสต์แล้วจำเป็นต้องทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่ได้ยังคงมีเศษชิ้นส่วนหรือเซลล์ที่ไม่ต้องการปะปนอยู่ เช่น คลอโรพลาสต์ (chloroplast) เซลล์ที่ไม่ถูกย่อย (undigested cell) โปรโตพลาสต์ที่เสียหาย (broken protoplast) และ ชิ้นส่วนของท่อน้ำท่ออาหาร (vascular element) ซึ่งการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์สามารถทำได้ โดยในขั้นแรกทำการกรอง (filtration) สารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์รวมอยู่ด้วยเครื่องกรอง (filter) ที่มีรูขนาด 50-70 ไมครอน เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และ เซลล์ที่ไม่ถูกย่อยจะถูกกรองไว้อยู่ด้านบนของ filter ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ และ เศษชิ้นส่วนขนาดเล็กจะผ่านเครื่องกรองไป นำไปปั่นโดยเครื่องแยกสาร (centrifuge) ที่ความเร็ว 75-100 X g เป็นเวลา 2-3 นาที โปรโตพลาสต์จะตกตะกอนอยู่ด้านล่างดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้งไป (Razdon and Bhojwani. 1983)

หลังจากนั้นแล้วการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ต่อไปสามารถเลือกกระทำได้สองวิธีการคือ วิธีการแรก เติมสารล้างโปรโตพลาสต์ (washing medium) ลงไปในตะกอนโปรโตพลาสต์จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 50 X g เป็นเวลา 3-5 นาที ทำเช่นนี้สามครั้ง เพื่อล้างทำความสะอาด โปรโตพลาสต์ และ ขจัดเอนไซม์ที่หลงเหลืออยู่ หรือ วิธีที่สองเติม washing medium ลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในตะกอนโปรโตพลาสต์เพียงเล็กน้อย แล้วนำไปใส่ไว้ที่ด้านบนของสารละลายซูโครส (sucrose) 21 เปอร์เซ็นต์(%)(w/v) จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 100 X g เป็นเวลา 10 นาที เศษชิ้นส่วนต่างๆจะจมลงสู่ด้านล่าง ส่วนโปรโตพลาสต์ที่สะอาดจะอยู่ระหว่างชั้นของ sucrose 21 % (w/v) และ washing medium จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อไป (Razdon and Bhojwani. 1983)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

2.3.1 สภาพพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์

จะขึ้นอยู่กับสภาพ และ ช่วงอายุที่พืชเจริญอยู่ ถ้าพืชเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โอกาสที่จะได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก และ มีสภาพที่ดีสามารถเพาะเลี้ยงได้รอดมากขึ้น ดังนั้น การใส่ปุ๋ยสม่ำเสมอ สภาพอุณหภูมิ ความเข้มของแสงที่พืชได้รับ และ ความชื้นสัมพัทธ์ ต่างก็มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณ และ คุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.3.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

ชนิดของเอนไซม์ที่จะเลือกใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์อาจเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันเพื่อทำลายองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539) โดยเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่มี 2 ชนิด คือ pectinase ใช้ย่อยสลาย middle lamella และ cellulase หรือ hemicellulaseที่ใช้ในการย่อยสลาย ผนังเซลล์ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

เอนไซม์ที่จำหน่ายอย่างเป็นการค้าส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ มีนิวคลีเอสและโปรติเนสผสมอยู่อาจจำเป็นจะต้องทำให้เอนไซม์ที่ใช้มีความบริสุทธิ์เสียก่อนแต่ในบางครั้งพบว่าเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะให้ผลที่ด้อยกว่าเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539 ; ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524 ; Razdon and Bhojwani. 1983)

2.3.3 ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติก

ในระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์เอนไซม์จะย่อยผนังเซลล์ซึ่งถือว่าเป็นการทำลายสิ่งค้ำจุนของเซลล์ ดังนั้นแรงดัน ออสโมติก ของสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ล้อมรอบโปรโตพลาสต์จะต้องอยู่ในสภาวะสมดุล ถ้าไม่สมดุลโปรโตพลาสต์จะอยู่ในลักษณะเหี่ยวหรือแตกได้ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ดีต้องมีรูปร่างกลมในระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์ควรมีอาการเหี่ยวเล็กน้อยเพื่อป้องกันความเสียหายของโปรโตพลาสต์ในระหว่างการแยก (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539)

ชนิด และ ความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติก ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524) สารบางชนิดอาจเหมาะกับพืชชนิดหนึ่งแต่ไม่เหมาะกับพืชอีกชนิดหนึ่งก็ได้ (ประสาทพร สมิตามาน. 2540) โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติกจะใช้อยู่ในช่วงประมาณ 0.3-0.7 โมลาร์(molar:M) (Fowke and Constabel. 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่ใช้ในเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องควบคุมแรงดันออสโมซีสจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ การควบคุมแรงดันออสโมซีสของอาหารทำได้โดยการเติมน้ำตาลแมนนิทอล(mannitol)หรือซอร์บิทอล(sorbitol)ความเข้มข้น 500-600 มิลลิโมลาร์ (millimolar;mM)ในพืชบางชนิดอาจใช้กลูโคส (glucose) แทน mannitol หรือ sorbitol ได้แต่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบของธัญพืช และ ถั่วไม่อาจใช้ glucose หรือ ซูโคส (sucrose) แทน mannitol หรือ sorbitol ได้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปนานประมาณ 2-3 วัน โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ และ มีการแบ่งเซลล์ 2-3 ครั้ง ที่ระยะนี้ควรปรับแรงดันออสโมติกในอาหารให้ค่อยๆลดลง โดยการเติมอาหารใหม่ที่ไม่มีสารออสโมติคัม(osmoticum)หรือมีในปริมาณที่น้อยลง เมื่อโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ และ สร้างโคโลนีขนาดใหญ่แล้วจึงย้ายลงสู่อาหารที่ไม่มี ออสโมติคัม (Razdon and Bhojwani. 1983)

2.3.4 ปัจจัยอื่นๆ

สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ความมืด แสงสลัวๆ ความเป็นกรดเป็นด่างมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539)

อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในระหว่างการแยกจะมีความผันแปรมากขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น ข้าวโพด ต้องการอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ในขณะที่มะเขือเทศต้องการอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส (ประภา ศรีพิจิตต์. 2539) อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิสูง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส)จะช่วยทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกสั้นลงกว่าอุณหภูมิต่ำ(ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

ระดับความเข้มข้นของ pH จะมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์โดย pH จะช่วยให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีขึ้น เช่น pH ที่ระดับ 5-6 จะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ cellulase onozuka R-10 และ pH ที่ระดับ 4-5 จะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ macerozyme onozuka R-10(Razdon and Bhojwani. 1983) โดยทั่วไป ระดับ pH ของสารละลายเอนไซม์ควรอยู่ในช่วง 5.2-6.2(อารีย์ วรัญญูวัตต์. 2541 ; Evan and Bravo. 1983)

องค์ประกอบของสารที่มีอยู่ภายในเซลล์พืชจะมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากพืชบางชนิดมีสารประกอบบางอย่างที่พืชสะสมไว้ เช่นผลึกต่างๆ หรือสะสมในรูปของสารละลายที่เข้มข้นเพราะจะมีผลต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์หลังจากแยกได้แล้ว (ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

เทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์ จะมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากพืชแต่ละกลุ่มต้องการเทคนิคในการแยกที่แตกต่างกัน เช่น ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเราไม่สามารถที่จะลอกเอาเซลล์ชั้นนอกออกได้ ต้องใช้วิธีการหั่นให้เป็นฝอยด้วยมีดโกนแทน ซึ่งพบว่า ถ้าหั่นชิ้นหนามากเกินไปจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่น้อยตามไปด้วยเนื่องจากการแทรกซึมของเอนไซม์ไปยังเซลล์ต่างๆเป็นไปได้น้อย การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีการเขย่าก็สามารถช่วยให้ได้โปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มมากขึ้นถ้าปรับให้ความเร็วรอบมากเกินไปก็อาจทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการแตกเสียหายได้ หรือถ้าปรับช้าเกินไปก็ทำให้ใช้เวลานานในการแยกโปรโตพลาสต์ (ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

บุคคลที่แยกโปรโตพลาสต์ จะมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์เป็นงานที่ต้องการความละเอียดอ่อนและความเข้าใจเป็นอย่างยิ่งถ้าผู้แยกโปรโตพลาสต์ขาดคุณสมบัติทั้งสองอย่างนี้แล้วจะทำการศึกษาให้ดีได้ยากในระหว่างขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ โดยเฉพาะในช่วงการถ่ายโปรโตพลาสต์หลังจากการปั่นแยกให้ตกตะกอนแล้วนั้น ถ้าทำแรงเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้แตกเสียหายได้ง่าย เพราะเยื่อหุ้มเซลล์ขณะนั้นค่อนข้างบางและฉีกขาดได้ง่าย (ประสาทพร สมิตามาน. 2540 ; ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.4 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

2.4.1 ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง

ในระยะแรกๆความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงควรมีความหนาแน่น 1×10^4 ถึง 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ถ้ามีความหนาแน่นมากเกินไป เมื่อแต่ละโปรโตพลาสต์เจริญเป็นโคโลนีอาจมีการลุกล้ำเข้าไปในโคโลนีของกันและกัน ทำให้เกิดเนื้อเยื่อหรือกลุ่มเซลล์ ไคเมอร่า (chimera) ถ้าหากโปรโตพลาสต์ของแต่ละเซลล์มีพันธุกรรมที่ต่างกัน ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นต่ำๆ (100-500 โปรโตพลาสต์ ต่อ มิลลิลิตร) เหมาะต่อการศึกษาและติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เดียวแต่ละเซลล์กรณีนี้มักใช้เพื่อการคัดเลือกโปรโตพลาสต์ลูกผสมที่ได้จากการรวมตัวของโปรโตพลาสต์จากพืชคนละชนิดหรือสกุล (somatic hybridization) ออกจากโปรโตพลาสต์พ่อแม่ ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันโดยวิธีอื่น หรือใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของเซลล์ (Razdon and Bhojwani. 1983)

2.4.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย

2.4.2.1 สารควบคุมแรงดันออสโมซีส (osmoticum)

อาหารที่ใช้ในเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องควบคุมแรงดันออสโมซีสจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ การควบคุมแรงดันออสโมซีสของอาหารทำได้โดยการเติมน้ำตาลแมนนิทอล หรือ ซอร์บิทอล ความเข้มข้น 500-600 มิลลิโมลาร์ ในพืชบางชนิดอาจใช้กลูโคสแทนแมนนิทอลหรือซอร์บิทอลได้ แต่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบของธัญพืชและถั่วไม่อาจใช้กลูโคสหรือซูโคสแทนแมนนิทอลหรือซอร์บิทอลได้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปนานประมาณ 2-3 วัน โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และมีการแบ่งเซลล์ 2-3 ครั้ง ที่ระยะนี้ควรปรับแรงดันออสโมซีสในอาหารให้ค่อยๆลดลงโดยการเติมอาหารใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่มีสารควบคุมแรงดันออสโมซีสหรือมีในปริมาณที่น้อยลงเมื่อโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีขนาดใหญ่แล้วจึงย้ายลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมแรงดันออสโมซีส (Razdon and Bhojwani. 1983)

2.4.2.2 เกลืออนินทรีย์

เกลือแร่ที่พืชต้องการทั้งหลายจะต้องเติมในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น เกลือไนโตรเจนใช้ทั้งในรูปเกลือไนเตรตและแอมโมเนียม และความเข้มข้นของไนเตรตและโปแทสเซียมที่เหมาะในการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์อยู่ในช่วง 20-30 มิลลิโมลาร์ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524) โปรโตพลาสต์ของพืชบางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนเตรตสูง ในขณะที่บางชนิดเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำและในโปรโตพลาสต์ของพืชบางชนิดพบว่าแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ (Fowke and Constabel. 1985) อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีเกลือแร่ในสัดส่วนที่ต่างกันมากพอสมควร เกลือพวกเหล็ก สังกะสี และแอมโมเนียมในความเข้มข้นที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะสูงเกินไปสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบของถั่วต้องการสังกะสีและเหล็กในความเข้มข้นเพียง 50 ไมโครโมลาร์ และ 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แต่สำหรับแคลเซียมพบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้สูงขึ้นกับเป็นผลดีเนื่องจากทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งแรงขึ้น (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.4.2.3 แหล่งคาร์บอน

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบต้องการน้ำตาลน้อยกว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์ น้ำตาลที่ใช้ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ก็พอเหมาะในการเจริญของโปรโตพลาสต์แล้วในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และในการแบ่งเซลล์ โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีทั้งในซูโครสและกลูโคส (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524) โปรโตพลาสต์ของพืชบางชนิดจะเจริญได้ดีเมื่อใช้ซูโครส ขณะที่บางชนิดเจริญได้ดีเมื่อใช้กลูโคส แสดงว่ากลูโคสสามารถเป็นได้ทั้งสารรักษาแรงดันออสโมซีส และแหล่งคาร์บอน ในขณะที่พืชบางชนิดซูโคสจะเป็นพิษกับโปรโตพลาสต์เมื่อใช้เป็นสารรักษาแรงดันออสโมซีส (Fowke and Constabel. 1985)

2.4.2.4 วิตามิน

วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นวิตามินทั่วไปที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เซลล์พืชต้องการไทอะมีน (thiamine-HCL) ไมโออิโนซิทอล (myoinositol) กรดนิโคทินิก (nicotinic acid) และไพริดอกซีน (pyridoxine) เพื่อให้เจริญเติบโต (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.4.2.5 ไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์

ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นิยมเติมกรดอะมิโนลงไปด้วย อาจจะเติมชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิด เช่น เติมแคสอะมิโนแอซิด (casamino acid) 0.01-0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้แคซีนไฮโดรไลเสต (casein hydrolysate) แทนได้สารเหล่านี้จำเป็นสำหรับโปรโตพลาสต์ในกรณีที่เกลือไนโตรเจนไม่เพียงพอสารเหล่านี้เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ทันทีนอกจากนี้การเติมแอล-กลูตามีน (L-glutamine) 1-5 มิลลิโมลาร์ช่วยทำให้โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีขึ้นและการเติมน้ำมะพร้าว 1-5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่ตายและมีการเจริญเติบโตได้ดีด้วยเช่นกัน (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524)

2.4.2.6 ฮอร์โมนพืช

ในการสร้างผนังเซลล์ใหม่และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปแล้วต้องการออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (cytokinins) โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะใช้ NAA หรือ 2,4-D ที่ระดับประมาณ 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) ร่วมกับใช้ BAP (6-benzylamino purine) หรือ ซีเอติน (zeatin) ที่ระดับประมาณ 0.1-1 มก./ล. (Fowke and Constabel. 1985)ออกซินจะใช้เพื่อกระตุ้นการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ ส่วนไซโตไคนินจะช่วยให้มีการแบ่งเซลล์และสังเคราะห์สารประกอบประเภทโปรตีน (ประสาทพร สมิตามาน. 2540)

2.4.3 ระบบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Fowke and Constabel. 1985)

2.4.3.1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงแบบ Liquid Cultures

การเพาะเลี้ยงแบบ Drop Cultures

การเพาะเลี้ยงแบบ Micro Chamber Cultures

การเพาะเลี้ยงแบบ Multiple Drop Array Cultures

การเพาะเลี้ยงแบบ Micro Droplet Cultures

2.4.3.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

การเพาะเลี้ยงแบบ Agar as Gelling Agent

การเพาะเลี้ยงแบบ Agarose or Alginate as Gelling Agent

2.4.3.3 การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งรวมกับอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงแบบ Gel Embedded Protoplast

การเพาะเลี้ยงโดยการใช้ feeder ชนิดต่างๆ

การเพาะเลี้ยงแบบ Feeder Layer

การเพาะเลี้ยงแบบ Nurse Cultures

การเพาะเลี้ยงแบบ Reservoir Media

การเพาะเลี้ยงแบบ Filter Paper Discs on Agar Media

การเพาะเลี้ยงแบบ Agar Drop Technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม

2.4.4.1 แสง

โดยทั่วไปแสงที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์เมื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงในตอนแรก การยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์โดยความเข้มข้นแสงนั้นยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดแต่อาจจะเป็นการทำให้คลอโรพลาสต์ของโปรโตพลาสต์ซีดลงอย่างรวดเร็ว ผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์หลายคนจะเก็บโปรโตพลาสต์ไว้ในที่มืดในระยะแรกเป็นเวลา 2-3 วัน ต่อมาจึงย้ายไปไว้ในที่มีแสงประมาณ 2000-5000 ลักซ์ (lux) และบางคนยังรายงานว่าโปรโตพลาสต์จะเจริญได้ดีขึ้นเมื่อเก็บไว้ในที่มืด แต่ในพืชตระกูลถั่วมีรายงานว่าแสงจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์ (Fowke and Constabel. 1985)

2.4.4.2 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง

โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 20-28 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ในโปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศและฝ้ายบางพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ การลดอุณหภูมิให้กับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จาก มีโซฟิลล์ ของมะเขือเทศลงไปที่ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนการเพาะเลี้ยง จะส่งเสริมการแบ่งเซลล์

pH ที่ช่วง 5.5-5.9 เป็นช่วงที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในบางครั้งค่า pH ที่สูงยังส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ (Fowke and Constabel. 1985)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้อง

ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย (2539) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงในสภาพหลอดทดลอง พบว่า สามารถชักนำให้เอมบริโออ่อนอายุ 7 วันหลังดอกบานพัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 3 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.01 มก./ล.

กุลวรา จารุพันธ์ และ จันทิมา วรสัมปุรณะ (2543) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธ์สัตตบงกชในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า สามารถชักนำตาไหลให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่เติม NAA 0.9130 มก./ล. และ TDZ 0.0011 มก./ล. โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 80.00 เปอร์เซ็นต์

2.5.2 รายงานการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เกี่ยวข้อง

อำนวย คำตื้อ และ เซอิบิ โอกะ (2537) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของผักสลัดพบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน ได้โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลว สูตร 1/2 MS ดัดแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(NH_4NO_3 80 มก./ล.) ที่เติมซูโคส 0.3 โมลาร์ , โซเดียมซักซิเนต 10 มิลลิโมลาร์ , แคสอะมิโนแอซิด 0.1 เปอร์เซ็นต์ , NAA 1.0 มก./ล. , BA 1 มก./ล. , เจลไรท์ 0.3-0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ระดับต่ำ ($2x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที)

มณฑารพ สุธาธรรม (2540) ทำการศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกได้จากใบอายุ 9 วันขึ้นไป โดยแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka R-10 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v), macerozyme onozuka R-10 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ แมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ละลายใน CPW salt solution (pH 5.8) เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และใช้ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในการปั่นเหวี่ยงโปรโตพลาสต์

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ (2541) ทำการศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจากโปรโตพลาสต์ของพืชตระกูลกะหล่ำในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชตระกูลกะหล่ำควรเก็บไว้ในที่มืดนาน 3 วันหลังจากแยกโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหาร V-KM (Binding and Nehls. 1977) โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลวใช้วุ้นอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เป็น 10^5-10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

สมปอง เตชะโต และ ชลิดา ศรีภักดี (2543) ศึกษา การแยก เพาะเลี้ยง และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ เกิดเป็นโคโลนีขนาดเล็กได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 5 มก./ล. , BA 1 มก./ล. และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ใช้ความหนาแน่น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

Doughty and Power (1988) ศึกษาการชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัสของพืชตระกูลแอปเปิ้ล (*Malus xdomestica*) พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร KM8P

Lang and Kohlenbach (1988) ทำการทดลองการพัฒนาไปเป็นแคลลัสของโปรโตพลาสต์จาก มีโซฟิลล์เซลล์ของ european beech (*Fugus sylvatica*) พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น $4x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลวสูตร KM8P ดัดแปลง โดยเติม NAA 0.893 มก./ล. และ กลูโคส 0.5 โมลาร์

Ochatt and Power (1988) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ของโปรโตพลาสต์จากมีโซฟิลล์เซลล์ของท้อพบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร MS (ไม่ใส่ NH_4NO_3) ที่เติม NAA 1 มก./ล. , IAA (indole-3- acetic acid) 1 มก./ล. , BAP 0.8 มก./ล. และ แคซีนไฮโดรไลเสต 50 มก./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enomoto and Ohyama (1989) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของผักกาดสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น $2x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงความเข้มข้นของ NH_4NO_3 เป็น 80 มก./ล. ที่เติม NAA 2 มก./ล. , BAP 0.5 มก./ล. , ซูโคส 1 เปอร์เซ็นต์(w/v) , อะกาโรส 0.1 เปอร์เซ็นต์(w/v) , แมนนิทอล 0.5 โมลาร์

Yamashita and Shimamoto (1989) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของกะหล่ำปลี พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบอาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลว โดยฝังโปรโตพลาสต์ในอาหารแข็งสูตร MS (ไม่ใส่ NH_4NO_3) ที่เติมซูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ , กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ , แมนนิทอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ , 2,4-D 1 มก./ล. , NAA 0.5 มก./ล. , BAP 0.5 มก./ล. โดยใช้อะกาโรส (Sigma Type VII) 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตัดชิ้นอาหารให้มีขนาดประมาณ 1 X 1 เซนติเมตร แล้วนำไปใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเหลวสูตรเดียวกันปริมาตร 5 มิลลิลิตรใช้ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในการเพาะเลี้ยง

Pupilli *et. al.* (1990) ทำการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากแคลลัสและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชตระกูลถั่ว (*Lotus pedunculatus* Cav.) พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์จากมีโซฟิลล์เซลล์ได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. , ไคนีติน 0.25 มก./ล. ที่ความหนาแน่น 0.5-2 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

Montagno *et. al.* (1991) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบของมะเขือเทศ พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัสได้ภายใน 5 สัปดาห์ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 4-5$x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลวสูตร LCM (Lycopersicon Culture Medium)(Tan *et. al.* 1987) ที่เติม BA 1 มก./ล. และ แมนนิทอล 6 เปอร์เซ็นต์

Ochatt (1991) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Lonicera nitida* cv.Maigrun (honeysuckle) สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์จากใบเกิดเป็นกลุ่มแคลลัสขนาดเล็กได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MS (ไม่ใส่ NH_4NO_3) ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. , BAP 1 มก./ล. และ แคซีนไฮโดรไลเสต 150 มก./ล. โดยใช้ความหนาแน่น 0.5$x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จะได้กลุ่มแคลลัสขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตรหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน

Tremouillaux-Guiller and J-Claude Chenieux (1991) ศึกษาการพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) จากโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบของ *Rauvolfia vomitoria* (พืชตระกูลระย่อม) พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอได้ โดยการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker. 1969) ที่เติม BA 1.013 มก./ล. , กลูโคส 0.16 โมลาร์ และวุ้น 9 ก./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krasnyanski.*et.al.* (1992) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของทานตะวัน พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาส์ที่แยกจากใบทานตะวันเกิดเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร V-KM ที่เติม NAA 0.1 หรือ 0.01 มก./ล. , BA 2.2 มก./ล. ใช้วิธีเลี้ยงแบบฝังในวุ้น(gel embeded) โปรโตพลาสต์จะแบ่งตัวภายใน 3 วัน

Murata and Mathaias (1992) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของโปรโตพลาสต์จากมีโซฟิลล์เซลล์ของพืชตระกูลกะหล่ำ (*Moricandia arvensis*) พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร KM8P ที่ประกอบด้วย กลูโคส 0.4 โมลาร์ หรือ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ + กลูโคส 0.1 โมลาร์ ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. , BAP 0.5 มก./ล. และ 2,4-D 1-2 มก./ล.

Nagano and Mii (1992) ศึกษาการเพาะเลี้ยงและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของโปรโตพลาสต์จากพืชสกุลเบญจมาศ พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์เกิดเป็นแคลลัสได้โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร KM8P ที่เติม NAA 5 มก./ล. , ซีเอติน 1 มก./ล. , กลูโคส 0.5 โมลาร์ จะเกิดแคลลัสภายใน 2 เดือนหลังการเพาะเลี้ยง และสามารถชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่ได้ภายใน 4-8 เดือน

Sarangi *et. al.* (1992) ศึกษาการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของถั่วมะแฮะ พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากส่วนของใบและแคลลัสให้เกิดเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้ โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น $2-3.5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร KM8P ที่เติม 2,4-D 0.4 มก./ล. , NAA 1 มก./ล. , BAP 0.5 มก./ล. , ไคนีติน 0.5 มก./ล.โปรโตพลาสต์จะพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆภายใน 9-10 วัน จากนั้นสามารถชักนำให้กลุ่มเซลล์เล็กๆพัฒนาเป็นแคลลัสได้

Patat-Octhatt *et. al.* (1993) ทำการศึกษาการเกิดการพัฒนาไปเป็นอวัยวะ (organogenesis) จากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบและลำต้นของแอปเปิ้ล พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากทั้ง 2 ส่วนสามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วในอาหารเหลวสูตร KM8P โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบ $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

Nyman and Willin (1993) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของสตอเบอรี่ พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร KM8P ที่ประกอบด้วย กลูโคส 0.4 โมลาร์ 2,4-D 1 มก./ล. , BA 0.5 มก./ล.โดยใช้อะกาโรส (Sea plaque) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความหนาแน่น 5 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในการเพาะเลี้ยง

Punja and Raharjo (1993) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของแตงกวา พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์จากใบพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโต-

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ผู้ใช้สามารถใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D 0.552 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.126 มก./ล. หรือ NAA 0.841 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.126 มก./ล. โดยใช้อะกาโรส (Sea plaque) 0.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความหนาแน่น 3.5-4 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในการเพาะเลี้ยง

Sato *et. al.* (1993) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของสะระแหน่ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ดัดแปลงที่เติม NAA 1 มก./ล. , BA 0.4 มก./ล. , ซูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ , แมนนิทอล 0.5 โมลาร์ และ เจลไรท์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความหนาแน่น $5X10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรจะสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์เจริญเป็นแคลลัสได้ภายในเวลา 30 วัน

Kunitake and Mii (1994) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของต้นสแตติช พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร 1/2MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. , NAA 1 มก./ล. , BA 1 มก./ล. , เคซีนไฮโดรไลเสต 250 มก./ล. , ซูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ และ แมนนิทอล 0.5 โมลาร์ โดยใช้เจลเลนกัม 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในการเพาะเลี้ยง

Matthew *et. al.* (1994) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของพืชสกุลกุหลาบ โดยสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร KM8P ที่เติม NAA 2 มก./ล. , BA 1 มก./ล. โดยใช้อะกาโรส (Sigma Type VII) 0.65 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความหนาแน่น 0.5-$1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในการเพาะเลี้ยง

Anthony *et. al.* (1995) ศึกษาการปรับปรุงการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบมันสำปะหลัง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $4x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลวสูตร MS (ไม่ใส่ NH_4NO_3) ที่เติม ซูโคส 87.6 โมลาร์ , $NaNO_3$ 25 มิลลิโมลาร์ , NAA 1.8621 มก./ล. , BA 0.4956 มก./ล. และ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ที่ pH 5.8 ร่วมกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร B5 (Misawa *et. al.* 1982) ที่ใส่อะกาโรส (Sea Plaque) จะเกิดเป็นกลุ่มเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ 50 วัน

Keskitalo *et.al.* (1995) ทำการทดลองโดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบของต้นแทนซี่ (*Tanacetum vulgare*) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 0.2-0.4$x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลวสูตร MS (ไม่ใส่ NH_4NO_3) เติม อะดีนีน (adenine) 5 มก./ล. , กลูโคส 90 ก./ล. , NAA 5 มก./ล. , BAP 3 มก./ล. โปรโตพลาสต์แบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์ขนาด 10-15 เซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Nakano *et. al.* (1995) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ Gentiana โดยการใช้โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมาเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลวร่วมกับอาหารแข็งโดยนำโปรโต-พลาสต์ไปทำการฝังในอาหารสูตร B5 ที่เติม NAA 2 มก./ล. , TDZ 0.1 มก./ล. , ซูโคส 0.1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ใช้เจลเลนกัม เป็นตัวทำให้อาหารแข็ง จากนั้นเทอาหารสูตร B5 ทับลงไปโปรโตพลาสต์จะมีการแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยง 3-4 วัน และสามารถพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ในเวลา 2 เดือน จากนั้นสามารถชักนำให้กลุ่มเซลล์เกิดเป็นแคลลัสได้โดยการย้ายกลุ่มเซลล์ลงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มก./ล. , TDZ 0.1 มก./ล. , ซูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) , เจลเลนกัม 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

Marchant *et. al.* (1997) ทำการศึกษาการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากมีโซฟิลล์เซลล์ของกุหลาบพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้โดยใช้ความหนาแน่น $0.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร KM8P (Kao and Michayluk. 1975) ที่เติม PVP-10 (Polyvinylpyrrolidone) 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) , NAA 1.659 มก./ล. , BA 1.001 มก./ล.

Dorion *et. al.* (1999) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศพบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์เกิดเป็นแคลลัสได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น $0.5\text{-}2x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตรที่มีส่วนประกอบคือ macronutrients ใช้สูตร 1/2MS (ไม่ใส่ NH_4NO_3) , micronutrients ใช้สูตร MS วิตามินใช้สูตร MW (Morel and Wetmore.1951) ที่ไม่ใส่ ไพริด็อกซีน เติมซูโคส 10 ก./ล. , กลูโคส 5 ก./ล. , แมนนิทอล 80 ก./ล. , Na_2EDTA 7.4 ก./ล. , $FeSO_4.7H_2O$ 5.57 ก./ล. , MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 140 ก./ล. , 2,4-D 0.5 มก./ล. , NAA 0.3 มก./ล. , BA 0.8 มก./ล. โปรโตพลาสต์จะแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์ในเวลา 3-4 สัปดาห์

Hu *et. al.* (1999) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์จากมีโซฟิลล์เซลล์ของพืชตระกูลกะหล่ำ (*Isatis indicotica*) พบว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสที่มียอดได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น $8x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog. 1965)

Tian and Meag (1999) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชตะกูลกะหล่ำ (*Moricandia nitens*) สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์จากมีโซฟิลล์เซลล์เกิดเป็นแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร KM8P (Kao and Michayluk. 1975) ที่ไม่ใส่ อะมิโนแอซิด และ นิวคลีอิกแอซิด และ ใช้วิตามินจากสูตร B5 (Gamborg *et al.* 1968) แทนและเติม กลูโคส 0.4 โมลาร์ , กลูตามีน 0.5 ก./ล. , MES 5 มิลลิโมลาร์ , BA 0.5 มก./ล. , 2,4-D 1 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. pH 5.6 โดยใช้ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

3.1.2 เอนไซม์

3.1.2.1 เซลลูเลส (cellulase onozuka R-10)

3.1.2.2 มาเซอโรไซม์(macerozyme onozuka R-10)

3.1.3 อาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (ตารางภาคผนวกที่ 1)

3.1.3.1 อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3)(ตารางภาคผนวก ก)

3.1.3.2 อาหารสูตร KM8P(A) (Kao and Michayluk. 1975) (ตารางภาคผนวก ก)

3.1.3.3 อาหารสูตร KM8P(B) (ตารางภาคผนวก ก)

3.1.3.4 อาหารสูตร V-KM (Binding and Nehls. 1977) (ตารางภาคผนวก ก)

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

3.1.4.1 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ

3.1.4.3 กล้องจุลทรรศน์ แบบหัวกลับ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.4.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 2 ตำแหน่ง

3.1.4.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง

3.1.4.6 เครื่องเซนติฟิวส์แบบเหวี่ยง

3.1.4.7 ที่นับจำนวนเซลล์ (Haemocytometer)

3.1.4.8 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.4.9 เครื่องวัดความเป็น กรด – ด่าง

3.1.4.10 เครื่องเขย่า

3.1.4.11 ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้

3.1.4.12 ลูกยางชนิดทนร้อน

3.1.4.13 ด้ามมีดผ่าตัดพร้อมใบมีด

3.1.4.14 ปากคีบ

3.1.4.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.16 เตาแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.17 ผ้าไนลอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูตะแกรง 100 ไมโครเมตร

3.1.4.18 ผ้าไนลอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูตะแกรง 64 ไมโครเมตร

3.1.4.19 เครื่องกรองอาหารปลอดเชื้อขนาด 500 และ 250 มิลลิลิตร (bottle top filter)

3.1.4.20 จานเพาะเลี้ยงพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65 มิลลิเมตร

3.1.4.21 ถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางช่องละ 7 มิลลิเมตร

3.1.5 อุปกรณ์และภาชนะเครื่องแก้ว

3.1.5.1 ขวดแก้วทรงชมพู่

3.1.5.2 ขวดแก้ววัดปริมาตร

3.1.5.3 หลอดฉีดยา

3.1.5.4 หลอดเซนติฟิวจ์

3.1.5.5 บีกเกอร์

3.1.5.6 ปิเปตต์

3.1.5.7 จานเพาะเลี้ยงพลาสติก

3.1.5.8 กรวยยึดกระดาษกรอง(filter holder)

3.1.5.9 ผ้าไนลอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูตะแกรง 100 ไมโครเมตร

3.1.5.10 กรวยแก้ว

3.1.5.11 กระดาษกรอง ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร

3.1.5.12 กระดาษกรอง Whatman

3.1.5.13 อลูมิเนียมฟอยล์

3.1.7 สารเคมี

3.1.7.1 สีย้อม fluorescien diacetate (FDA)

3.1.7.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ได้แก่ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) , BA (benzyladenine) , NAA (α-napthalene acetic acid) , TDZ (1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-UREA)

3.1.7.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ เช่น alcohol , clorox , tween 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการ

3.2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

CPW salt: ประกอบด้วย

KH_2PO_4	27.2	มิลลิกรัมต่อลิตร
KNO_3	101.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2.7H_2O$	1480.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	246.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
KI	0.16	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร

CPW 13 M medium - CPW salt with 13% แมนนิทอล

CPW 10 M medium - CPW salt with 10% แมนนิทอล

CPW 20 S medium - CPW salt with 20% น้ำตาลซูโครส

3.2.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

Enzyme A:

cellulase onozuka R-10 2%(w/v)

macerozyme onozuka R-10 1%(w/v)

MES 5 mM

ละลายใน CPW salt

3.2.3 ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์

นำเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก มาฟอกฆ่าเชื้อโดย แช่ใน ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วย clorox 20 เปอร์เซ็นต์+ tween 20 2 หยด นาน 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆละ 5 นาทีจากนั้นนำมาเมล็ดบัวมาผ่าออก ตัดเอาเฉพาะส่วนเอมบริโอบัวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 3 องศาเซลเซียสและให้แสง 14 ชั่งโมงต่อวัน

3.2.4 วิธีการทดลอง

3.2.4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทำการทดลอง</u> นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครั้งเดียว สีเขียวสด (ภาพที่ 3.1 A) จำนวน 1 กรัม มาทำการแยกโปรโตพลาสต์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการ พลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPW รวมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ พลาสเจอร์ปีเปต ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติมแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ละลายใน CPW ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเก็บไว้ในที่มืด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 treatments จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

Treatments ที่ 1 แช่ใบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Treatments ที่ 2 แช่ใบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Treatments ที่ 3 แช่ใบเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

Treatments ที่ 4 แช่ใบเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

- ทำการนับโปรโตพลาสต์โดย นำสารละลายโปรโตพลาสต์จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย fluorescein diacetate(FDA)0.01% จำนวน 20 ไมโครลิตร(Widholm. 1972) นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ บนที่นับจำนวนเซลล์

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

<u>การทำการทดลอง</u> นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครั้งเดียว สีเขียวสด (ภาพที่ 3.1 A) จำนวน 1 กรัม มาทำการแยกโปรโตพลาสต์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการ พลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPW รวมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ พลาสเจอร์ปีเปต ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติมแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ละลายใน CPW ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเก็บไว้ในที่มืดตามเวลาที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง 1.1

- เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบแล้วเอียง จานเพาะเลี้ยง ทำมุม 15 องศา กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มาทำการกรองด้วย ผ้าไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูตะแกรง 100 และ 64 ไมโครเมตรตามลำดับ แล้วใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ ความเร็วระดับต่างๆเป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอมไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ ใส่สารละลาย CPW+20% น้ำตาลซูโครส ทำการ รีซัสเปนชั่น แล้วนำไปปั่นที่ ความเร็วระดับต่างๆเป็นเวลา 5 นาที วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 treatments จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

Treatments ที่ 1 ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 300 รอบต่อนาที

Treatments ที่ 2 ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 750 รอบต่อนาที

Treatments ที่ 3 ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1000 รอบต่อนาที

- ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบน(ภาพที่ 3.1 B) มาใส่ในสารละลาย CPW ที่เติม แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ แล้วนำไปปั่นที่ ความเร็วระดับต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

- ทำการนับโปรโตพลาสต์โดย นำสารละลายโปรโตพลาสต์จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย fluorescein diacetate(FDA)0.01% จำนวน 20 ไมโครลิตร(Widholm. 1972) นับจำนวนและความมีชีวิตของ โปรโตพลาสต์ บนที่นับจำนวนเซลล์

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาระดับ osmoticum ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

<u>การทำการทดลอง</u> นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครั้งเดียว สีเขียวสด (ภาพที่ 3.1 A) จำนวน 1 กรัม มาทำการแยกโปรโตพลาสต์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการ พลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPW รวมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ pastaur pipette ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติม แมนนิทอล 3 ระดับ ละลายใน CPW ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เก็บไว้ในที่มืดตามเวลาที่ได้ผลดีที่สุดของการทดลอง 1.1วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 treatments จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

Treatments ที่ 1 ใช้ แมนนิทอล 0.4 M

Treatments ที่ 2 ใช้ แมนนิทอล 0.5 M

Treatments ที่ 3 ใช้ แมนนิทอล 0.6 M

- เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบแล้วเอียง petridish ทำมุม 15 องศา กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มาทำการกรองด้วย ผ้าไนลอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูตะแกรง 100 และ 64 ไมโครเมตรตามลำดับแล้วใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง 1.2 เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอมไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ใส่สารละลาย CPW+20% น้ำตาลซูโครส ทำการ รีซัสเปนชั่น แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง 1.2 เป็นเวลา 5 นาที

- ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบน(ภาพที่ 3.1 B)มาใส่ในสารละลาย CPW ที่เติม แมนนิทอล ตามความเข้มข้นที่ใช้ในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง 1.2 เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

- นำสารละลายโปรโตพลาสต์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมเข้ากับสารละลาย fluorescein diacetate(FDA)0.01% จำนวน 20 ไมโครลิตร(Widholm. 1972) นับจำนวนและความมีชีวิตของ โปรโตพลาสต์ บนที่นับจำนวนเซลล์

3.2.4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บัวหลวง

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

<u>วิธีการแยกโปรโตพลาสต์</u>

- นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครึ่งเดียว สีเขียวสด (ภาพที่ 3.1 A) มาจำนวน 1 กรัมมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการ พลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPWร่วมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ พลาสเจอร์ปิเปต ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติมแมนนิทอล ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ละลายใน CPW ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1

- เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบแล้วเอียง จานเพาะเลี้ยง ทำมุม 15 องศา กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มาทำการกรองด้วย ผ้าไนลอน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูตะแกรง 100 และ 64 ไมโครเมตร แล้วใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอมไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ใส่สารละลาย CPW+น้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการ รีซัสเปนชั่น แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบน (ภาพที่ 3.1B) มาใส่ในสารละลาย CPW ที่เติม แมนิทอล ตามความเข้มข้นที่ใช้ในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาทีทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

- ล้างโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยง 1 ครั้ง

- นำสารละลายโปรโตพลาสต์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมเข้ากับสารละลาย fluorescein diacetate(FDA)0.01% จำนวน 20 ไมโครลิตร(Widholm. 1972) นับจำนวนและความมีชีวิตของ โปรโตพลาสต์ บนที่นับจำนวนเซลล์

- หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตรต่างๆแบบ Thin layer ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65 มิลลิเมตร ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยง 5 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 3 treatments จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1จานเพาะเลี้ยง ดังนี้

treatments 1 = อาหารสูตร MS ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3)

treatments 2 = อาหารสูตร KM8P(A)

treatments 3 = อาหารสูตร V-KM

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

<u>วิธีการแยกโปรโตพลาสต์</u>

- นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครึ่งเดียว สีเขียวสด(ภาพที่ 3.1 A) จำนวน 1 กรัมมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการ พลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPW ร่วมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ พลาสเจอร์ปิเปต ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติมแมนนิทอล ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ละลายใน CPW ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1

- เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบแล้วเอียง จานเพาะเลี้ยง ทำมุม 15 องศา กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มาทำการกรองด้วย ผ้าไนลอน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูตะแกรง 100 และ 64 ไมโครเมตร แล้วใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอมไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ใส่สารละลาย CPW+น้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการ รีซัสเปนชั่น แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบน (ภาพที่ 3.1B) มาใส่ในสารละลาย CPW ที่เติม แมนิทอล ตามความเข้มข้นที่ใช้ในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาทีทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

- ล้างโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยง 1 ครั้ง

- นำสารละลายโปรโตพลาสต์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมเข้ากับสารละลาย fluorescein diacetate(FDA)0.01% จำนวน 20 ไมโครลิตร(Widholm. 1972) นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ บนที่นับจำนวนเซลล์

- หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตรKM8P (A) แบบ Thin layer ในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 ช่อง ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยงเป็น 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ระดับต่างๆ บันทึกลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 6 treatments จำนวน 6 ซ้ำๆละ 1 ช่อง ดังนี้

Treatments 1	=	0.10×10^5	โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร
Treatments 2	=	0.25×10^5	โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร
Treatments 3	=	0.50×10^5	โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร
Treatments 4	=	0.75×10^5	โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร
Treatments 5	=	1.00×10^5	โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร
Treatments 6	=	2.50×10^5	โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร

การทดลองที่ 2.3 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

- นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครั้งเดียว สีเขียวสด(ภาพที่ 3.1 A) จำนวน 1 กรัมมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการ พลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPW ร่วมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ พลาสเจอร์ปิเปต ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติมแมนนิทอล ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ละลายใน CPW ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1

- เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบแล้วเอียง จานเพาะเลี้ยง ทำมุม 15 องศา กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มาทำการกรองด้วย ผ้าไนลอน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูตะแกรง 100 และ 64 ไมโครเมตร แล้วใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอมไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ใส่สารละลาย CPW+น้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการ รีซัสเปนชั่น แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

- ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบน (ภาพที่ 3.1B) มาใส่ในสารละลาย CPW ที่เติม แมนิทอล ตามความเข้มข้นที่ใช้ในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาทีทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

- ล้างโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยง 1 ครั้ง

- นำสารละลายโปรโตพลาสต์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมเข้ากับสารละลาย fluorescein diacetate(FDA)0.01% จำนวน 20 ไมโครลิตร(Widholm. 1972) นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ บนที่นับจำนวนเซลล์

- หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ทำการเพาะเลี้ยงแบบ Thin layer ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65 มิลลิเมตร ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยง 5 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 10 x10^4 โปรโตพลาสต์ ต่อมิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 2 treatments จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1จานเพาะเลี้ยง ดังนี้

treatments 1 = อาหารสูตร KM8P(A) (ตารางภาคผนวก ก)

treatments 2 = อาหารสูตร KM8P(B) (ตารางภาคผนวก ก)

- วางจานเพาะเลี้ยงในที่มืด บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 40 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงออกจากที่มืดทำการบันทึกลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

3.2.4.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

<u>วิธีการแยกโปรโตพลาสต์</u>

- นำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลักษณะใบกางออกเพียงครั้งเดียว สีเขียวสด (ภาพที่ 3.1 A)จำนวน 1 กรัมมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- สับใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วนำมาทำการพลาสโมไลซีส ด้วยสารละลาย CPW ร่วมกับ แมนนิทอล 13 เปอร์เซ็นต์ แช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นใช้ พลาสเจอร์ปิเปต ดูดสารละลายเดิมออก แล้วใส่สารละลายเอมไซม์ A ที่เติมแมนนิทอล ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ละลายใน CPW ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เขย่าชิ้นส่วนด้วยปากคีบแล้วเอียง จานเพาะเลี้ยง ทำมุม 15 องศา กับพื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มาทำการกรองด้วย ผ้าไนลอน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูตะแกรง 100 และ 64 ไมโครเมตร แล้วใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอมไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ใส่สารละลาย CPW+น้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการ รีซัสเปนชั่น แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที

- ดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบน (ภาพที่ 3.1B) มาใส่ในสารละลาย CPW ที่เติม แมนิทอล ตามความเข้มข้นที่ใช้ในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง ที่ 1 เป็นเวลา 5 นาทีทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

- ล้างโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยง 1 ครั้ง

- หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น มาทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) แบบ Thin layer ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตาม treatment combinations ในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 ช่อง ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยงเป็น 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 0.25×10^4 โปรโตพลาสต์ ต่อมิลลิลิตรวางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 30 treatment combinations จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1 ช่อง มี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของ 2,4-D 5 ระดับคือ

a1 = 0.0 มก./ล.

a2 = 0.5 มก./ล.

a3 = 1.0 มก./ล.

a4 = 1.5 มก./ล.

a5 = 2.0 มก./ล.

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของ BA มี 6 ระดับคือ

b1 = 0.0 มก./ล.

b2 = 0.2 มก./ล.

b3 = 0.4 มก./ล.

b4 = 0.6 มก./ล.

b5 = 0.8 มก./ล.

b6 = 1.0 มก./ล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- บันทึกลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

<u>วิธีการแยกโปรโตพลาสต์</u> ทำการแยกโปรโตพลาสต์เหมือนวิธีที่กล่าวมาในการทดลองที่ 3.1

- หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น มาทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) แบบ Thin layer ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตาม treatment combinations ในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 ช่อง ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยงเป็น 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 0.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 30 treatment combinations จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1 ช่อง มี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของ 2,4-D 5 ระดับคือ

a1 = 0.0 มก./ล.

a2 = 0.5 มก./ล.

a3 = 1.0 มก./ล.

a4 = 1.5 มก./ล.

a5 = 2.0 มก./ล.

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของ TDZ มี 6 ระดับคือ

b1 = 0.00 มก./ล.

b2 = 0.01 มก./ล.

b3 = 0.05 มก./ล.

b4 = 0.10 มก./ล.

b5 = 0.25 มก./ล.

b6 = 0.50 มก./ล.

- บันทึกลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAAและ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

<u>วิธีการแยกโปรโตพลาสต์</u> ทำการแยกโปรโตพลาสต์เหมือนวิธีที่กล่าวมาในการทดลองที่ 3.1

- หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น มาทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) แบบ Thin layer ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตาม treatment combinations ในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 ช่อง ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยงเป็น 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 0.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 30 treatment combinations จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1 plates มี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของ NAA 5 ระดับคือ

a1 = 0.0 มก./ล.
a2 = 0.5 มก./ล.
a3 = 1.0 มก./ล.
a4 = 1.5 มก./ล.
a5 = 2.0 มก./ล.

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของ BA มี 6 ระดับคือ

b1 = 0.0 มก./ล.
b2 = 0.2 มก./ล.
b3 = 0.4 มก./ล.
b4 = 0.6 มก./ล.
b5 = 0.8 มก./ล.
b6 = 1.0 มก./ล.

- บันทึกลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAAและ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

<u>วิธีการแยกโปรโตพลาสต์</u> ทำการแยกโปรโตพลาสต์เหมือนวิธีที่กล่าวมาในการทดลองที่ 3.1

- หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น มาทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) แบบ Thin layer ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตาม treatment combinations ในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 96 ช่อง ใช้ปริมาตรในการเพาะเลี้ยงเป็น 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 0.25×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรวางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 30 treatment combinations จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1 plates มี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของ NAA 5 ระดับคือ

a1 = 0.0 มก./ล.

a2 = 0.5 มก./ล.

a3 = 1.0 มก./ล.

a4 = 1.5 มก./ล.

a5 = 2.0 มก./ล.

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของ TDZ มี 6 ระดับคือ

b1 = 0.00 มก./ล.

b2 = 0.01 มก./ล.

b3 = 0.05 มก./ล.

b4 = 0.10 มก./ล.

b5 = 0.25 มก./ล.

b6 = 0.50 มก./ล.

- บันทึกลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

3.2.4.4 การบันทึกข้อมูล

1) ตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยการย้อมสี fluorescien diacetate (FDA) 0.01 เปอร์เซ็นต์ (Widholm. 1972) โดยเตรียม stock solution ของ FDA ละลายในอะซีโตน (acetone)ความเข้มข้น 5 mg FDA / 1ml acetone ทำการเจือจาง FDA ในสารละลาย CPW ให้มีความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย้อมเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แกว่งเบาๆ ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สีย้อม FDA ซึมผ่านผนังเมมเบรน หยดตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์นำแผ่นสไลด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence ที่ช่วงแสงสีน้ำเงิน (ทินกร อินทรักษ์. 2541)

2) ศึกษาลักษณะของโปรโตพลาสต์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยการบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ที่ช่วงแสงปกติ

3) บันทึกผลการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เมื่อนำจานเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ โดยการวัดค่า

- เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ โดยวัดจาก จำนวนของโปรโตพลาสต์ที่สามารถแบ่งตัวแบบต่างๆหลังจากเพาะเลี้ยงได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่สามารถแบ่งตัว}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง}} \times 100$$

- บันทึกลักษณะของกลุ่มเซลล์

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' New Multiple Range Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95 %

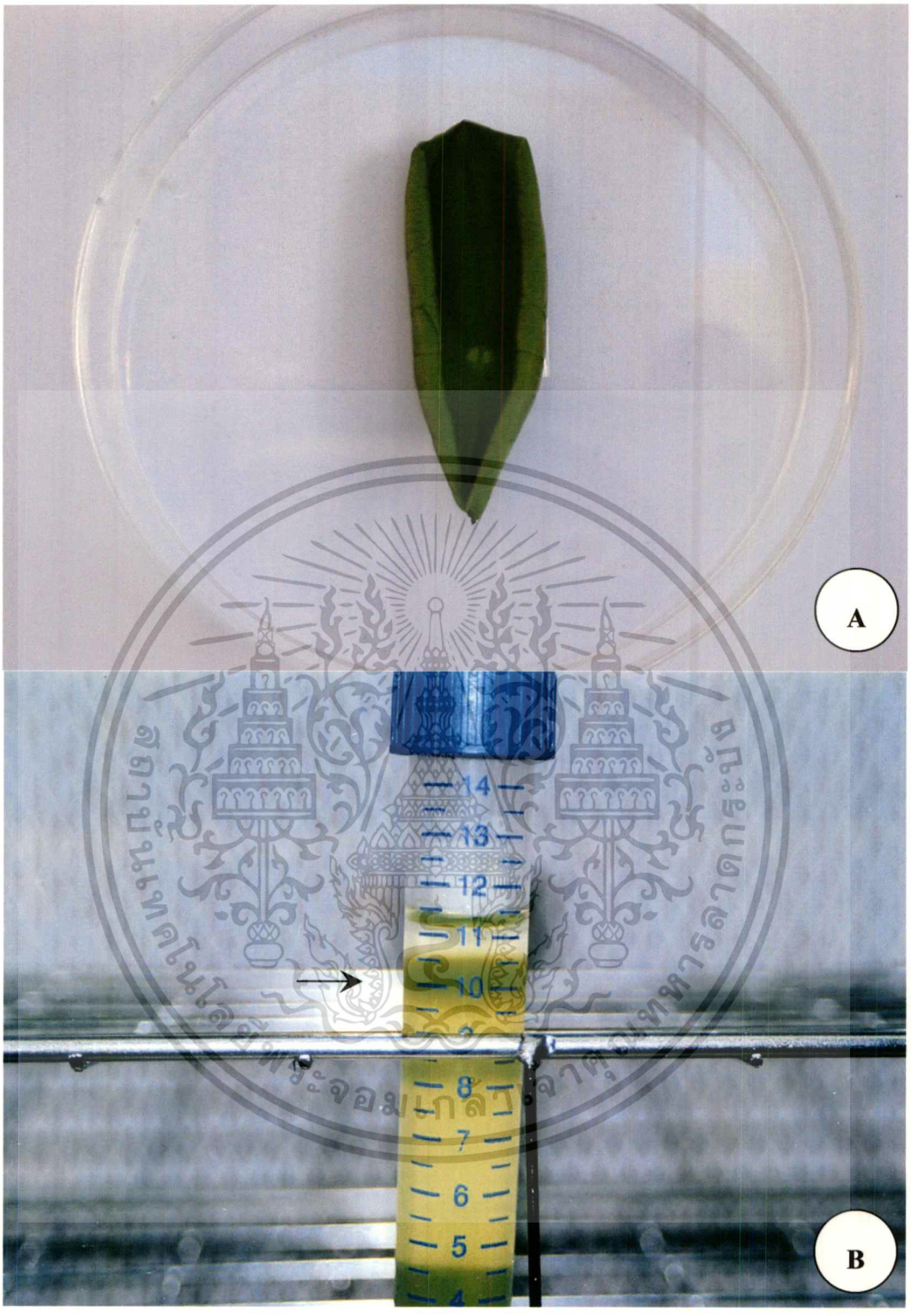
3.4 สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองที่ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มการทดลอง มีนาคม 2545
สิ้นสุดการทดลอง กรกฎาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะใบที่ใช้ในการทดลองและการทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์

A = ลักษณะใบที่ใช้ในการทดลอง

B = การทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

การทดลองที่1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ด้วยสารละลายเอนไซม์ A ที่มีระดับแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ pH ของสารละลายเป็น 5.4 ทำการนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ที่เวลา 4 , 6 , 8 และ10 ชั่วโมง พบว่า จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการแช่ในสารละลายเอนไซม์นานขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 – 8 หลังจากนั้นจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จะลดลงเมื่อทำการแช่ในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยเมื่อทำการแช่ในสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด คือ 23.97×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ การแช่ในสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 10 , 6 และ 4 ชั่วโมง โดยจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 16.41 , 10.03 และ 7.96×10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่4.1) โดยที่ จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแช่ในสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแช่ในสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 4 , 6 และ 10 ชั่วโมง

ในด้านความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เมื่อทำการตรวจนับ หลังจากแช่ใบบัวหลวงเป็นเวลา 4 , 6 , 8 และ10 ชั่วโมง พบว่าความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่นับได้ในแต่ละชั่วโมงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย เมื่อทำการแช่ในสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ที่ได้จะมีความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 38.72 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ เมื่อทำการแช่ในสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง 6 , 10 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ

ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบเมื่อทำการแช่ใบบัวหลวงในสารละลายเอนไซม์ A เป็นเวลา 4 ชั่วโมงพบว่า ตรวจพบชิ้นส่วนใบที่ยังไม่ถูกย่อยเป็นจำนวนมาก โปรโตพลาสต์บางส่วนยังติดอยู่กับแผ่นเนื้อเยื่อใบ เนื้อเยื่อใบถูกเอนไซม์ย่อยเพียงเล็กน้อย เมื่อใช้ปากคีบเขย่าใบ โปรโตพลาสต์จะหลุดออกมาได้บ้างเล็กน้อย สารละลายเอนไซม์มีสีเหลืองอ่อนซึ่งเป็นสีของเอนไซม์ หลังจากนั้นเมื่อ แช่เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะพบโปรโตพลาสต์หลุดออกมาในสารละลายเอนไซม์มากขึ้น โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม ลักษณะเนื้อเยื่อใบที่พบมีความอ่อนกว่าเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์เพียง 4 ชั่วโมง สารละลายมีสีเขียว หลังจากนั้นเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์หลุดออกมาในสารละลายเอนไซม์มาก สารละลายมีสีเข้มขึ้น โปรโตพลาสต์หลุดออกมาแขวนลอยในสารละลายเอนไซม์มาก เริ่มเห็นโปรโตพลาสต์ที่แตกออกกระจายอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเอนไซม์ หลังจากนั้นเมื่อเวลา 10 ชั่วโมง ตรวจพบโปรโตพลาสต์แขวนลอยอยู่ในสารละลายเอนไซม์มากขึ้นแต่โปรโตพลาสต์ที่พบจะมีทั้งโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลมและโปรโตพลาสต์ที่แตกออกเพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของเวลาที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสตจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

ระยะเวลา(ชั่วโมง)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)(± SE)	ความมีชีวิต(± SE) (%)
4	7.96±0.83d	32.06±3.07
6	10.03±0.60c	37.83±7.69
8	23.97±1.6a	38.72±3.24
10	16.41±0.86b	34.24±11.53
F-test	**	ns
CV (%)	7.17	23.40

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงในสภาพปลอดเชื้อ โดยสับใบบัวหลวงแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ A ที่มี แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วระดับต่างๆคือ 300 , 750 และ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที พบว่า การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 750 รอบต่อนาที ลักษณะชั้นของโปรโตพลาสต์ที่พบจะแยกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นของ น้ำตาลซูโครสและชั้นของแมนนิทอล โดยมีชั้นโปรโตพลาส์สีเขียวเข้มอยู่ระหว่างชั้นทั้งสอง มองเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.1 B) และเมื่อทำการตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ พบว่าจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 25.63 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 ลักษณะชั้นของโปรโตพลาสต์ที่พบจะแยกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นของน้ำตาลซูโครสและชั้นของแมนนิทอล โดยมีชั้นโปรโตพลาส์สีเขียวจางอยู่ระหว่างชั้นทั้งสอง ชั้นโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีสีจางและความกว้างของชั้นน้อยกว่าเมื่อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 750 รอบต่อนาที (ภาพที่ 4.1 C) และเมื่อทำการตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ พบว่าจะให้จำนวนโปรโต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์ 24.00 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ลักษณะชั้นของโปรโตพลาสต์ที่พบจะแยกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นของน้ำตาลซูโครสและชั้นของแมนนิทอล โดยชั้นโปรโตพลาส์สีเขียวไม่อยู่ระหว่างชั้นทั้งสองแต่กระจายอยู่ในชั้นของแมนนิทอลมีสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 4.1 A) และเมื่อทำการตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ พบว่าจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 15.07 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดโดย การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 750 รอบต่อนาที มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที(ตารางที่ 4.2)

ส่วนในด้านความมีชีวิตที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง พบว่า การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบระดับต่างๆจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีจะให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงที่สุด คือ 16.24 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 และ 750 รอบต่อนาที โดยจะให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ 15.87 และ 11.73 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบเมื่อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที โปรโตพลาสต์จะมีขนาดเล็ก ประมาณ 10 -20 ไมครอน พบโปรโตพลาสต์ที่แตกปนกับโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลมโปรโตพลาสต์มีชีวิตส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก เมื่อ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 750 และ 1000 รอบต่อนาที โปรโตพลาสต์ที่พบมีขนาดประมาณ 40-60 ไมครอน ตรวจพบชิ้นส่วนของโปรโตพลาสต์ที่แตกน้อยกว่า การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

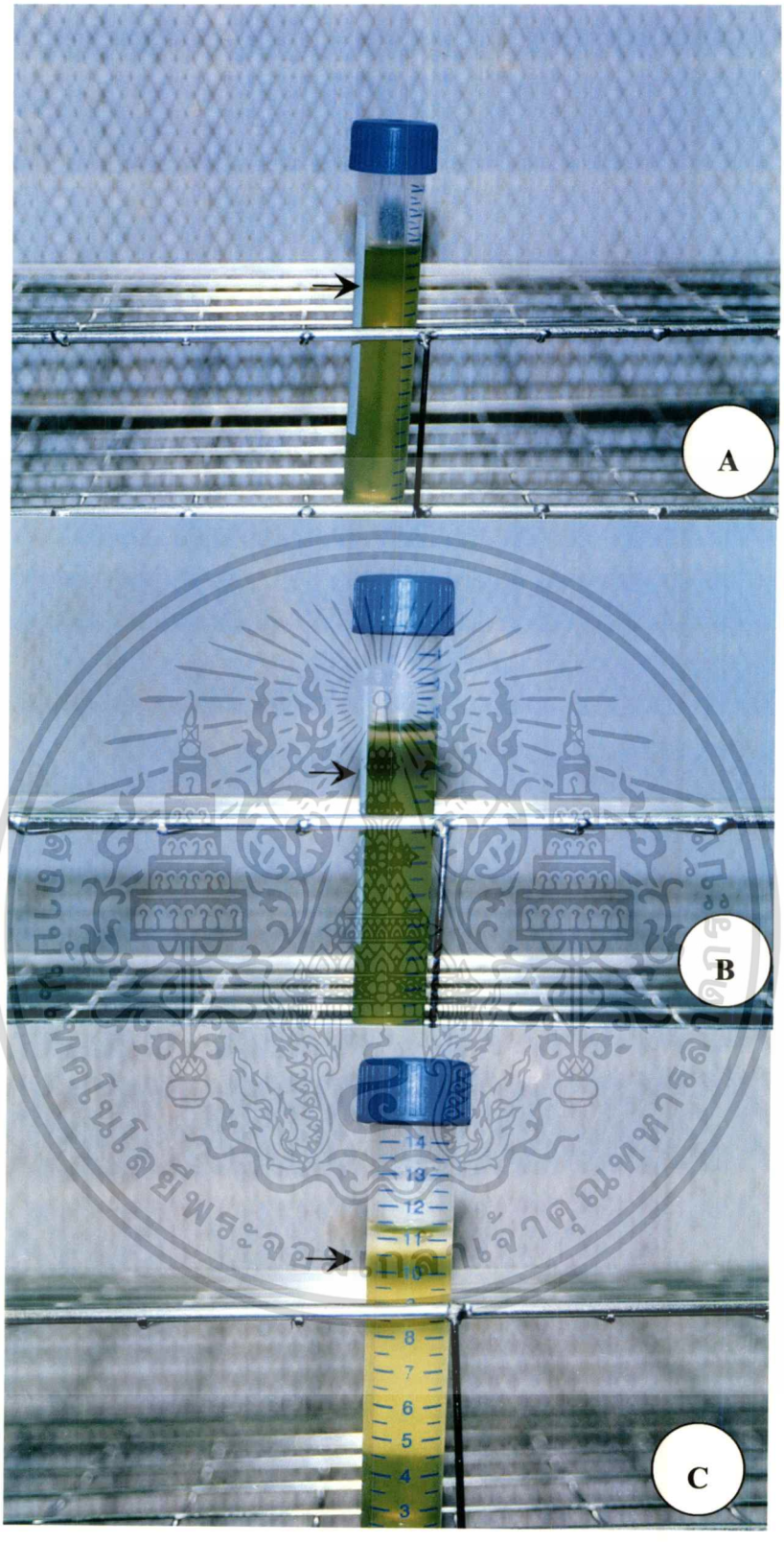
ความเร็วในการปั่น (รอบต่อนาที)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)(± SE)	ความมีชีวิต(± SE) (%)
300	15.07±3.48b	15.87±5.25
750	25.63±0.45a	11.73±3.95
1000	24.00±5.72a	16.24±7.64
F-test	*	ns
CV (%)	17.96	39.80

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงการทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ที่ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงระดับต่างๆ

A = ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

B = ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

C = ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาระดับ osmoticum ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ โดยสับใบบัวหลวงแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ A ที่มี แมนนิทอล ระดับต่างๆ 3 ระดับ คือ 0.5, 0.6 และ 0.7 โมลาร์ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด คือ $33.00x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.7 และ 0.6 โมลาร์ โดยจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $23.50x10^4$ และ $14.40x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)โดยที่ แมนนิทอล ที่ระดับ 0.5 โมลาร์ จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ กับ แมนนิทอล ที่ระดับ 0. 7 และ 0.6 โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบ เมื่อใช้ แมนนิทอล ที่ระดับ 0.5 โมลาร์ จะมีขนาดประมาณ 30-50 ไมครอน โปรโตพลาสต์ค่อนข้างกลมใส เมื่อใช้ แมนนิทอล ที่ระดับ 0. 7 โปรโตพลาสต์ที่พบจะมีขนาดประมาณ 40-60 ไมครอนโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลมส่วนเมื่อใช้ แมนนิทอล ที่ระดับ 0.6 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ที่พบจะมีขนาดประมาณ 20-30 ไมครอน

ในด้านความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เมื่อทำการตรวจนับหลังการแยกทันที พบว่า แมนนิทอล ที่ระดับ 0.5 โมลาร์ จะให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงที่สุด คือ 47.77 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ แมนนิทอล ที่ระดับ 0.6 และ 0.7 โมลาร์ โดยจะให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ 31.04 และ 28.06 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่ง แมนนิทอล ที่ระดับ 0.5 โมลาร์ จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ แมนนิทอล ที่ระดับ 0.6 และ 0.7 โมลาร์

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของ ระดับ osmoticum ทีมีต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Osmoticum(แมนนิทอล)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)(± SE)	ความมีชีวิต(± SE) (%)
0.5	33.00±1.6a	47.77±3.33a
0.6	14.40±2.55c	31.04±5.77b
0.7	23.50±1.17b	28.06±10.84b
F-test	**	*
CV (%)	7.90	20.61

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

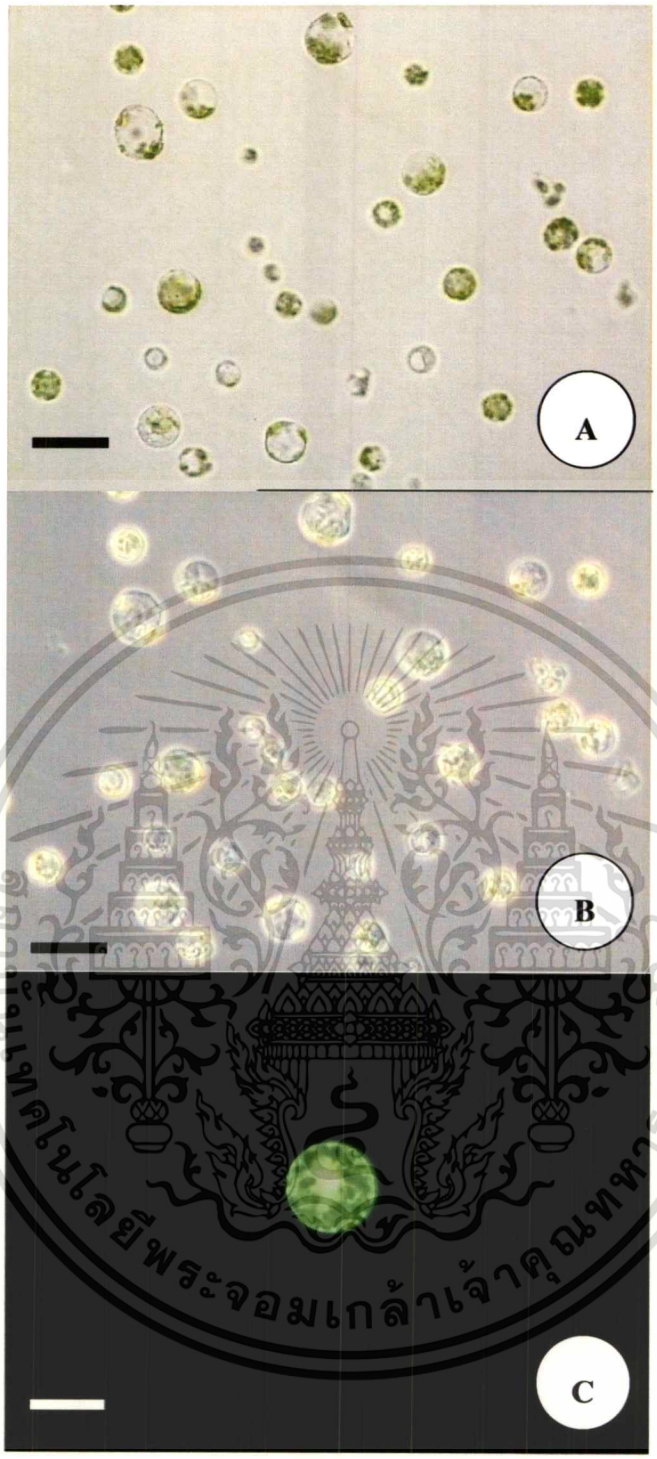
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บัวหลวง

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บัวหลวง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารพื้นฐาน 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3) ,อาหารสูตร V-KM และ อาหารสูตร KM8P(A) ทำการทดลองโดยแยกโปรโต-พลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 พบว่า หลังทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีที่กล่าวมาใน บทที่ 3 ข้อ 3.2.4.2 การทดลองที่ 2.1 พบว่าได้ จำนวนโปรโตพลาสต์ 6.6×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด โปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีลักษณะกลมสีเขียว(ภาพที่ 4.2 A,B) โปรโตพลาสต์มีความมีชีวิต 42.42 เปอร์เซนต์ (ภาพที่4.2 C) ทำการปรับความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น 1.0×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำ โปรโตพลาสต์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 3 สูตร MS ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3) , อาหารสูตร V-KM และ อาหารสูตร KM8P(A) โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ Thin Layer ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 65 มิลลิเมตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3) จะไม่รวมตัวกันอยู่กลางจานเพาะเลี้ยง ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีหลายลักษณะได้แก่โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลมใส และโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะสีเขียวหนาแน่น นอกจากนั้นยังตรวจพบโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะบิดเบี้ยวและแตกออกมาก พบโปรโตพลาส์ที่มีการแบ่งตัว (ภาพที่ 4.3 A) ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์ในอาหารสูตร อาหารสูตร V-KM พบโปรโตพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในอาหารไม่เกาะกลุ่ม ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีหลายลักษณะ ได้แก่ โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลมใส และโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะสีเขียวหนาแน่น ตรวจพบเศษโปรโตพลาสต์แตกมากพอๆกับโปรโต-พลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3) พบโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งตัว (ภาพที่ 4.3 B) ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร KM8P พบโปรโตพลาสต์เกาะกลุ่มในอาหาร ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีหลายลักษณะ ได้แก่ โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลมใส และ โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะสีเขียว พบโปรโตพลาสต์ที่บิ้วเบี้ยวน้อยกว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (ไม่ใส่ NH_4NO_3) และ อาหารสูตร V-KM พบโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งตัว (ภาพที่ 4.3 C) และเมื่อทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เกิดการแบ่งเซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 4.4 A) นอกจากนั้นโปรโตพลาสต์บางเซลล์จะเกิดการรวมตัวกันกลายเป็นกลุ่มโปรโตพลาสต์สีน้ำตาล (ภาพที่ 4.4 B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



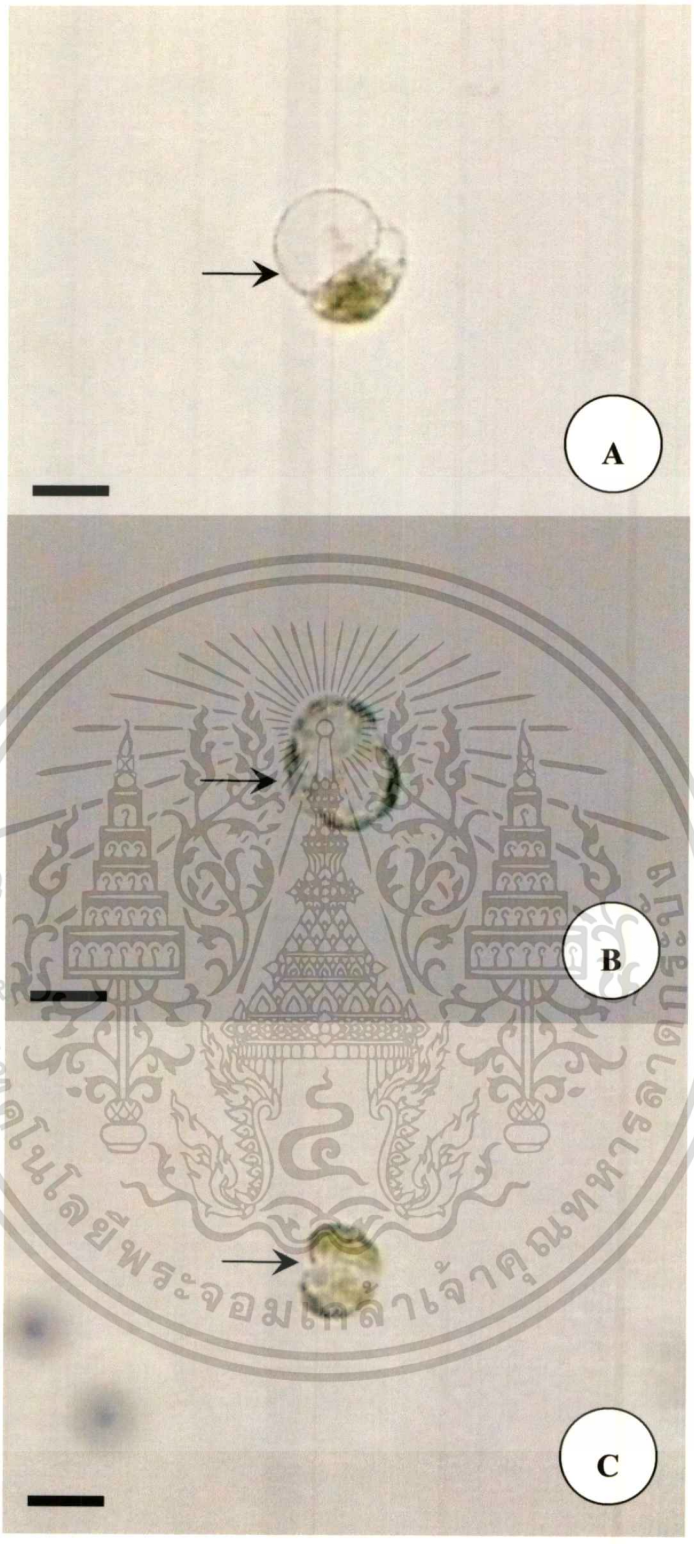
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

A = ลักษณะโปรโตพลาสต์ภายใต้ช่วงแสงปกติ (bar = 50 ไมครอน)

B = ลักษณะโปรโตพลาสต์ ภายใต้ช่วงแสงแบบ phase contrast (bar = 50 ไมครอน)

C = ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ย้อมด้วยสารละลาย FDA โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีเขียว (bar = 50 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



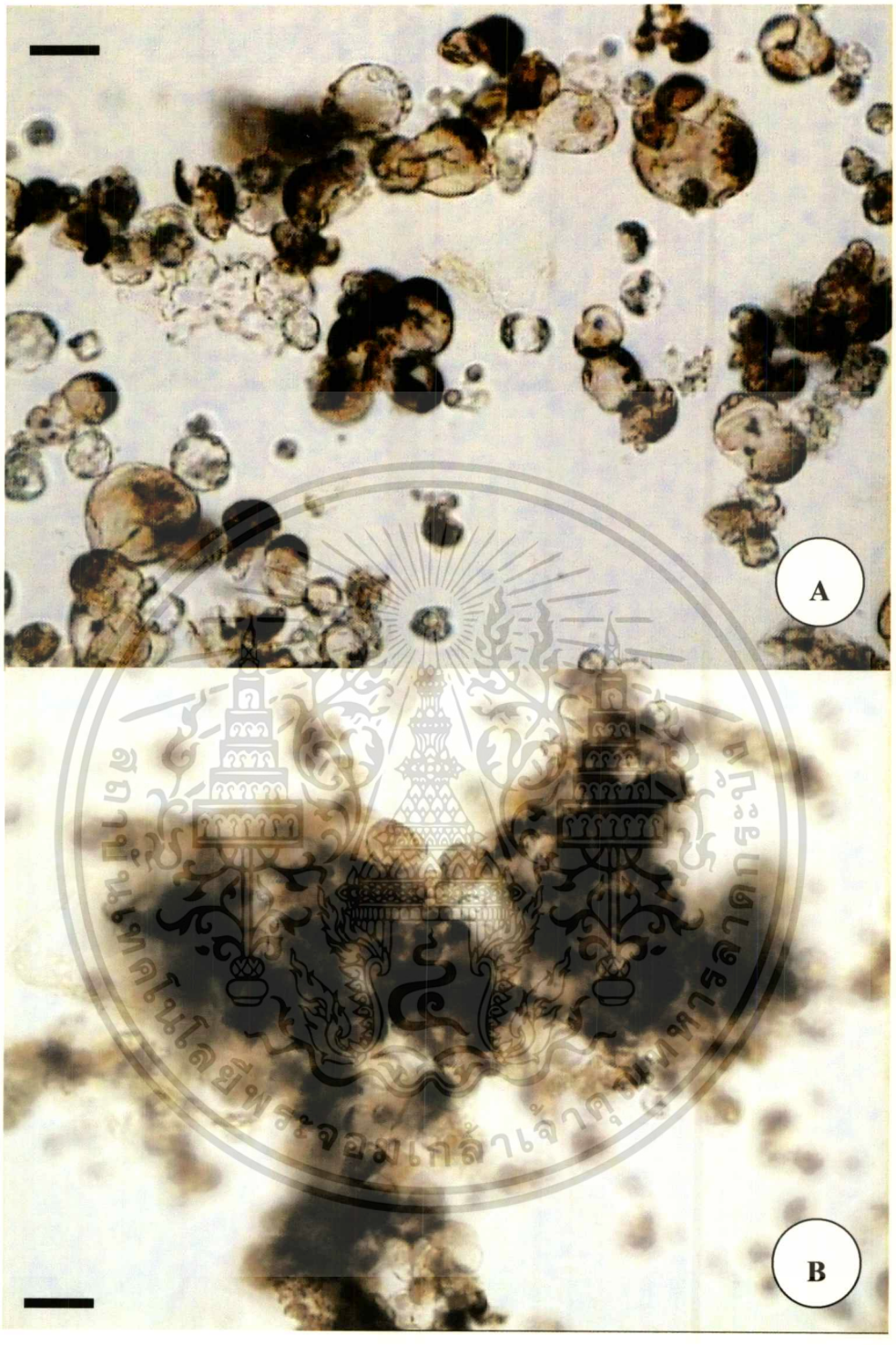
ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน

A = โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ในอาหารสูตร MS (bar = 25 ไมครอน)

B = โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ในอาหารสูตร V-KM (bar = 25 ไมครอน)

C = โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ในอาหารสูตร KM8P (bar = 25 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P (A) หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

A = โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ในอาหารสูตร KM8P (A) (bar = 37.5 ไมครอน)

B = กลุ่มของโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร KM8P (A) (bar = 65 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ระดับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ต่างกัน 6 ระดับ คือ $0.10x10^5$, $0.25x10^5$, $0.50x10^5$, $0.75x10^5$, $1.0x10^5$ และ $2.5x10^5$ ทำการทดลองโดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 3.2.4.2 การทดลองที่ 2.2 หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่า หลังทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีข้างต้นพบว่าได้ โปรโตพลาสต์จำนวน $12.9x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 66.40 เปอร์เซนต์ทำการปรับความหนาแน่นของ โปรโตพลาสต์ให้เป็น 6 ระดับ คือ $0.10x10^5$, $0.25x10^5$, $0.50x10^5$, $0.75x10^5$, $1.0x10^5$ และ $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P (A) ในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 96 ช่องต่อหนึ่งถาดเลี้ยง พบว่า เมื่อใช้ระดับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ต่างกัน ลักษณะการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ที่พบจะแตกต่างกันออกไป โดยเมื่อใช้ ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ระดับ $0.10x10^5$ และ $0.25x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร (ภาพที่ 4.5 A และ B ตามลำดับ) โปรโตพลาสต์ที่พบจะกระจายอยู่ทั่วไปในอาหาร โปรโตพลาสต์ที่กลายเป็นสีน้ำตาล จะเป็น โปรโตพลาสต์เซลล์เดี่ยวๆไม่เกาะติดกันเป็นกลุ่ม ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงระดับความหนาแน่น $0.50x10^5$, $0.75x10^5$, $1.0x10^5$ และ $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร (ภาพที่ 4.5 C , D , E และ F ตามลำดับ) โปรโตพลาสต์ที่พบจะเกาะกลุ่มกันมาก โปรโตพลาสต์ที่กลายเป็นสีน้ำตาล จะเกาะกลุ่มรวมกันเป็นส่วนใหญ่ เมื่อทำการนับเปอร์เซนต์โปรโตพลาสต์ที่กลายเป็นสีน้ำตาลพบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ระดับความหนาแน่น $0.25x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร(ภาพที่ 4.5 B) จะให้เปอร์เซนต์การเกิดสีน้ำตาลของโปรโตพลาสต์น้อยที่สุด คือ 1.48 เปอร์เซนต์ โดยที่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ระดับความหนาแน่น $0.10x10^5$ $0.50x10^5$,$1.0x10^5$, $0.75x10^5$ และ $2.5x10^5$ (ภาพที่ 4.5 A , C , E , D และ F ตามลำดับ) จะให้เปอร์เซนต์การเกิดสีน้ำตาลของโปรโตพลาสต์ 4.82 , 15.31 , 29.75 , 32.72 , 64.85 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ส่วนในด้านโปรโตพลาสต์ที่มีสีเขียว พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ที่ความหนาแน่น $0.25x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร จะให้เปอร์เซนต์การเกิดสีเขียวของโปรโตพลาสต์มากที่สุด คือ 98.52 เปอร์เซนต์ โดยที่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ระดับความหนาแน่น $0.10x10^5$, $0.50x10^5$,$1.0x10^5$, $0.75x10^5$ และ $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิตร จะให้เปอร์เซนต์การเกิดสีน้ำตาลของโปรโตพลาสต์ 95.18 , 84.69 , 70.25 , 67.28 และ 35.15 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาตามลำดับ ลักษณะเซลล์สีน้ำตาลที่พบมีลักษณะขยายใหญ่เพิ่มขึ้นจากเซลล์โปรโตพลาสต์ปกติผนังเซลล์มีสีน้ำตาล บางเซลล์มีลักษณะเหี่ยวย่น เซลล์ที่มีสีน้ำตาลจะเกาะตัวรวมกันเป็นกลุ่มมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งกลุ่มเล็กและกลุ่มใหญ่ พบเซลล์ที่เกาะกลุ่มกระจายอยู่ทั่วไปในอาหาร(ภาพที่ 4.4 A) หลังการเพาะเลี้ยงพบว่าโปรโตพลาสต์มีลักษณะสีน้ำตาลเกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก

ตารางที่ 4.4 แสดงผลของความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเกิดโปรโตพลาสสต์สีน้ำตาล

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์	เปอร์เซ็นต์โปรโตพลาสต์ที่มีสีเขียว(%)	เปอร์เซ็นต์โปรโตพลาสต์ที่มีสีน้ำตาล(%)
$0.10x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร	95.18±1.53 a	4.82+1.53d
$0.25x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร	98.52±0.88 a	1.48±0.88d
$0.50x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร	84.69± 1.97b	15.31±1.97c
$0.75x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร	67.28± 2.57c	32.72 ±2.57b
$1.0x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร	70.25±1.85 c	29.75±1.85b
$2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร	35.15±3.88 d	64.85±3.88 a
F-test	**	**
CV(%)	7.69	23.28

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

การทดลองที่ 2.3 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงทำการทดลองศึกษาอาหารสูตร KM8P 2 ชนิด คือ KM8P(A) และ KM8P(B) โดยทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.2.4.2 การทดลองที่ 2.3 หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่า ได้ โปรโตพลาสต์จำนวน $36.82x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 79.27 เปอร์เซนต์ทำการปรับความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น $1.0x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรหลังจากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปทำการเลี้ยงในอาหารเหลว KM8P 2 ชนิด คือ KM8P(A) และ KM8P(B) แบบ ทินเลเยอร์ในจานเลี้ยงพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 65 มิลลิเมตร พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร KM8P(A) จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 วัน โดยจะพบว่าโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ สองแบบคือแบบเท่ากัน(equal division , ภาพที่ 4.8 A) และแบบแตกหน่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว (budding division with single cell , ภาพที่ 4.9 A) โดยโปรโต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเท่ากันนั้นจะมีลักษณะกลมเซลล์มีการแบ่งเป็นสองข้างเท่ากันโดยจะมีคลอโรพลาสต์แยกกันอยู่ตรงข้ามกันส่วนตรงกลางที่ติดกันจะมีลักษณะใสเห็นไซโตพลาสซึมขนาดใหญ่ ส่วนการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ลักษณะทั่วไปพบได้หลายแบบเช่นจะมีลักษณะแตกหน่อแบบทั้งสองเซลล์เท่ากัน และ แตกหน่อแบบทั้งสองเซลล์ไม่เท่ากันโดยการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อทั้งสองแบบ โปรโตพลาสต์จะมีลักษณะใสเห็นไซโตพลาสซึมขนาดใหญ่มีคลอโรพลาสต์อยู่ด้านเดี่ยวส่วนอีกด้านหนึ่งจะมีลักษณะใสตรงกลางมีการคอดของเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์ที่แบ่งตัว

ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบในจานเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะเกาะตัวกันเป็นกลุ่มหลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 1 วันโดยจะเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มใหญ่อยู่ตรงกลางจานเพาะเลี้ยง(ภาพที่ 4.6 A) เมื่อทดลองเขย่าจานเพาะเลี้ยงเบาๆ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เกาะกันอยู่จะกระจายออกกลายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หลังจากนั้นเซลล์เดี่ยวเหล่านี้จะกลับมาเกาะกลุ่มอยู่อย่างเดิม โดยเซลล์ที่เกาะกลุ่มจะมีจำนวนเซลล์ที่เกาะกลุ่มเพิ่มมากขึ้นส่วนเซลล์ที่ไม่เกาะกลุ่มจะเริ่มกลายเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยง ประมาณ 3 วัน เซลล์ที่เกาะกลุ่มกันจะมีการเกาะกลุ่ม แบบไม่แน่นอน คือ บางกลุ่มเกาะกันเป็นวงกลม บางกลุ่มเกาะกันเป็นแฉก และจะเริ่มกลายเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลาประมาณ 5 วัน โดยส่วนใหญ่จะเริ่มกลายเป็นสีน้ำตาลจากด้านนอกก่อนจากนั้นเซลล์ที่อยู่จะเริ่มกลายเป็นสีน้ำตาลจนกระทั่ง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ทั้งกลุ่มจะกลายเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด(ภาพที่ 4.6 B) แต่กลุ่มเซลล์จะไม่แตกตัวออกจากกัน

ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรKM8P(B)จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 วัน(ภาพที่ 4.7 A) โดยจะพบว่าโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์หลายแบบ คือ การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน (equal division , ภาพที่ 4.8 A) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ(budding division with multiple cells , ภาพที่ 4.8 B) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว (budding division with single cell , ภาพที่ 4.9 A) และ การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (changed form division , ภาพที่ 4.9 B) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบในจานเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะเกาะตัวกันเป็นกลุ่มหลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 1 วันโดยจะเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มใหญ่อยู่ตรงกลางจานเพาะเลี้ยง โดยลักษณะการเกาะกลุ่มของเซลล์เหมือนกับโปรโตพลาสต์ที่พบใน อาหารสูตร KM8P(A) แต่กลุ่มของโปรโตพลาสต์ยังคงมีสีเขียว (ภาพที่ 4.7 B)

การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเท่ากันนั้นจะแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเฉพาะบางเซลล์ ส่วนบางเซลล์จะไม่มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นโดยโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเท่ากันนั้นจะมีลักษณะกลม เซลล์มีการแบ่งเป็นสองข้างเท่ากันโดยจะมีคลอโรพลาสต์แยกกันอยู่ตรงข้ามกันส่วนตรงกลางที่ติดกันจะมีลักษณะใสเห็นไซโตพลาสซึมขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

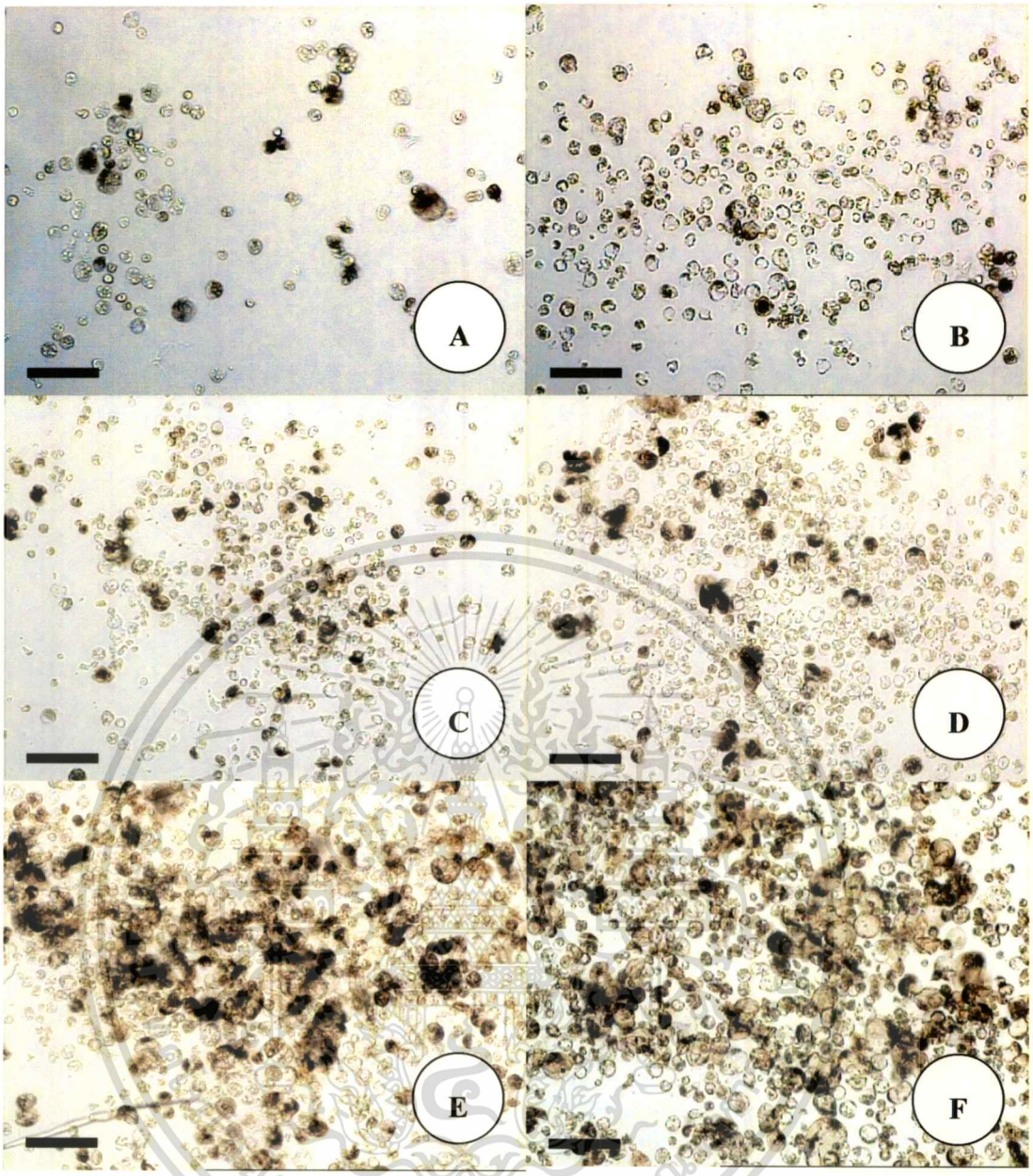
การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ลักษณะทั่วไปพบได้หลายแบบเช่นจะมีลักษณะแตกหน่อแบบทั้งสองเซลล์เท่ากัน และ แตกหน่อแบบทั้งสองเซลล์ไม่เท่ากันโดยการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อทั้งสองแบบ โปรโตพลาสต์จะมีลักษณะใสเห็นไซโตพลาสซึมขนาดใหญ่มีคลอโรพลาสต์อยู่ด้านเดี่ยวส่วนอีกด้านหนึ่งจะมีลักษณะใสตรงกลางมีการคอดของเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์ที่แบ่งตัว

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อโดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อนั้นบางเซลล์จะแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีกและในขณะที่บางเซลล์จะมีการแตกออกของโปรโตพลาสต์นอกจากนั้นบางเซลล์ส่วนที่แตกหน่อออกมาจะยื่นยาวออกในลักษณะคล้ายรากหรือหนามโดยในเซลล์ที่แตกหน่อเพิ่มมากขึ้นจะพบว่ามีโปรโตพลาสต์ขนาดเล็ก มาเกาะติดรอบๆบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อ ลักษณะสีของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อจะมีสีขาวขุ่นบางครั้งมีสีดำเจืออยู่บาง ไม่มีคลอโรพลาสต์ ปลายที่ยืนยาวออกไปส่วนใหญ่มีสีดำลักษณะเรียวเล็ก

การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา ประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างนั้นส่วนใหญ่จะมีขนาดและรูปร่างที่ไม่แน่นอน บางเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลม บางเซลล์มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม บางเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์แขวนลอย เซลล์เหล่านี้มีคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ เซลล์มีลักษณะสีขาวใสปนจุดสีเขียวของคลอโรพลาสต์ บางเซลล์มีลักษณะบิดเบี้ยวไม่เป็นทรงกลมเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่ฉีกขาด

ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบในจานเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะแยกกระจายอยู่ทั่วไปในจาเพาะเลี้ยงพบโปรโตพลาสต์ที่เกาะกลุ่มไม่มากเท่า โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหาร KM8P(A)โปรโตพลาสต์ที่พบมีลักษณะกลมมีสีเขียวพบโปรโตพลาสต์ที่กลายเป็นสีน้ำตาลน้อยกว่าที่เลี้ยงในอาหารKM8P(A) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันไม่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น แต่เซลล์ยังคงมีสีเขียว ส่วนโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อพบว่าบางเซลล์มีการแตกออกของโปรโตพลาสต์ทำให้อาหารมีเศษคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ ทั่วไป ในด้านโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อหลายหน่อมีการพัฒนาขึ้นโดยบางเซลล์จะมีขนาดและจำนวนจุดที่มีการแตกหน่อเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่บางเซลล์ หน่อที่แตกออกบางส่วนยืดยาวออกมา มีสีขาวใส ส่วนโปรโตพลาสต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพบว่าไม่มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นแต่พบว่ามีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ยังคงมีสีเขียวและมีคลอโรพลาสต์กระจายกันอยู่ภายในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นระดับต่างๆ

A = เลี้ยงที่ความหนาแน่น 0.10×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร(bar = 100 ไมครอน)

B = เลี้ยงที่ความหนาแน่น 0.25×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร(bar = 100 ไมครอน)

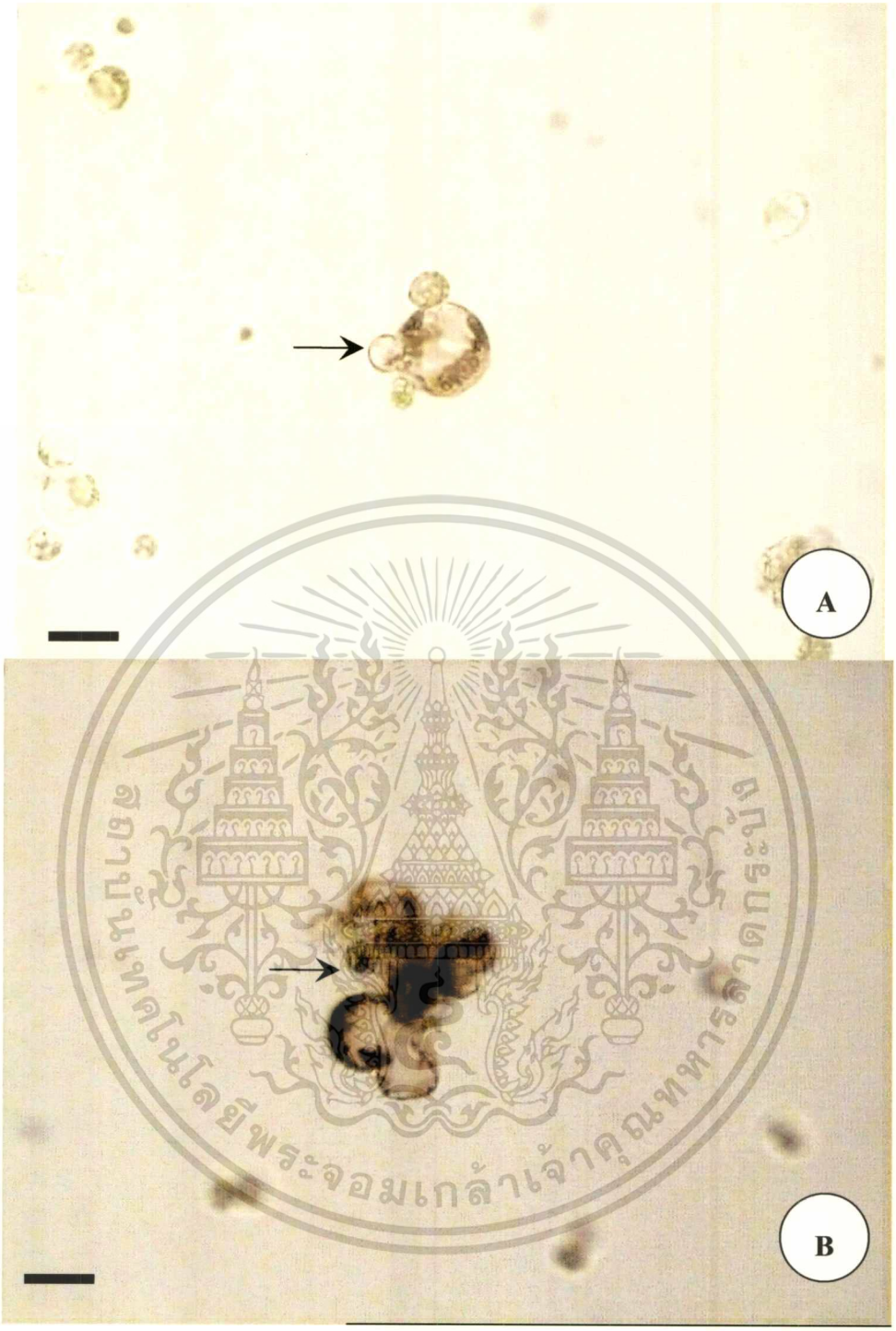
C = เลี้ยงที่ความหนาแน่น 0.50×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร(bar = 100 ไมครอน)

D = เลี้ยงที่ความหนาแน่น 0.75×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร(bar = 100 ไมครอน)

E = เลี้ยงที่ความหนาแน่น 1.00×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร(bar = 100 ไมครอน)

F = เลี้ยงที่ความหนาแน่น 2.50×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร(bar = 100 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

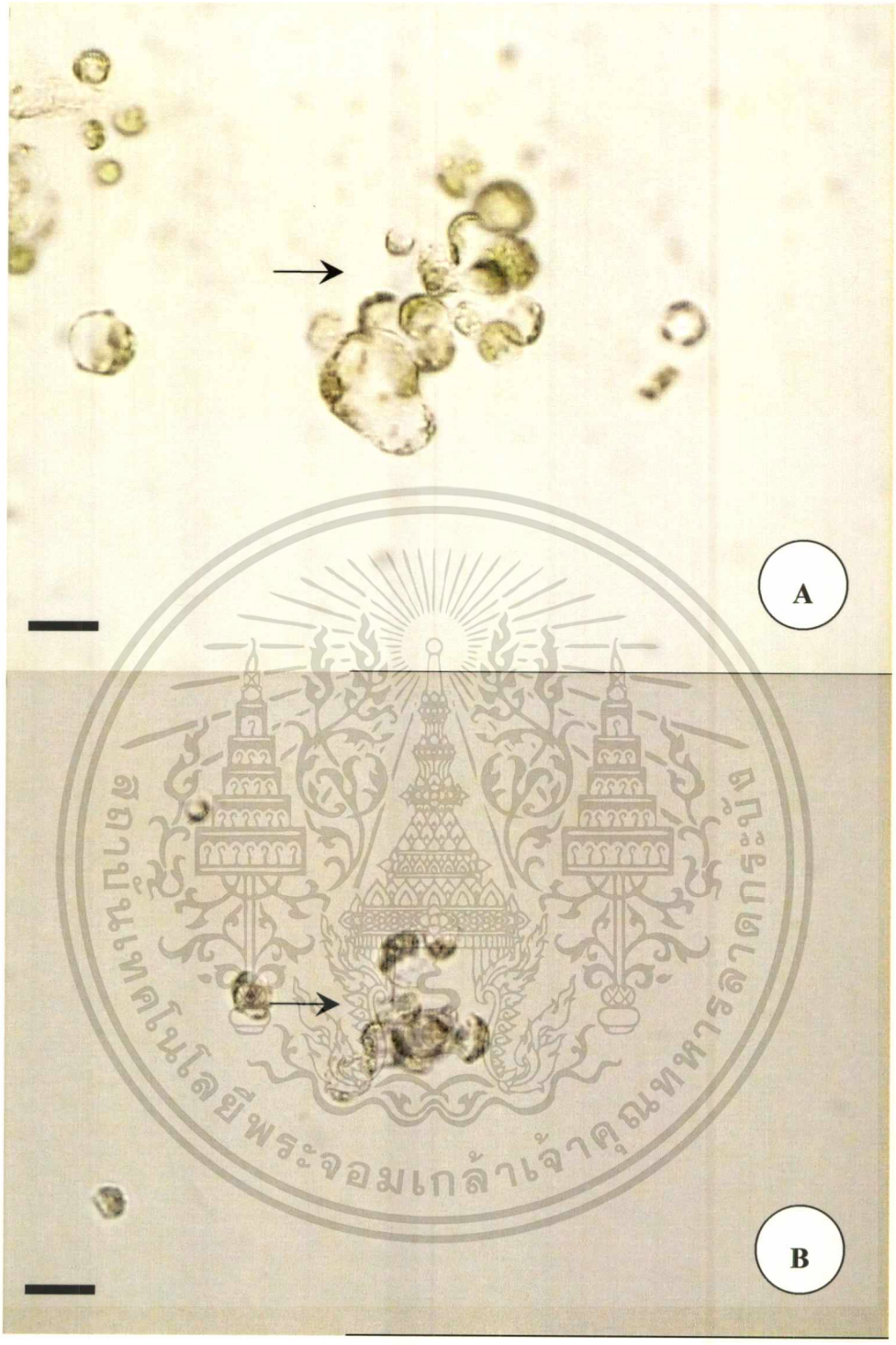


ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P (A)

A = โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ในอาหารสูตร KM8P (A)หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน(bar = 37.5 ไมครอน)

B = กลุ่มของโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร KM8P (A)หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน(bar = 37.5 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P (B)

A = โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ในอาหารสูตร KM8P (B)หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน (bar = 37.5 ไมครอน)

B = กลุ่มของโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร KM8P (B)หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (bar = 37.5 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง ทำการทดลองโดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.2.4.3 การทดลองที่ 3.1 หลังจากนั้นทำการย้อมสี โปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่า หลังทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีข้างต้นพบว่าได้ โปรโตพลาสต์จำนวน $24.00x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 74.67 เปอร์เซนต์ทำการปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น $0.25x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 96 ช่อง พบว่า เกิดการแบ่งเซลล์ในลักษณะต่างๆ คือ การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน (ภาพที่ 4.8 A) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ(ภาพที่ 4.8B) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว (ภาพที่ 4.9 A) และการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (ภาพที่ 4.9 B)

การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโต-พลาสต์ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.78 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 , 0.5 , 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 0.70 , 0.65 , 0.54 และ 0.35 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่าการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.87 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.8 , 1.0 , 0.4 , 0.2 และ 0.0 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 0.69 , 0.66 , 0.51 , 0.47 , 0.41 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2,4-D 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.6 มิลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2-3 วัน หลังจากนั้นพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเท่ากันนั้นจะแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเฉพาะบางเซลล์ ส่วนบางเซลล์จะไม่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ยมากที่สุดคือ 2.69 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 , 1.0 , 1.5 และ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ย 2.51 , 2.48 , 2.41 และ 2.12 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดย พบว่าระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.00 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 0.2 , 0.4 , 0.8 และ 0.6 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ย 2.98 , 2.50 , 2.26 , 2.02 , 1.89 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์พบว่าพบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.0 มิลิกรัมต่อลิตร

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อนั้น บางเซลล์จะแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีก และในขณะที่บางเซลล์จะมีการแตกออกของโปรโตพลาสต์ นอกจากนั้นบางเซลล์ส่วนที่แตกหน่อออกมาจะยื่นยาวออกในลักษณะคล้ายรากหรือหนาม โดยในเซลล์ที่แตกหน่อเพิ่มมากขึ้นจะพบว่ามีโปรโตพลาสต์ขนาดเล็ก มาเกาะติดรอบๆบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อ ลักษณะสีของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อจะมีสีขาวขุ่นบางครั้งมีสีดำเจืออยู่บาง ไม่มีคลอโรพลาสต์ ปลายที่ยื่นยาวออกไปส่วนใหญ่มีสีดำลักษณะเรียวเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่าผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อของ โปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเฉลี่ยมากที่สุดคือ 6.55 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 2.0 , 1.5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ย 5.81 , 5.76 , 5.33 และ 5.20 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเฉลี่ยมากที่สุด คือ 6.03 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 0.4 , 0.2 , 1.0 และ 0.0 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 6.02 , 6.01 , 5.96 , 5.66 , 4.70 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อของโปรโตพลาสต์พบว่า โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อมากที่สุด คือ 2,4-D 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลิกรัมต่อลิตร

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อนั้นส่วนใหญ่หน่อที่แตกออกไปจะมีขนาดที่ไม่แน่นอน บางเซลล์หน่อที่แตกออกไปมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เดิม ในขณะที่บางเซลล์หน่อที่แตกออกไปมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดิม เซลล์ที่แตกหน่อ บางเซลล์มีขนาดเล็ก โดยเมื่อ โปรโตพลาสต์มีการแตกหน่อ คลอโรพลาสต์จะรวมอยู่ในด้านตรงข้ามกับหน่อที่แตกออกไป ลักษณะสีของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อจะมีสีขาวใสบางครั้งมีสีดำเจืออยู่บาง ไม่มีคลอโรพลาสต์ พบ เซลล์ข้างเคียงเกาะติดอยู่บ้าง แต่ส่วนใหญ่จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ

การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ โปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุดคือ 2.63 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 , 0.0 , 1.0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉลี่ย 1.90 , 1.86 , 1.84 และ 1.83 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2.32 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 0.4 , 0.2 , 1.0 และ 0.0 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉลี่ย 6.02 , 6.01 , 5.96 , 5.66 , 4.70 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์พบว่า เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดย พบว่า ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉลี่ยมากที่สุด คือ 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.2 มิลิกรัมต่อลิตร

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา ประมาณ 2 วัน หลังจากนั้น พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างนั้นส่วนใหญ่จะมีขนาดและรูปร่างที่ไม่แน่นอน บางเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลม บางเซลล์มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม บางเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์แขวนลอย เซลล์เหล่านี้มีคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ เซลล์มีลักษณะสีขาวใสปนจุดสีเขียวของคลอโรพลาสต์ บางเซลล์มีลักษณะบิดเบี้ยวไม่เป็นทรงกลมเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่ฉีกขาด

การแบ่งเซลล์ทั้งหมด

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นโดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุดคือ 11.74 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 , 0.0 , 2.0 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 10.93 , 10.59 , 10.55 และ 10.23 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 11.21 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 , 0.2 , 0.8 , 0.6 และ 0.0 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 11.11 , 11.09 , 10.80 , 10.71 และ 9.85 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์พบว่า เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 13.41 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
		แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์ทั้งหมด
2,4-D	0.0	0.78±0.43	2.12±0.85	5.81±1.89	1.86±0.77	10.59±2.23
	0.5	0.65±0.45	2.69±0.88	6.55±1.83	1.82±0.55	11.74±2.05
	1.0	0.70±0.51	2.47±0.81	5.20±1.87	1.83±0.62	10.23±2.19
	1.5	0.54±0.33	2.41±1.18	5.33±1.86	2.62±0.97	10.93±2.14
	2.0	0.35±0.41	2.51±1.01	5.76±2.12	1.90±1.00	10.55±2.20
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
BA	0.0	0.41± 0.24	2.98±0.89	4.70±1.84	1.74±0.71	9.85±2.11
	0.2	0.47± 0.47	2.49±0.83	5.96±1.91	2.17±1.12	11.09±2.25
	0.4	0.51± 0.36	2.26±0.73	6.01±2.41	2.32±0.88	11.11±2.47
	0.6	0.87± 0.47	1.88±0.74	6.02±1.77	1.90±0.93	10.71±1.82
	0.8	0.69± 0.50	2.02±0.97	6.02±1.79	2.04±0.56	10.80±2.11
	1.0	0.66± 0.44	3.00±1.32	5.67±1.77	1.86±0.56	11.21±2.28
F-test		ns	ns	ns	ns	ns

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

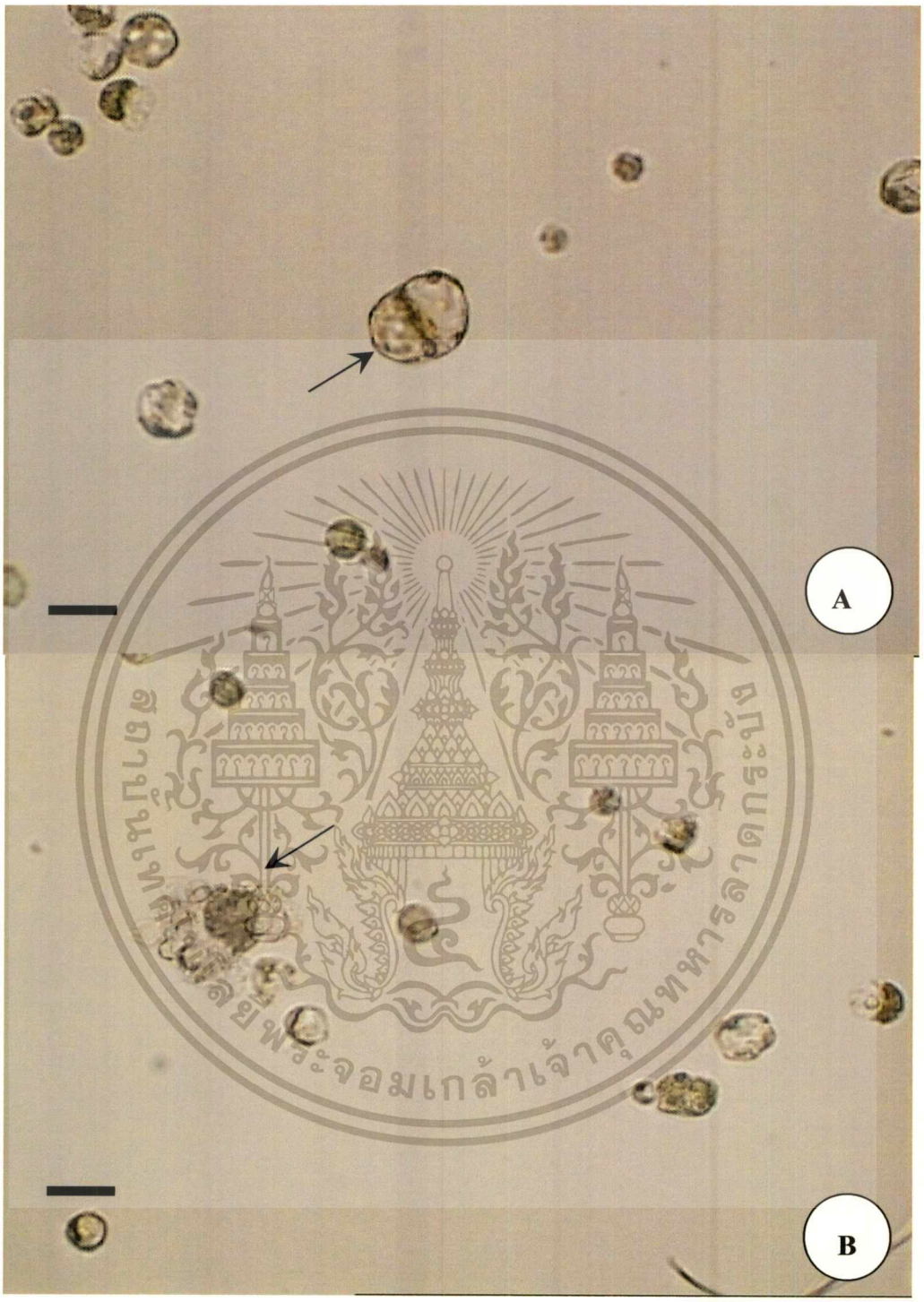
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)				จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
				แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์ทั้งหมด
2,4-D	0.0	BA	0.0	0.48±0.19	3.69±0.93	3.38±1.86	1.57±1.00	9.12±1.56
			0.2	0.00±0.00	2.68±0.84	7.40±0.93	0.77±0.11	10.85±0.77
			0.4	1.01±0.16	1.67±0.90	4.52±2.43	3.31±0.89	10.51±1.40
			0.6	1.49±0.32	1.76±0.53	6.47±1.89	1.06±0.69	10.77±1.39
			0.8	1.21±0.59	1.87±1.03	7.72±1.64	2.01±0.42	12.80±1.71
			1.0	0.53±0.53	1.11±0.64	5.40±2.58	2.46±0.59	9.50±1.68
2,4-D	0.5	BA	0.0	0.36±0.36	4.36±1.07	7.07±2.35	1.61±0.40	13.41±1.13
			0.2	1.10±0.76	2.39±0.62	6.27±2.98	1.57±0.45	11.32±1.71
			0.4	0.00±0.00	2.66±0.71	6.63±1.51	2.65±0.44	11.95±1.12
			0.6	0.88±0.45	1.54±0.97	7.44±1.66	2.21±0.71	12.07±1.64
			0.8	0.84±0.50	1.51±0.52	5.90±2.12	1.97±0.65	10.22±1.06
			1.0	0.76±0.39	3.71±0.14	6.03±1.94	0.96±0.43	11.46±1.30
2,4-D	1.0	BA	0.0	0.27±0.27	3.20±0.62	3.08±1.54	1.27±0.37	7.83±1.10
			0.2	0.00±0.00	2.65±1.37	5.26±1.73	2.30±1.45	10.21±1.21
			0.4	0.63±0.63	1.27±0.41	7.50±3.65	2.09±0.48	11.49±2.46
			0.6	1.11±0.79	3.05±0.57	4.13±1.78	1.25±0.24	9.55±0.89
			0.8	1.11±0.69	2.57±1.18	5.30±1.29	2.32±0.23	11.30±1.41
			1.0	1.11±0.06	2.15±0.52	5.94±0.77	1.78±0.37	10.97±0.75
2,4-D	1.5	BA	0.0	0.50±0.25	1.33±0.36	5.68±2.29	2.45±0.48	9.96±1.43
			0.2	0.97±0.54	1.47±0.82	4.17±2.16	4.13±0.83	10.74±1.36
			0.4	0.67±0.34	3.55±0.64	5.10±1.49	2.45±1.56	11.77±1.30
			0.6	0.38±0.38	1.31±0.90	6.83±2.39	2.50±1.50	11.01±1.04
			0.8	0.35±0.35	2.78±1.69	5.14±2.59	1.93±0.72	10.21±1.73
			1.0	0.44±0.24	4.07±1.78	5.08±1.70	2.29±0.58	11.87±1.68
2,4-D	2.0	BA	0.0	0.47±0.27	2.36±0.44	4.31±1.24	1.81±1.28	8.96±0.60
			02	0.35±0.35	3.32±0.53	6.74±2.24	2.12±1.62	12.53±2.11
			0.4	0.29±0.29	2.19±0.52	6.32±3.77	1.12±0.66	9.93±1.66
			0.6	0.55±0.31	1.80±0.76	5.25±1.78	2.52±1.31	10.13±0.78
			0.8	0.00±0.00	1.42±0.48	6.08±2.21	2.00±1.00	9.49±0.54
			1.0	1.18±0.80	3.99±2.20	5.90±2.77	1.85±0.71	12.26±1.85
F-test				ns	ns	ns	ns	Ns
CV (%)				22.13	21.61	14.25	21.61	9.91

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ns ไม่มีความแตกต่างกันทาง * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

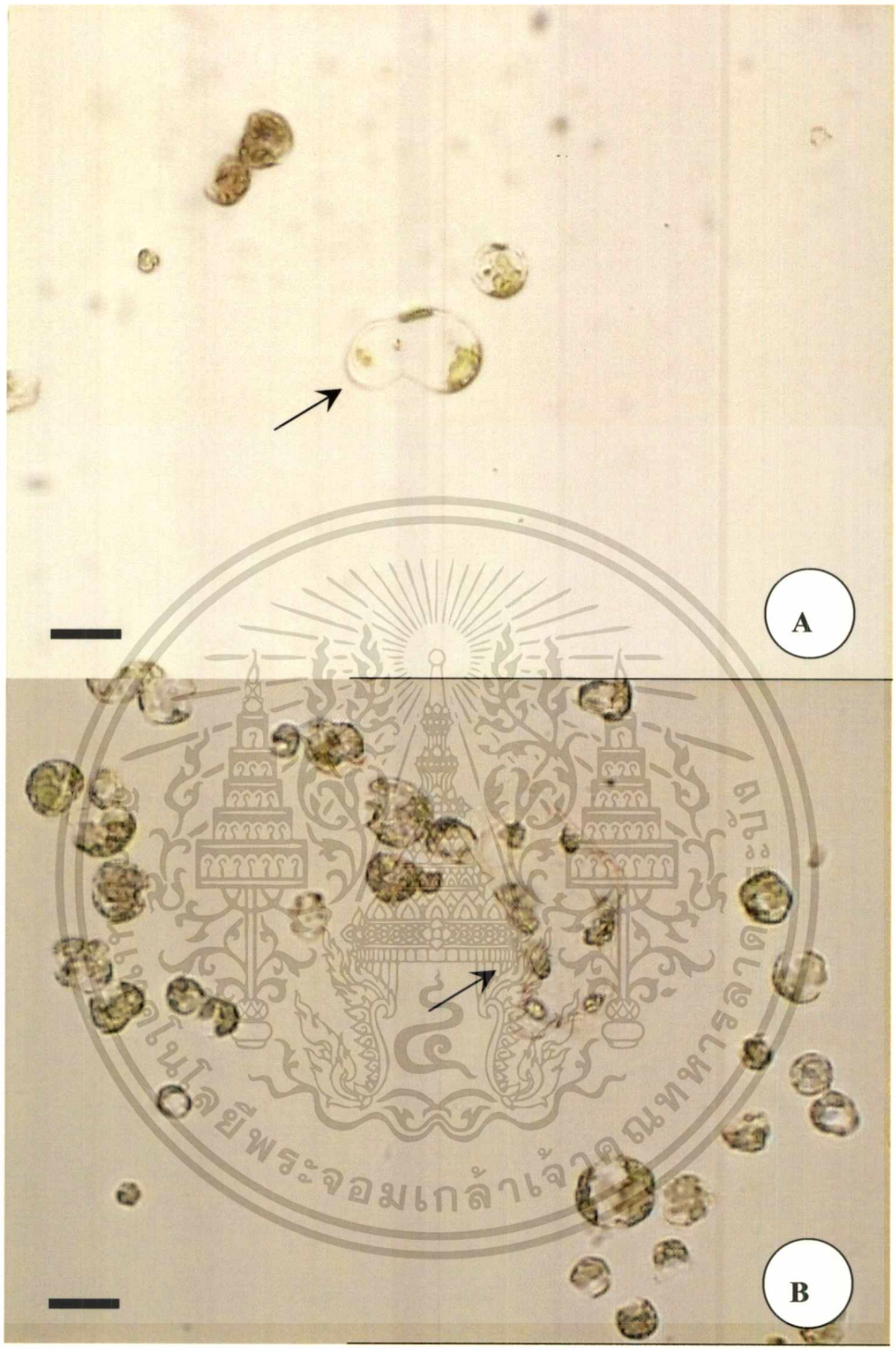


ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์แบบต่างๆ

A = แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน (bar = 37.5 ไมครอน)

B = แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ(bar = 37.5 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์แบบต่างๆ

A = แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว(bar = 37.5ไมครอน)

B = แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนรูปร่าง (bar = 37.5 ไมครอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง ทำการทดลองโดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.2.4.3 การทดลองที่ 3.2 หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่าหลังทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีข้างต้นพบว่าได้ โปรโตพลาสต์จำนวน $24.00x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 74.67 เปอร์เซนต์ทำการปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น $0.25x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 96 ช่อง พบว่า เกิดการแบ่งเซลล์ในลักษณะต่างๆ คือ การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน (ภาพที่ 4.8 A) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ(ภาพที่ 4.8 B) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว (ภาพที่ 4.9 A) และการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (ภาพที่ 4.9 B)

การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.63 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 0.54 , 0.53 , 0.40 และ 0.38 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.70 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 , 0.01 , 0.05 , 0.10 และ 0.00 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 0.59 , 0.56 , 0.44 , 0.39 , 0.31 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์พบว่าพบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุด คือ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.25 มิลิกรัมต่อลิตรโดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 1.18 เปอร์เซนต์ รองลงมา คือ2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับ TDZ 0.01 และ 0.10 มิลิกรัมต่อลิตรโดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย 1.18 และ 1.16 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีลักษณะคล้ายกับการกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อในการทดลองที่ 3.1

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.44 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 , 0.0 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 3.17 , 2.85 , 2.74 และ 2.57 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุด คือ 3.42 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 , 0.25 , 0.00 , 0.01 และ 0.05 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 2.98 , 2.50 , 2.26 , 2.02 , 1.89 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุด คือ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.50มิลิกรัมต่อลิตรโดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ4.52 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.05 มิลิกรัมต่อลิตรโดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน 4.47 เปอร์เซนต์

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีลักษณะคล้ายกับการกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อในการทดลองที่ 3.1

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุดคือ 6.05 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 , 1.5 , 0.0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 5.81 , 5.76 , 5.33 และ 5.20 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุด คือ 6.38 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 , 0.00 , 0.01 , 0.25 และ 0.50 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว เดียว 5.56 , 5.42 , 5.36 , 5.22 , 4.89 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุด คือ 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.05 มิลิกรัมต่อลิตรโดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 7.49 เปอรเซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.05 มิลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 6.60 เปอร์เซนต์โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3.1

การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ โปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ 1.78 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 1.5 , 1.0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 1.64 , 1.54 , 1.34 และ 0.95 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ 1.67 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 , 0.4 , 0.8 , 0.0 และ 0.6 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 1.60 , 1.51 , 1.43 , 1.32 , 1.16 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์พบว่า พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.25 มิลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ 2.86 โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเริ่มแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อเลี้ยงในอาหารจะมีการแบ่งเซลล์เหมือนกับการทดลองที่ 3.1

การแบ่งเซลล์ทั้งหมด

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ 2,4-D ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโต-พลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุดคือ 11.30 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 , 0.0 , 1.5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 10.68 , 10.21 , 9.99 และ 9.76 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 10.77 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 , 0.25 , 0.50 , 0.01 และ 0.00 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 10.73 , 10.53 , 10.53 , 10.05 และ 9.87 เปอร์เซนต์ตามลำดับ(ตารางที่ 4.6)

เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์พบว่า เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 12.69 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี 2,4-D ร่วมกับ TDZ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
		แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์รวมทั้งหมด
2,4-D	0.0	0.63±0.35	2.86±0.90	5.07±1.48	1.63±0.53	10.21±1.66
	0.5	0.54±0.32	3.44±0.64	4.82±1.25	0.95±0.60	9.76±1.29
	1.0	0.53±0.36	2.74±0.75	6.05±1.14	1.34±0.83	10.68±1.16
	1.5	0.40±0.20	2.57±0.96	5.47±1.28	1.54±0.78	9.99±1.13
	2.0	0.38±0.26	3.17±1.02	5.94±1.53	1.78±0.94	11.30±1.67
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
TDZ	0.00	0.31±0.22	2.81±0.62	5.42±1.40	1.32±0.74	9.87±1.34
	0.01	0.56±0.30	2.51±0.79	5.36±1.52	1.60±0.82	10.05±1.61
	0.05	0.44±0.33	2.43±1.21	6.38±0.83	1.51±0.72	10.77±1.85
	0.10	0.70±0.35	3.29±0.81	5.56±1.54	1.16±0.66	10.73±1.37
	0.25	0.58±0.36	3.27±0.81	5.22±1.36	1.43±0.78	10.53±1.12
	0.50	0.39±0.22	3.42±0.78	4.89±1.36	1.67±0.88	10.38±1.16
F-test		ns	ns	ns	ns	ns

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)				จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
				แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์รวมทั้งหมด
2,4-D	0.0	TDZ	0.00	0.59±0.32	3.36±0.15	5.65±2.58	0.83±0.26	10.43±1.47
			0.01	0.33±0.17	2.02±0.59	4.84±1.35	2.71±0.66	9.90±0.89
			0.05	0.80±0.55	1.93±1.55	6.28±0.99	1.55±0.42	10.56±1.48
			0.10	0.76±0.07	3.55±0.98	5.13±2.22	1.61±0.56	11.05±1.33
			0.25	1.02±0.55	3.42±0.42	4.20±1.51	1.40±0.30	10.04±0.56
			0.50	0.33±0.33	2.87±1.27	4.37±0.68	1.73±0.61	9.29±0.50
2,4-D	0.5	TDZ	0.00	0.24±0.24	3.21±0.52	5.07±1.04	1.25±0.91	9.76±0.69
			0.01	0.26±0.26	3.67±0.45	4.23±1.24	0.13±0.13	8.29±0.76
			0.05	0.37±0.37	2.23±1.10	5.17±1.06	0.77±0.49	8.54±0.88
			0.10	1.19±0.30	3.43±0.60	4.92±0.94	1.17±0.94	10.71±0.29
			0.25	0.59±0.41	3.59±0.14	4.72±1.96	1.64±0.49	10.54±0.74
			0.50	0.61±0.21	4.52±0.23	4.84±2.12	0.76±0.39	10.73±1.10
2,4-D	1.0	TDZ	0.00	0.19±0.19	2.95±0.30	5.37±1.75	0.69±0.42	9.21±0.67
			0.01	1.18±0.31	1.76±0.61	6.54±1.23	1.55±0.92	11.03±0.74
			0.05	0.28±0.28	1.50±0.60	6.61±0.26	1.88±1.05	10.28±0.50
			0.10	1.17±0.45	3.31±0.95	6.03±1.64	1.41±0.80	11.91±0.84
			0.25	0.40±0.21	3.29±0.44	5.95±1.14	0.40±0.21	10.04±0.70
			0.50	0.00±0.00	3.65±0.96	5.82±1.35	2.12±1.37	11.59±0.73
2,4-D	1.5	TDZ	0.00	0.45±0.23	2.24±1.17	5.23±1.28	2.54±1.03	10.46±0.88
			0.01	0.46±0.24	1.78±0.72	4.84±1.15	1.95±0.82	9.04±0.30
			0.05	0.51±0.26	2.02±1.01	7.50±0.39	1.75±1.15	11.78±0.40
			0.10	0.24±0.24	2.75±0.81	5.95±1.72	0.24±0.24	9.18±0.81
			0.25	0.23±0.23	3.88±1.53	4.68±1.79	0.88±0.53	9.67±0.71
			0.50	0.54±0.14	2.78±0.68	4.62±1.27	1.89±0.28	9.82±0.76
2,4-D	2.0	TDZ	0.00	0.12±0.12	2.29±0.64	5.80±1.07	1.31±0.77	9.51±0.33
			0.01	0.58±0.32	3.37±1.09	6.36±2.79	1.70±0.98	12.00±1.60
			0.05	0.24±0.24	4.47±1.58	6.36±1.04	1.61±0.61	12.69±1.73
			0.10	0.18±0.18	3.42±1.25	5.79±2.16	1.39±0.76	10.78±0.71
			0.25	0.72±0.41	2.18±1.03	6.57±0.54	2.87±1.36	12.33±0.59
			0.50	0.48±0.25	3.32±0.51	4.82±1.96	1.86±1.52	10.48±0.28
F-test				ns	ns	ns	ns	Ns
CV (%)				14.70	16.88	13.93	21.81	8.75

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ns ไม่มีความแตกต่างกันทาง * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง ทำการทดลองโดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.2.4.3 การทดลองที่ 3.3 หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่าหลังทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีข้างต้นพบว่าได้ โปรโตพลาสต์จำนวน $24.00x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 74.67 เปอร์เซนต์ทำการปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น $0.25x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 96 ช่องพบว่า เกิดการแบ่งเซลล์ในลักษณะต่างๆ คือ การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน (ภาพที่ 4.8 A) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ(ภาพที่ 4.8 B) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว (ภาพที่ 4.9 A) และการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (ภาพที่ 4.9 B)

การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ NAA ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุดคือ 0.68 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 , 0.0 , 1.5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน 0.66 , 0.46 , 0.39 และ 0.25 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุด คือ 0.71 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 0.8 , 1.0 , 0.0 และ 0.2มิลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน 0.65., 0.61 , 0.43 , 0.29 , 0.24 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์พบว่า พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุด คือ NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลิกรัมต่อลิตร โดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน 1.13 เปอร์เซนต์ รองลงมา คือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.4 และ 0.8 มิลิกรัมต่อลิตร โดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.11 และ 1.03เปอร์เซนต์ตามลำดับโดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีลักษณะคล้ายกับการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันในการทดลองที่ 3.1

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทาง โดยที่ระดับความเข้มข้นของ NAA ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุดคือ 3.50เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 1.5 , 1.0 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเฉลี่ย 3.30 , 3.28 , 2.98 และ 2.85 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยพบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุด คือ 3.61 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 0.2 , 0.4 , 1.0 และ 0.8 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 3.42 , 3.42 , 3.12 , 3.04 , 2.48 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุด คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.6 มิลิกรัมต่อลิตรโดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 4.81 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.0 มิลิกรัมต่อลิตรโดยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 4.81 เปอร์เซนต์

โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะมีลักษณะคล้ายกับการกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อในการทดลองที่ 3.1

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุดคือ 6.54 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 , 1.0 , 0.5 และ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว หลายหน่อ 6.05 , 5.47 , 5.46 และ 5.18 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 3 ถึง วันที่ 14 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยที่ได้จากทั้ง 3 วัน พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโดยพบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว เฉลี่ยมากที่สุด คือ 6.74 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 1.0 , 0.2 , 0.0 และ 0.4 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว เฉลี่ย 6.36 , 5.88 , 5.48 , 5.15 , 4.83 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์พบว่า เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุด คือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลิกรัมต่อลิตรโดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 9.15 เปอรเซนต์ รองลงมาคือ NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลิกรัมต่อลิตรโดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 7.4 เปอรเซนต์ โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3

การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ โปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยที่ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุดคือ 1.98 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 2.0 , 1.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 1.86 , 1.54 , 1.18 และ 1.06 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นพบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 มิลิกรัมต่อลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ0.6 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นของ 0.4 , 0.8 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งมีค่าเฉลี่ยสูงรองลงมาตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ NAA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3

การแบ่งเซลล์ทั้งหมด

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NAA ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุดคือ 12.28 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 , 0.0 , 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 10.92 , 10.83 , 10.56 และ 10.19 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 11.51 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 0.0 , 0.2 , 0.4 และ 1.0 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 11.35, 11.18 , 10.65 , 10.60 และ 10.44 เปอร์เซนต์ตามลำดับ(ตารางที่ 4.7)

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์พบว่า เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 14.90 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี NAA ร่วมกับ BA

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
		แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์รวมทั้งหมด
NAA	0.0	0.46±0.38	3.31±0.72	5.18±1.09	1.86±1.08	10.83±1.10b
	0.5	0.26±0.24	2.85±0.74	5.46±1.62	1.98±0.85	10.56±1.40b
	1.0	0.66±0.35	2.98±1.04	5.47±1.61	1.06±0.61	10.19±1.84b
	1.5	0.39±0.29	3.28±1.01	6.05±1.66	1.18±0.73	10.92±1.98b
	2.0	0.68±0.32	3.51±1.10	6.54±2.23	1.54±0.86	12.28±2.04a
F-test		ns	ns	ns	ns	*
BA	0.0	0.29±0.24	3.61±1.03	5.15±1.77	2.10±0.83	11.18±1.83
	0.2	0.24±0.22	3.43±1.03	5.48±1.21	1.48±0.50	10.65±1.55
	0.4	0.71±0.27	3.12±0.90	4.83±1.02	1.92±1.22	10.60±1.20
	0.6	0.65±0.32	3.43±0.83	6.36±2.04	1.23±0.60	11.35±2.03
	0.8	0.61±0.47	2.48±0.89	6.74±1.66	1.67±1.00	11.51±2.02
	1.0	0.43±0.35	3.04±0.83	5.88±2.05	1.07±0.61	10.44±1.74
F-test		ns	ns	ns	ns	ns

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)				จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
				แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์รวมทั้งหมด
NAA	0.0	BA	0.0	0.00±0.00	3.85±0.50	4.27±2.00	0.83±0.26	10.67±0.95b-h
			0.2	0.28±0.28	4.37±0.31	4.97±0.76	2.71±0.66	11.33±0.38a-g
			0.4	0.26±0.26	3.29±0.84	5.41±1.44	1.55±0.42	12.94±0.21a-c
			0.6	0.93±0.14	4.00±0.55	4.73±0.83	1.61±0.56	9.83±0.74b-h
			0.8	1.14±0.72	2.52±0.72	6.11±0.21	1.40±0.30	11.33±0.33a-g
			1.0	0.19±0.19	1.83±0.37	5.62±1.31	1.73±0.61	8.89±0.18d-h
NAA	0.5	BA	0.0	0.25±0.25	4.17±0.59	6.39±2.69	1.25±0.91	12.83±1.21a-c
			0.2	0.38±0.38	1.92±0.26	5.36±0.54	0.13±0.13	9.74±0.31b-h
			0.4	0.58±0.29	3.15±1.15	4.30±1.52	0.77±0.49	10.51±0.60b-h
			0.6	0.00±0.00	2.94±1.08	6.25±2.01	1.17±0.94	10.34±1.02b-h
			0.8	0.29±0.29	2.26±0.33	6.08±1.69	1.64±0.49	11.52±0.25a-g
			1.0	0.05±0.05	2.68±0.30	4.41±1.85	0.76±0.39	8.44±0.82gh
NAA	1.0	BA	0.0	0.44±0.25	2.56±0.67	4.28±1.63	0.69±0.42	8.85±0.60e-h
			0.2	0.23±0.23	4.42±1.87	7.44±1.84	1.55±0.92	13.14±1.45a-c
			0.4	0.92±0.05	3.35±0.59	3.95±0.78	1.88±1.05	8.69±0.54f-h
			0.6	0.86±0.52	2.87±0.69	6.86±2.65	1.41±0.80	12.46±0.59a-e
			0.8	0.60±0.30	2.28±1.40	4.88±1.59	0.40±0.21	8.11±1.44h
			1.0	0.95±0.61	2.40±0.89	5.43±0.91	2.12±1.37	9.87±0.81b-h
NAA	1.5	BA	0.0	0.41±0.41	2.68±1.36	4.54±1.80	2.54±1.03	9.89±1.34c-h
			0.2	0.00±0.00	2.31±0.94	5.10±0.55	1.95±0.82	8.93±0.98e-h
			0.4	0.67±0.34	2.62±0.54	5.29±0.53	1.75±1.15	8.93±0.55d-h
			0.6	0.96±0.07	4.81±0.80	7.19±3.17	0.24±0.24	13.98±1.94ab
			0.8	0.00±0.00	3.13±1.51	7.49±0.82	0.88±0.53	11.69±0.50a-g
			1.0	0.34±0.22	4.18±0.42	6.73±2.28	1.89±0.28	12.11±0.79a-f
NAA	2.0	BA	0.0	0.40±0.24	4.81±1.64	6.31±1.53	1.31±0.77	13.68±0.74ab
			0.2	0.36±0.03	4.12±0.14	4.57±1.77	1.70±0.98	10.14±0.75b-h
			0.4	1.12±0.10	3.23±1.69	5.22±1.09	1.61±0.61	11.92±0.26a-g
			0.6	0.55±0.32	2.52±0.66	6.77±2.34	1.39±0.76	10.15±1.33b-h
			0.8	1.04±0.59	2.23±0.58	9.16±2.80	2.87±1.36	14.90±1.79a
			1.0	0.65±0.34	4.15±1.18	7.24±3.98	1.86±1.52	12.89±1.58a-d
F-test				ns	ns	ns	ns	**
CV (%)				15.57	20.21	16.21	23.14	7.99

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ns ไม่มีความแตกต่างกันทาง * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง ทำการทดลองโดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.2.4.3 การทดลองที่ 3.4 หลังจากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซ้นต์ไดอะซิเตต นับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่าได้โปรโตพลาสต์จำนวน $24.00x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิต 74.67 เปอร์เซนต์ทำการปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น $0.25x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 96 ช่องพบว่า เกิดการแบ่งเซลล์ในลักษณะต่างๆ คือ การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน (ภาพที่ 4.8 A) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ(ภาพที่ 4.8 B) , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว (ภาพที่ 4.9 A) , และการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (ภาพที่ 4.9 B)

การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย พบว่า NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุด คือ 0.69 เปอร์เซนต์และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 และ0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันน้อยที่สุดคือ 0.26 และ 0.09 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันรองลงมา คือ 0.53 , 0.37 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุด คือ 0.58 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 0.01 , 0.50 , 0.25 และ 0.05 มิลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน 0.44 , 0.41 , 0.39 , 0.35 , 0.15 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากันมากที่สุด คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลิกรัมต่อลิตร โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ

ในการการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุดคือ 2.90 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 , 2.0 , 1.5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 2.77 , 2.69 , 2.13 และ 2.12 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทาง โดยที่ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุด คือ 2.87 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 , 0.0 , 0.05 , 0.01 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ 2.61 , 2.55 , 2.52 , 2.51 , 2.09 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อมากที่สุด คือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีค่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 4.50 เปอร์เซนต์โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3

การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว

ในการการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปร-โตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุด คือ 7.52 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5, 1.0 , 0.5 และ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 5.51 , 5.48 , 5.47 และ 4.87 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุดคือ 6.69 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 , 0.10 , 0.50 , 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน 6.07 , 5.59 , 5.58 , 5.50 , 5.20 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ของโปรโตพลาสต์ พบว่าปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุด คือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.00 มิลิกรัมต่อลิตร โดยจะให้เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 12.77 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.50 มิลิกรัมต่อลิตร โดยจะให้เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว 7.41 เปอร์เซนต์โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3

การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ในการการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ NAA ที่ระดับ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว มากที่สุดคือ 1.20 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 , 1.0 , 2.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 1.06 , 0.97 , 0.82 และ 0.74 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

สำหรับผลของ TDZ ต่อการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ 1.57 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 , 0.25 , 0.01 , 0.50 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 1.01 , 1.00 , 0.84 , 0.70 , 0.65 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ พบว่าเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดย ระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ TDZ ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด คือ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยลักษณะโปรโตพลาสต์ที่พบจะเหมือนกับที่พบในการทดลองที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแบ่งเซลล์ทั้งหมด

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง พบว่า ผลของ NAA ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NAA ที่ระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุดคือ 12.28 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 , 0.0 , 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 10.92 , 10.83 , 10.56 และ 10.19 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

สำหรับผลของ BA ต่อการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ ในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ระดับ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 11.51 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 , 0.0 , 0.2 , 0.4 และ 1.0 โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 11.35, 11.18 , 10.65 , 10.60 และ 10.44 เปอร์เซนต์ตามลำดับ(ตารางที่ 4.8)

เมื่อพิจารณาผลของ NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดการแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดของโปรโตพลาสต์พบว่า เปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BA ที่กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์รวมทั้งหมดมากที่สุด คือ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะมีเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์รวมทั้งหมด 14.90 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว KM8P ที่มี NAA และ TDZ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
		แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์รวมทั้งหมด
NAA	0.0	0.10±0.15c	2.77±1.17	4.87±1.65	1.20±0.72	8.94±1.85
	0.5	0.69±0.54a	2.12±0.80	5.47±1.62	1.06±0.86	9.37±1.68
	1.0	0.53±0.39ab	2.90±0.78	5.48±1.88	0.97±0.67	9.91±1.61
	1.5	0.26±0.24c	2.13±1.01	5.51±1.40	0.74±0.51	8.67±1.42
	2.0	0.37±0.26bc	2.69±1.05	7.52±3.96	0.82±0.53	11.42±3.70
F-test		*	ns	ns	ns	ns
TDZ	0.00	0.45±0.46	2.55±0.94	6.69±4.14	0.65±0.37	10.34±3.99
	0.01	0.41±0.40	2.51±0.90	5.50±1.62	0.84±0.55	9.26±1.62
	0.05	0.16±0.19	2.52±0.94	4.87±1.63	1.58±1.00	9.47±1.28
	0.10	0.59±0.46	2.61±1.04	5.58±2.08	1.01±0.61	9.81±2.30
	0.25	0.35±0.27	2.09±1.14	6.07±1.20	0.99±0.62	9.52±1.32
	0.50	0.39±0.29	2.87±0.94	5.58±2.30	0.70±0.62	9.56±2.08
F-test		ns	ns	ns	ns	ns

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)				จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบต่างๆ(±SE)(เปอร์เซนต์)				
				แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ	แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว	แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบ่งเซลล์รวมทั้งหมด
NAA	0.0	TDZ	0.00	0.06±0.06	2.33±0.77	4.89±0.46	0.77±0.68	8.06±0.35
			0.01	0.00±0.00	1.82±1.18	6.19±0.60	0.00±0.00	7.93±1.13
			0.05	0.00±0.00	3.13±0.72	2.92±0.45	1.39±0.70	7.44±0.98
			0.10	0.00±0.00	3.49±1.86	5.45±0.55	2.52±0.31	11.46±1.93
			0.25	0.32±0.32	2.49±2.03	5.63±0.43	1.53±0.70	9.97±0.72
			0.50	0.22±0.22	3.37±0.68	4.17±0.53	1.05±1.05	8.80±1.08
NAA	0.5	TDZ	0.00	1.31±0.87	2.47±0.98	5.11±0.52	0.71±0.05	9.59±0.90
			0.01	0.31±0.31	3.46±0.90	5.18±0.51	0.47±0.47	9.41±1.27
			0.05	0.00±0.00	0.53±0.27	6.04±0.50	3.34±1.51	9.91±0.36
			0.10	1.93±0.34	1.80±0.05	5.39±0.56	0.31±0.31	9.43±1.57
			0.25	0.24±0.24	2.17±1.04	5.18±0.46	0.90±0.55	8.48±0.91
			0.50	0.41±0.26	2.35±0.41	5.95±0.57	0.68±0.35	9.40±1.40
NAA	1.0	TDZ	0.00	0.32±0.32	2.07±0.83	4.86±0.55	0.54±0.49	7.78±0.49
			0.01	1.09±0.75	3.45±0.75	4.70±0.49	1.55±0.39	10.80±0.80
			0.05	0.28±0.28	3.45±0.49	5.54±0.53	0.98±0.98	10.25±0.50
			0.10	0.27±0.27	3.25±0.60	6.15±0.59	0.75±0.75	10.42±1.23
			0.25	0.63±0.32	1.70±0.62	5.72±0.53	1.75±0.98	9.79±0.96
			0.50	0.63±0.36	3.50±1.13	5.96±0.59	0.28±0.28	10.38±1.67
NAA	1.5	TDZ	0.00	0.32±0.32	1.38±0.70	5.82±0.54	0.47±0.25	7.98±1.16
			0.01	0.40±0.20	1.47±0.78	5.90±0.53	1.24±0.85	9.01±0.54
			0.05	0.21±0.21	4.22±0.67	4.83±0.50	1.35±0.69	10.61±0.90
			0.10	0.20±0.20	1.25±0.35	5.02±0.35	0.93±0.48	7.41±0.63
			0.25	0.00±0.00	1.28±0.72	7.10±0.51	0.35±0.35	8.72±0.46
			0.50	0.46±0.46	3.24±1.55	4.42±0.47	0.15±0.15	8.27±1.29
NAA	2.0	TDZ	0.00	0.24±0.24	4.50±0.83	12.78±0.50	0.77±0.41	18.29±4.59
			0.01	0.29±0.29	2.36±0.82	5.55±0.53	0.95±0.54	9.16±1.28
			0.05	0.31±0.31	1.29±0.24	6.71±0.57	0.83±0.83	9.14±0.78
			0.10	0.55±0.29	3.30±1.24	5.95±0.49	0.55±0.28	10.34±1.66
			0.25	0.58±0.32	2.82±1.52	6.76±0.58	0.48±0.25	10.64±1.02
			0.50	0.26±0.26	1.92±0.96	7.41±0.66	1.35±0.91	10.94±1.32
F-test				ns	ns	ns	ns	Ns
CV (%)				18.20	24.91	21.36	23.63	13.00

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ns ไม่มีความแตกต่างกันทาง * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองที่ 3 ได้ทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวทีมีสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 ชนิดคือ 2,4-D ร่วมกับ BA , 2,4-D ร่วมกับ TDZ , NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ TDZ โปรโตพลาสต์จะเกิดการแบ่งเซลล์ขึ้นหลังจากการเพาะเลี้ยงประมาณ 1 วัน โดยจะมีลักษณะการแบ่งเซลล์ 4 แบบ คือ แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน , แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ ,แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว และแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์เหล่านี้ต่อไปพบว่าโปรโตพลาสต์แต่ละแบบมีการพัฒนารูปร่างที่แตกต่างกันออกไปดังต่อไปนี้

โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเท่ากัน

บางเซลล์จะแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 2 เซลล์ เป็น 3 เซลล์ โดยเซลล์ที่แบ่งเพิ่มนั้นจะมีขนาดเล็กอยู่ตรงกลางระหว่างเซลล์ทั้งสอง หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์ที่เกิดขึ้นไม่สามารถพัฒนาเพิ่มขึ้นได้อีก ในขณะที่บางเซลล์จะเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นมาก

โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ

โปรโตพลาสต์จะแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นบางครั้ง บางเซลล์จะแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีก และในขณะที่บางเซลล์จะมีการแตกออกของโปรโตพลาสต์ นอกจากนั้นบางเซลล์ส่วนที่แตกหน่อออกมาจะยืนยาวออกในลักษณะคล้ายรากหรือหนาม โดยในเซลล์ที่แตกหน่อเพิ่มมากขึ้นจะพบว่ามีโปรโตพลาสต์ขนาดเล็ก มาเกาะติดรอบๆบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อ ลักษณะสีของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อจะมีสีขาวขุ่นบางครั้งมีสีดำเจืออยู่บาง ไม่มีคลอโรพลาสต์ ปลายที่ยืนยาวออกไปส่วนใหญ่มีสีดำลักษณะเรียวเล็ก

โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว

โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว นั้นส่วนใหญ่จะเป็นการแตกหน่อ ในลักษณะที่หน่อที่แตกออกไปมีขนาดที่ไม่แน่นอน บางเซลล์หน่อที่แตกออกไปมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เดิม ในขณะที่บางเซลล์หน่อที่แตกออกไปมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดิม เซลล์ที่แตกหน่อ บางเซลล์มีขนาดเล็ก โดยเมื่อ โปรโตพลาสต์มีการแตกหน่อ คลอโรพลาสต์จะรวมอยู่ในด้านตรงข้ามกับหน่อที่แตกออกไป ลักษณะสีของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อจะมีสีขาวใสบางครั้งมีสีดำเจืออยู่บาง ไม่มีคลอโรพลาสต์ พบ เซลล์ข้างเคียงเกาะติดอยู่บ้าง แต่ส่วนใหญ่จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ

โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างนั้นส่วนใหญ่จะมีขนาดและรูปร่างที่ไม่แน่นอน บางเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลม บางเซลล์มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม บางเซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์แขวนลอย เซลล์เหล่านี้มีคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ เซลล์มีลักษณะสีขาวใสปนจุดสีเขียวของคลอโรพลาสต์ บางเซลล์มีลักษณะบิดเบี้ยวไม่เป็นทรงกลมเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่ฉีกขาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ คือ 6 ชั่วโมงโดยจะให้จำนวน โปรโตพลาสต์ $10.03x10^4$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ 37.83 เปอร์เซนต์ ในขณะที่การใช้ระยะเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ส่งเสริมให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เพิ่มมากขึ้น แต่ความมีชีวิตของโปรโพลาสต์ที่ได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยจะให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ 38.72 และ 34.24 ซึ่งสอดคล้องกับ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์การรักษา (2537) รายงานว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ใบมะเขือเทศนานขึ้น เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จะลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมามีโอกาสถูกย่อยเยื้อหุ้มเซลล์นานขึ้นโปรโตพลาสต์จึงแตกเพิ่มขึ้น และตามที่ อารีย์ วรัญญวัฒต์ (2541) กล่าวว่า การย่อยเนื้อเยื่อพืชให้ได้โปรโตพลาสต์ควรย่อยให้เสร็จสิ้นในเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ซึ่งจะได้โปรโตพลาสต์ที่มากและมีคุณภาพดีที่สุด ถ้าจำเป็นต้องย่อยข้ามคืน ควรใช้เอนไซม์ความเข้มข้นเพียง 50 เปอร์เซนต์

จากการศึกษาความเร็วที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อพบว่าความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งสอดคล้องกับ โสภา ทวีคณะโชค และ สมปอง เตชะโต (2543) ได้รายงานว่า สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุกได้โดยใช้ความเร็วในการปั่นโปรโตพลาสต์ให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เช่นเดียวกับ Engler and Grogan (1982) รายงานว่า สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงส้มได้โดยใช้ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอน ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

จากการทดลองศึกษาระดับ osmoticum ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า แมนนิทอล ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ คือ 0.5 โมลาร์ โดยจะให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ $33x10^4$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 47.77 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับระดับแมนนิทอลที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดอื่น เช่น ผักสลัด (อำนวย คำตื้อ และ เซอิบิ โอกะ. 2537), สะระแหน่ (Sato *et. al.*,1993) ตามที่ Eriksson(1989) กล่าวว่าแมนนิทอลเป็นสารรักษาแรงดันออสโมติกที่นิยมใช้กันเป็นอย่างมากและเป็นสารที่ไม่มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและมีอัตราการแทรกผ่านเข้าไปในโปรโตพลาสต์ช้านอกจากนี้การมีเสถียรภาพ การมีชีวิตและความสามารถในการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์จะมีส่วนสัมพันธ์กับการรักษาแรงดันออสโมซีสในระหว่างการแยกและการเพาะเลี้ยงซึ่งระดับ osmotic potential ของโปรโตพลาสต์จะผันแปรไปตามแหล่งของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ใช้แต่โดยทั่วไประดับ แมนนิทอล ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.3-0.7 M และ ตามที่ อารีย์ วรัญญูวัฒต์ (2541) กล่าวว่า เนื่องจากโปรโต-พลาสต์มีเพียง พลาสมา เมมเบรน (plasma membrane) ห่อหุ้มองค์ประกอบภายในเซลล์ โอกาสที่จะดูดสารภายนอกเข้ามาจึงมีมาก เช่น สามารถดูดน้ำเข้ามามากจนเซลล์แตกดังนั้นการแยกโปรโต-พลาสต์ต้องทำในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดความสมดุลย์ของของเหลวทั้งภายนอกและภายในโปรโตพลาสต์ จากการทดลองนี้การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้แมนนิทอล ที่ระดับ 0.5 โมลาร์ จะมีความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่มากกว่าเมื่อแยกโดยใช้แมนนิทอล ที่ระดับ 0.6 และ 0.7 โมลาร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าแมนนิทอล ที่ระดับ 0.6 และ 0.7 โมลาร์ทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการหดตัว ตามที่ Eriksson (1989) กล่าวว่าการย้ายเซลล์หรือเนื้อเยื่อไปสู่สารละลายที่ทำให้เซลล์หดตัว จะมีผลชักนำให้เกิดความเค้น ที่ทำให้เกิดอันตราย และส่งผลกระทบต่อกระบวนการสำคัญต่างๆภายในเซลล์ได้ และตามที่คำนูญ กาญจนภูมิ(2524) กล่าวว่าโปรโตพลาสต์มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดัน ออสโมซีสอย่างรวดเร็ว โปรโตพลาสต์จะขยายขนาดใหญ่จนเยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด ถ้าเพิ่มแรงดันออสโมซีสอย่างรวดเร็ว จะทำให้โปรโตพลาสต์หดตัว และอาจตายได้ นอกจากนี้ ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์(2524) กล่าวว่า ระดับของสารรักษาแรงดันออสโมซีสจะขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ และตามที่ Razdan and Bhojwani (1983) กล่าวว่าออสโมติคัม มีส่วนสำคัญในการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากเป็นตัวรักษาแรงดันออสโมซีส จากที่กล่าวมานี้แมนนิทอล ที่ระดับ 0.5 M อาจเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อของใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

จากการทดลองสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อพบว่า อาหารเหลวสูตร KM8P(B) เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(A) ซึ่งสอดคล้องกับ ประสาทพร สมิตะมาน (2541) ซึ่งกล่าวว่า อาหารเหลวเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในระยะแรกมากกว่าอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในระยะแรกโปรโตพลาสต์อยู่ในสภาพที่ยังไม่สามารถสังเคราะห์สารประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญได้ ทำให้ต้องแลกเปลี่ยนสารประกอบจากภายนอกและในอาหารเหลวการแลกเปลี่ยนสารประกอบทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง นอกจากนี้ คำนูญ กาษจนภูมิ (2545) กล่าวว่าอาหาร KM8P เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน อาหารเหล่านี้มักใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่นต่ำและมักใช้ได้กับพืชมากชนิดและมีข้อดีคือสามารถชดเชยการสูญเสียเกลือแร่และเมทาบอไลต์บางอย่างไปในระหว่างการแยก นอกจากนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 14 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(A)จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) ไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทั้งนี้ เนื่องจากอาหารเหลวสูตร KM8P(B) นั้นใช้น้ำตาล 10 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน(ภาคผนวก ก)รวมทั้งเติม PVP-10 ส่วนอาหารเหลวสูตร KM8P(A)ใช้น้ำตาลเพียง 3 ชนิด คือ กลูโคส , ซูโครส และแมนนิทอล (ภาคผนวก ก) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงบางส่วนจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่ง สันนิษฐานว่า PVP-10 เป็นสารที่ช่วยในการดูดซับสารพิษที่เกิดขึ้นในอาหาร ซึ่งมีรายงานหลายฉบับกล่าวว่าการใช้ PVP-10 สามารถช่วยในการดูดซับสารสีน้ำตาลที่เกิดจากโปรโตพลาสต์(Wu *et. al.* 1991 ; Ravigadevi *et. al.* 1996 ; Engler and Grogan. 1982 ; Mills and Hammerschlag. 1994) นอกจากนี้ Fowke and Constabel(1989) กล่าวว่ามีนักวิจัยหลายคนเติมน้ำตาลหลายชนิดรวมกันในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เนื่องจากน้ำตาลชนิดต่างๆนั้นเป็นกลไกหลักในการสร้างผนังเซลล์ที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างออกไปและตามที่ ทินกร อินทรักษ์ (2541) รายงานว่า การใช้น้ำตาล กลูโคส,ซูโครสและแมนนิทอล ร่วมกันในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของอ้อยจะส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์เจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโครสหรือซูโครสเพียงอย่างเดียว จากที่กล่าวมาข้างต้นโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(B)จึงยังคงมีสีเขียวและมีการเจริญเติบดีกว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM8P(A)

จากการศึกษาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคือ 0.25 $x10^4$โปรโตพลาสต์มิลลิลิตร โดยจะให้โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะดีและมีการเกิดสีน้ำตาลของโปรโตพลาสต์น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Evan and Brovo(1983) ที่กล่าวว่า ความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยทั่วไปคือ 0.05 $x10^4$ ถึง 1.0 $x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ คำนูญ กาญจนภูมิ(2545) กล่าวว่า ความหนาแน่นมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มาก โดยความหนาแน่นที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.10 $x10^4$ ถึง 1.0 $x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาวะทางสรีรวิทยาของพืชที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ และตามที่ Razdon and Bhojwani(1983)กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยทั่วไปใช้ความหนาแน่น 1.0 $x10^4$ ถึง 1.0 $x10^5$ ถ้าใช้ความหนาแน่นสูง โปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์จะเจริญเข้าไปในโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์ข้างเคียงทำให้ได้เนื้อเยื่อที่เป็น chimera จากที่กล่าวมาอาจเป็นไปได้ว่าความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ คือ 0.25 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 ชนิดคือ 2,4-D ร่วมกับ BA , 2,4-D ร่วมกับ TDZ , NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) พบว่า คือ การใช้ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆมากที่สุดโดยจะมีการแบ่งเซลล์ 18.29 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือการใช้ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆ 14.90 เปอร์เซนต์ ซึ่งสอดคล้องกับ รงรอง วิเศษสุวรรณ (2538) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบ พบว่าโปรโตพลาสต์กุหลาบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือใช้ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ TDZ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ในระยะแรก และ Razdon and Bhojwani (1983) ที่กล่าวว่าในพืชพวก cereal การใช้ออกซินเพียงอย่างเดียวให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ดีกว่าการใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนิน และตามที่ Street (1977) กล่าวว่า โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ให้ประสบผลสำเร็จขึ้นอยู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะออกซิน โดยทั่วไปใช้ทั้งออกซินอย่างเดียวและใช้ออกซินร่วมกับ ไซโตไคนินซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ออกซิน 0.1 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนไซโตไคนินที่ใช้นั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และเมื่อพิจารณาการใช้ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆสูงถึง 14.90 เปอร์เซนต์ ซึ่งคล้ายคลึงกับงานทดลองของ สมัชชา นาคสมบัติ และ สมปองเตชะโต (2543) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบนมตำเลีย พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และคล้ายคลึงกับงานทดลองของ Matthews *et. al.*(1991) พบว่าโปรโตพลาสต์ของกุหลาบสามารถพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ได้ 0.004 เปอร์เซนต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KM8P ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และคล้ายคลึงกับงานทดลองของ Kuchuk *et. al.*(1998) ที่พบว่าโปรโตพลาสต์จากใบของต้น *Oenothera hooker* จะแบ่งเซลล์สูงถึง 75-90 เปอร์เซนต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ที่เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากที่กล่าวมาข้างต้นบ่งชี้ได้ว่า การใช้ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว หรือ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตรสารมารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงสามารถแบ่งเซลล์แบบต่างได้

เมื่อพิจารณาถึงการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันซึ่งเป็นการแบ่งเซลล์แบบปกติ พบว่า การใช้ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุดโดยจะมีการแบ่งเซลล์ 1.93 เปอร์เซนต์ ซึ่งสอดคล้องกับ รงรอง วิเศษสุวรรณ (2538) ซึ่งได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบ พบว่าโปรโตพลาสต์กุหลาบที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ในระยะแรก และคล้ายคลึงกับการทดลองของ พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และ สมปองเตชะโต (2542) ได้ทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของยางพารา พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน และมีอัตราการแบ่งเซลล์ 10.7 เปอร์เซนต์ และคล้ายคลึงกับงานทดลองของ Nakano *et. al.*(1995) พบว่าโปรโตพลาสต์จากใบของต้น *Gentiana* จะเกิดการแบ่งเซลล์ 8.9 เปอร์เซนต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากที่กล่าวมานี้อาจกล่าวได้ว่าการการใช้ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงแบ่งเซลล์แบบแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์พบว่าเกิดการแบ่งเซลล์ 4 ลักษณะคือ การแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว และการแบ่งเซลล์ แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันนั้นเป็นการแบ่งเซลล์แบบปกติของโปรโตพลาสต์ ส่วนการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ , การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว และการแบ่งเซลล์ แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ตามที่ Thomas and Davey (1975) กล่าวว่า เนื่องจากโปรโตพลาสต์เกิดการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์เป็นผลทำให้ไซโตพลาสซึมสามารถไหลผ่านส่วนของผนังเซลล์ที่ไม่แข็งแรงออกมาได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและตำแหน่งของแวคคิวโอลภายในเซลล์ และตามที่ Jolles and Pilet (1988) กล่าวว่า การมี IAA และ ABA ในอาหารที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากรากข้าวโพดจะส่งเสริมการสร้างถุงแวคคิวโอลเพิ่มขึ้น แม้ว่าในการทดลองนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะไม่มี IAA และ ABA แต่ก็มีออร์โมน 2,4-D และ NAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินเช่นเดียวกับ IAA จึงอาจออกฤทธิ์ทำให้โปรโตพลาส์เกิดการสร้างถุงแวคคิวโอลเพิ่มขึ้น ทำให้พบโปรโตพลาสต์ที่เกิดการแตกหน่อขึ้นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จากที่กล่าวมาข้างต้น ในการทดลองนี้จึงตรวจพบโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อหลายหน่อ และแตกหน่อเดียวเกิดขึ้นในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกได้โดยนำใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ มาทำการสับใบแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ A ที่เติม mannitol 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 33 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

การทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บัวหลวง

พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ คือ KM8P(B) โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 2.5x10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแตกสลายน้อยที่สุด และพบโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น

การทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 ชนิดคือ 2,4-D ร่วมกับ BA , 2,4-D ร่วมกับ TDZ , NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ TDZ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า คือ การใช้ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์แบบต่างๆ มากที่สุดโดยจะมีการแบ่งเซลล์ 18.29 เปอร์เซนต์ และ การใช้ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.10 กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์แบบเท่ากันมากที่สุดโดยจะมีการแบ่งเซลล์ 1.93 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กวินหาญ ผลหาญ. 2534. "นาบัวตัดดอก อ.บางกรวย จ.นนทบุรี." **วารสารเคหะการเกษตร.** 15(11) : 52-60

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

กุลวรา จารุพันธ์ และ จันทิมา วรสัมปุรณะ. 2543. "ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชในสภาพปลอดเชื้อ." ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเหล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2524. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2545. **เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จารีย์ หอยทอง. 2519. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณราวุฒิ ปียโชติสกุลชัย. 2539. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทินกร อินทรักษ์. 2541. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของอ้อย(*Saccharum* sp.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2539. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์. ใน. **เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นสูง.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กำแพงแสน.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสาทพร สมิตามาน. 2540. **โปรโตพลาสต์เทคโนโลยี.** เชียงใหม่ : คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และ สมปอง เตชะโต . 2542. " ผลของไซโตไคนินต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน การแยก และการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. **ว.สงขลานครินทร์.** 21(2) : 169-177.

เพ็ญศิริ ดุษฎีเมธา. 2546. "รวยด้วยบัว" **เอกสารประกอบการสัมนาทางวิชาการพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจของชาติ.** กรุงเทพฯ. :โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑารพ สุธาธรรม .2540. การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รงรอง วิเศษสุวรรณ . 2541. "การชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกุหลาบ". **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่36.** กรุงเทพฯ :โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ:หลักการและเทคนิค.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วาสนา มิตรานนท์. 2527. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง(*Nelumbo* Adans.).ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา. 2537. "ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มะเขือเทศ." **วารสารแก่นเกษตร.** 22 : 133-138.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2524. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** อุดรธานี : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

สมปอง เตชะโต และ ชลิดา ศรีภักดี. 2543. "การแยก เพาะเลี้ยง และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน." **ว.สงขลานครินทร์.** 22(2) : 143-151.

สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520. **ทะเบียนพันธุ์ไม้ประดับ.** กรุงเทพฯ : บพิธการพิมพ์

สมัชชา นาคสมบัติ และ สมปอง เตชะโต . 2543. " การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย (*Hoya* spp.)และการปลูกถ่ายยีน. **ว.สงขลานครินทร์.** 23(2) :193-201.

สายชล เกตุษา. 2531. **เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้.** กรุงเทพฯ : บริษัทสารมวลชล.

เสริมลาภ วสุวัต. 2537. **บัว:ไม้ดอกไม้ประดับ.** กรุงเทพฯ : อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. **พรรณไม้น้ำ.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

โสภา ทวีคณะโชติ และ สมปอง เตชะโต. 2543 "ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก(*Citrus reticulate* Blanco)และการปลูกถ่ายยีนด้วย Agrobacterium." **ว.สงขลานครินทร์.** 22(1) : 16-23.

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. 2541. "การพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจากโปรโตพลาสต์ของพืชตระกูลกะหล่ำในสภาพปลอดเชื้อ." **วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์).** 32 : 150-157.

อารีย์ วรัญญูวัฒต์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อติสรรค์.

อำนวย คำตื้อ และ เซอิบิ โอกะ. 2537. "ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของผักสลัด." **แก่นเกษตร.** 22(1) : 20-25

Anthony,P. , Davey,M.R. , Power,J.B. and Lowe,K.C. 1995. "An Improved Protocol for The Culture of Cassava Leaf Protoplast." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 42 : 299-302.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Backer,A.C. and Bakhuizen Van den Brink,R.C. 1963. **Flora of Java.** Etherland : Noordhoff.

Binding,H. and Nehls,R. 1977. "Regeneration of Isolated Protoplasts to Plants in *Solanum dulcamara* L." **Pflanzenphysiol.** 85 : 279-280.

Burger,D.W. and Hackett,W.P. 1982. "The Isolation , Culture and Division of Protoplasts from Citrus Cotyledons." **Physiol. Plant.** 56 : 324-328.

Burkill,I.H. 1966. **A Dictionary of The Economic Products of The Malay Peninsula.vol.11.** Ministry of Agriculture and Cooperatives. Kuala Lumpur.

Core,L.E. 1955. **Plant Taxonomy.** New Jersey : Englewood Cliffs,Prentice-Hall,Inc.

Correll,D.S. and Correll,H.B. 1975. **Aquatic and Wetland Plants of Southwestern United States.** n.p. : Standford.

Dorion,N. , Wies,N. , Burteaux,A. and Bigot,C. 1999. "Protoplast and Leaf Explant Culture of *Lycopersicon cheesmanii* and Salt Tolerance of Protoplast-derived Calli." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 59 : 9-16.

Doughty,S. and Power,J.B. 1988. "Callus Formation from Leaf Mesophyll Protoplasts of *Malus xdomestica* Borkh.cv.Greensleeves." **Plant Cell Reports.** 7 : 200-201.

Enamoto,S. and Ohyama,K. 1989. "Regeneration of Plant from Protoplast of Lettuce and Its Wild Species." in Bajaj,Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry.** Vol. 8. Germany : Springer.

Engler, D.E. and Grogan, R.G. 1982. "Isolation , Culture and Regeneration of Lettuce Leaf Mesophyll Protoplasts." **Plant Science Letter.** 28 : 223-229

Eriksson,T.R. 1989. "Protoplasts Isolation and Culture." 1-20. in Fowke,L.C and Constabel,F. **Plant Protoplasts.** Florida : CRC Press.

Evans,D.A. and Bravo, J.B. 1983. "Plant Protoplasts Isolation and Culture." 124-176. in Evans,D.A. *et al.* **Handbook of Cell Culture. Vol. 1.** New York : Macmillan Publishing Company.

Fowke,L.C. and Constabel,F. 1989. **Plant Protoplasts.** Florida :CRC Press.

Gamborg,O.L. , Miller,R.A. and Ojima,K. 1999. "Nutrient Requirements of Suspension Culture of Soybean Root Cells." **Exp. Cell Res.** 50 : 151-158.

Gilbert,S. 1982. "The Culture of Water Lilies and Water Lotuses." **Horticulture.** August : 16-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hu,Q. , Anderson,S.B. and Hansen,L.N. 1999. "Plant Regeneration from Mesophyll Protoplast in *Isatis indigotica.*" **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 55 : 155-157.

Jolles,Ch. and Pilet,P.E. 1988. "IAA and ABA Content and Metabolism in Mize Root Protoplast." 147-148. in Puite,K.J. , Dons,J.J.M. , Huizing,H.J. , Kool,A.J. , Koornneef,M. and Krens,F.A. **Progress in Plant Protoplast Research.** London : Kluwer Academic Publisher.

Kao,K.N. and Michayluk,M.R. 1975. "Nutrient Requirements for Growth of *Vicia hasjastana* Cells and Protoplasts at Very Low Population Density in Liquid Media." **Planta.** 126 : 105-110.

Keskitalo,M. , Kanerva,T. and Pehu,E. 1995. "Development of *in vitro* Procedures for Regeneration of Petiole and Leaf Explant and Production of Protoplast-derived Callus in *Tanacetum vulgare* L.(Tansy)." **Plant Cell Reports.** 14 : 261-266.

Krasnyanski,S. , Polgar,Z. , Nemeth,G. and Menezel,L. 1992. "Plant Regeneration from Callus and Protoplast Cultures of *Helianthus giganteus* L." **Plant Cell Reports.** 11 : 7-10.

Kuchuk,N. , Herrmann,R.G. and Koop,H.U. 1998. "Plant Regeneration from Leaf Protoplast of Evening Primrose(*Oenethera hookeri*)." **Plant Cell Reports.** 17 : 601-604.

Kunitake,H. and Mii,M. 1992. "Regeneration of Plants from Protoplasts of Statice (*Limonium perezii* Hubbard)." 72-82. in Bajaj,Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 8.** Germany : Springer.

Lang,H. and Kohlenbach,H.W. 1988. "Callus Formation from Mesophyll Protoplasts of *Fugus sylvatica* L." **Plant Cell Reports.** 7 : 485-488.

Linsmaier,E.M. and Skoog,F. 1988. "Organic Growth Factor Requirement of Tobacco Tissue Cultures." **Physiol. Plant.** 18 : 100-127.

Marchant,R. , Davey,M.R. and Power,J.B. 1997. "Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts from Rosa Hybrida." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 50 : 131-134.

Matthews,D. , Mottley,J , Horan,I and Roberts,A.V. 1991. "A Protoplasts to Plant System in Roses." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 24 : 173-180.

Matthews,D. , Mottley,J , Yokoya,K. and Roberts,A.V. 1994. "Regeneration of Plants from Protoplasts of *Rosa* Species(Roses)." 146-160. in Bajaj,Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry.** Vol. 29. Germany : Springer.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mills,D. and Hammerschlag,F.A. 1994. "Isolation of Cell and Protoplasts from Leave of In Vitro Propagated Peach (*Prunus persica*) Plants." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 36 : 99-105.

Murashige,T. and Skoog,F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures." **Physiol.Plant.** 15 : 473-497.

Murashige,T. and Tucker,D.P.H. 1969. "Growth Factor Requirements of *Citrus* Tissue Culture." **Proc. 1st Int. Citrus Symp.** 3 : 1155-1161.

Montagno,T.J. , Jourdan,P.S. and Berry,S.Z. 1991. "Plant Regeneration Leaf Protoplast of *Lycopersicon hirsutum* f.*hirsutum*." **Plant Cell Reports.** 9 : 680-683.

Murata,T. and Mathias,R.J. 1992. "Plant Regeneration from Mesophyll Protoplast of *Moricandia arvensis*." **Plant Cell Reports.** 11 : 408-411.

Nakano,M. and Mii,M. 1992. "Protoplast Culture and Plant Regeneration of Several Species in the Genus Dianthus." **Plant Cell Reports.** 11 : 255-258.

Nakano,M. , Hosokawa,K. , Oomiya,T. and Yamamura,S. 1995. "Plant Regeneration from Protoplasts of *Gentiana* by Embedding Protoplasts in Gellan Gum." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 41 : 221-227.

Nyman,M. and Willin,P. 1993. "Regeneration of Plants from Protoplasts of Cultivated Strawberry(*Fragaria* x *ananassa*)and Wild Strawberry(*Fragaria vesca*)." 32-42. in Bajaj,Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 23.** Germany : Springer.

Ochatt,S.J. 1991. "Requirements for Plant Regeneration from Protoplasts of the Shrubby Ornamental Honeysuckle(*Lonicera nitida* cv. Maigrun)." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 25 : 161-167.

Ochatt,S.J. and Power,J.B. 1988. "Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of William'Bon Chretien (syn.Bartlett)Pear(*Pyrus communis* L.)." **Plant Cell Reports.** 7 : 587-589.

Patat-Ochatt,E.M. , Boccon-Gibod,J. , Duron,M. and Ochatt,S.J. 1993. "Organogenesis of Stem and Leaf Protoplasts of A Haploid Golden Delicious Apple Clone (*Malus Xdomestica* Borkh.)." **Plant Cell Reports.** 12 : 118-120.

Patil,R.S. , Davey,M.R. and Power,J.B. 1994. "Highly Efficient Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Indian Field Cultivars of Tomato*(Lycopersicon esculentum)*." **Plant Cell,Tissue and Organ Culture.** 36 : 255-258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Punja,Z.K. and Raharjo,S.H.T. 1993. "Regeneration of Plants from Protoplasts of *Cucumis sativus* L.(cucumber)." 31-45. in Bajaj,Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 22.** Germany : Springer.

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.

Razdon,K.M. and Bhojwani,S. 1983. **Plant Tissue Culture Theory and Practice.** Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo : Elsevier.

Ravigadevi,S. 1996. "Oil Plam (*Elaeis guineensis*) Protoplasts : Isolation , Culture and Microcallus Formation." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 46 : 35-41.

Sarangi, B.K. , Kuchuk,N. and Gleba,Y.Y. 1992. "Isolation and Culture of Protoplasts of Pigeonpea (*Cajanus cajin* L.)." **Plant Cell Reports.** 11 : 462-465.

Sato, H. , Enamoto,S. , Oka,S. , Hosomi,K and Ito,Y. 1993. "Plant Regeneration from Protoplasts of Peppermint (*Mentha piperita* L.)." **Plant Cell Reports.** 12 : 546-550.

Street, H.E. 1977. **Plant Tissue and Cell Culture.** USA : Blackwell scientific publications .

Tian,Z. and Meng,J. 1999. "Plant Regeneration from Cultured Protoplasts of *Moricandia nitens*." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 55 : 217-221.

Tremouillaux-Guiller,J. and J-Claude Chenieux. 1991. "Somatic Embryogenesis from Leaf Protoplast of *Rauvolfia vomitoria* Shoot Cultures." **Plant Cell Reports.** 10 : 102-105.

Thomas, E. and Davey, M.R. 1975. **From Single Cell to Plant** . London : Wykeham publication .

Widholm,J.M. 1972. "The Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determining Viability of Cultured Plant Cell." **Stain Technology.** 47 : 189-194.

Wu,Y. , Installe,P. , Hinnisdaels,S. , Jacobs,M. and Negrutiu,I. 1991. "Protoplast Culture and Female Plant Regeneration in Dioecious Plant *Melandrium album*." **Plant Cell Reports.** 12 : 211-215.

Yamashita,Y. and Shimamoto,K. 1989. "Regeneration of Plants from Cabbage(*Brassica oleracea* var.*capitata*)Protoplasts." 193-205. in Bajaj,Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 8.** Germany : Springer.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

สารเคมี	MS	KM8P(A)	KM8P(B)	V-KM
Macroelements (mg/l)				
NH_4NO_3	-	600	600	1444
KNO_3	1900	1900	1900	1480
$CaCl_2.2H_2O$	440	600	600	735
$MgSO_4.7H_2O$	370	300	300	934
KH_2PO_4	170	170	170	68
KCl	-	300	300	300
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	-	-	27.8
Na_2-EDTA	37.3	-	-	37.3
Sequestrene 330 Fe	-	28	28	-
Microelements (mg/l)				
H_3BO_3	6.2	3	3	3
$MnSO_4.H_2O$	22.3	10	10	10
$ZnSO_4.2H_2O$	8.60	2	2	2
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025
$CoCl.\ 6H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025
KI	0.85	0.75	0.75	0.75
Sugar (g/l)				
Sucrose	30,000	10	10	0.25
Mannose	-	-	0.25	0.25
Glucose	-	5	5	108.9
Fructose	-	-	0.25	2.5
Ribose	-	-	0.25	0.25
Xylose	-	-	0.25	0.25
Rhamnose	-	-	0.25	0.25
Cellobiose	-	-	0.25	0.25
Sorbitol	-	-	0.25	0.25
Mannitol	-	0.5 molar	0.5 molar	0.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1(ต่อ)

สารเคมี	MS	KM8P(A)	KM8P(B)	V-KM
Vitamins and Organic acid (mg/l)				
Glycine	2	-	-	-
Inositol	100	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	1	1	1
Pyridoxin-HCl	0.5	1	1	1
Thiamine-HCl	0.1	1	1	1
D-Ca-pantothenate	-	1	1	1
Folic acid	-	0.4	0.4	0.4
p-Aminobenzoic acid	-	0.02	0.02	0.02
Biotin	-	0.01	0.01	0.01
Cholin chloride	-	1	1	1
Ascorbic acid	-	2	2	2
Vitamin A	-	0.01	0.01	0.01
Vitamin D_3	-	0.01	0.01	0.01
Vitamin B_{12}	-	0.02	0.02	-
Na-pyruvate	-	20	20	20
Citric acid	-	40	40	40
Malate	-	40	40	40
Fumarate	-	40	40	40
Organic supplement (mg/l)				
Casein Hydrolysate	-	250	250	250
Coconut milk	-	20 ml/l	20 ml/l	20 ml/l
Others supplement				
MES	-	5mM	5mM	-
PVP-10	-	-	5mM	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติผลของเวลาที่ใช้ในการแยกที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	468.05	156.01	142.34**	4.07	7.59
Error	8	8.76	1.09			
Total	11	476.18				

Grand Mean = 14.59 CV = 7.17%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติผลของเวลาที่ใช้ในการแยกที่มีต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	87.23	29.07	0.55 ns	4.07	7.59
Error	8	424.44	53.05			
Total	11	511.68				

Grand Mean = 35.71 CV = 20.39%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการแยกที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	2	194.12	97.06	6.46*	5.14	10.92
Error	6	90.11	15.01			
Total	8	284.24				

Grand Mean = 21.56 CV = 17.96%

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการแยกที่มีต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	2	37.55	18.77	0.55 ns	5.14	10.92
Error	6	203.04	33.84			
Total	8	240.60				

Grand Mean = 14.61 CV = 39.80%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ที่มีต่อจำนวนโปรโต-พลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	2	591.02	259.51	74.36**	5.14	10.92
Error	6	20.94	3.49			
Total	8	539.96				

Grand Mean = 23.63 CV = 7.90%

**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ที่มีต่อที่มีต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	2	676.77	338.38	6.28*	5.14	10.92
Error	6	323.52	53.92			
Total	8	1000.29				

Grand Mean = 35.62 CV = 20.61%

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	0.00	0.00	0.00 ns	3.15	4.98
2,4-D	4	0.15	0.037	0.49 ns	2.53	3.65
BA	5	0.36	0.073	0.96 ns	2.36	3.34
2,4-D x BA	20	1.55	0.07	1.02 ns	1.75	2.20
ERROR	58	4.44				
TOTAL	89	6.51				

Grand Mean = 1.25 CV = 22.13 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
Block	2	2.47	1.23	8.13**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.26	0.06	0.44 ns	2.53	3.65
BA	5	1.21	0.24	1.59 ns	2.36	3.34
2,4-D x BA	20	4.16	0.20	1.37 ns	1.75	2.20
ERROR	58	8.82	0.15			
TOTAL	89	16.95				

Grand Mean = 1.80 CV = 21.61 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
Block	2	25.26	12.63	98.55**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.85	0.21	1.66 ns	2.53	3.65
BA	5	0.87	0.17	1.37 ns	2.36	3.34
2,4-D x BA	20	3.76	0.18	1.47 ns	1.75	2.20
ERROR	58	7.43	0.12			
TOTAL	89	38.19				

Grand Mean = 2.51 CV = 14.25 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
Block	2	2.47	1.23	8.13**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.26	0.06	0.44 ns	2.53	3.65
BA	5	1.21	0.24	1.59 ns	2.36	3.34
2,4-D x BA	20	4.16	0.20	1.37 ns	1.75	2.20
ERROR	58	8.82	0.15			
TOTAL	89	1.695				

Grand Mean = 1.80 CV = 21.61 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	16.29	8.14	71.91**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.54	0.13	1.21 ns	2.53	3.65
BA	5	0.41	0.08	0.73 ns	2.36	3.34
2,4-D x BA	20	1.91	0.09	0.84 ns	1.75	2.20
ERROR	58	25.75				
TOTAL	89					

Grand Mean = 3.39 CV = 9.91 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
Block	2	0.61	0.30	9.81**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.10	0.02	0.84 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.23	0.04	1.48 ns	2.36	3.34
2,4-D x TDZ	20	1.00	0.05	1.60 ns	1.75	2.20
ERROR	58	1.83	0.03			
TOTAL	89	3.79				

Grand Mean = 1.20 CV = 14.70 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
Block	2	3.57	1.78	16.48 **	3.15	4.98
2,4-D	4	0.66	0.16	1.53 ns	2.53	3.65
TDZ	5	1.12	0.22	2.08 ns	2.36	3.34
2,4-D x TDZ	20	2.21	0.11	1.02 ns	1.75	2.20
ERROR	58	6.29	0.10			
TOTAL	89	13.87				

Grand Mean = 1.95 CV = 16.88 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.14 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	12.14	6.07	50.17 **	3.15	4.98
2,4-D	4	0.90	0.22	1.87 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.93	0.18	1.54 ns	2.36	3.34
2,4-D x TDZ	20	0.81	0.04	0.34 ns	1.75	2.20
ERROR	58	7.02	0.12			
TOTAL	89	21.81				

Grand Mean = 2.49 CV = 13.93 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	4.24	2.12	19.45**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.79	0.19	1.83 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.24	0.04	0.44 ns	2.36	3.34
2,4-D x TDZ	20	2.81	0.14	1.29 ns	1.75	2.20
ERROR	58	6.33	0.10			
TOTAL	89	14.43				

Grand Mean = 1.51 CV = 21.81 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	4.22	2.11	24.45**	3.15	4.98
2,4-D	4	0.57	0.14	1.66 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.21	0.04	0.50 ns	2.36	3.34
2,4-D x TDZ	20	1.41	0.07	0.82 ns	1.75	2.20
ERROR	58	5.00	0.08			
TOTAL	89	11.43				

Grand Mean = 3.35 CV = 8.75 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.17 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	0.05	0.02	0.61 ns	3.15	4.98
NAA	4	0.37	0.09	2.12 ns	2.53	3.65
BA	5	0.44	0.08	1.99 ns	2.36	3.34
NAA x BA	20	0.89	0.04	1.00 ns	1.75	2.20
ERROR	58	2.59	0.04			
TOTAL	89	4.36				

Grand Mean = 1.20 CV = 17.57 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	0.84	0.42	2.56 ns	3.15	4.98
NAA	4	0.27	0.06	0.42 ns	2.53	3.65
BA	5	0.74	0.14	0.90 ns	2.36	3.34
NAA x BA	20	3.06	0.15	0.93 ns	1.75	2.20
ERROR	58	9.54	0.16			
TOTAL	89	14.47				

Grand Mean = 2.00 CV = 20.21 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	15.11	7.55	44.78**	3.15	4.98
NAA	4	0.05	0.12	0.76 ns	2.53	3.65
BA	5	1.35	0.27	1.61 ns	2.36	3.34
NAA x BA	20	2.54	0.12	0.75 ns	1.75	2.20
ERROR	58	9.78	0.16			
TOTAL	89	29.30				

Grand Mean = 2.53 CV = 16.21 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.20 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	3.89	1.94	15.56**	3.15	4.98
NAA	4	1.08	0.27	2.17 ns	2.53	3.65
BA	5	1.46	0.29	2.34 ns	2.36	3.34
NAA x BA	20	3.49	0.17	1.40 ns	1.75	2.20
ERROR	58	7.26	0.12			
TOTAL	89	17.20				

Grand Mean = 1.52 CV = 23.14 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	6.00	3.00	39.84**	3.15	4.98
NAA	4	0.89	0.22	2.98*	2.53	3.65
BA	5	0.26	0.05	0.70 ns	2.36	3.34
NAA x BA	20	4.85	0.24	3.22**	1.75	2.20
ERROR	58	4.36	0.07			
TOTAL	89	16.38				

Grand Mean = 3.43 CV = 7.99 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.22 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเท่ากันของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	0.24	0.12	2.77 ns	3.15	4.98
NAA	4	0.53	0.13	3.01*	2.53	3.65
TDZ	5	0.20	0.04	0.92 ns	2.36	3.34
NAA x TDZ	20	1.23	0.06	1.39 ns	1.75	2.20
ERROR	58	2.57	0.04			
TOTAL	89	4.80				

Grand Mean = 1.15 CV = 18.20 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	0.17	0.08	0.41 ns	3.15	4.98
NAA	4	0.75	0.18	0.92 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.45	0.09	0.44 ns	2.36	3.34
NAA x TDZ	20	5.00	0.25	1.21 ns	1.75	2.20
ERROR	58	11.97	0.20			
TOTAL	89	18.36				

Grand Mean = 1.82 CV = 24.91 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.24 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	26.81	13.40	47.07**	3.15	4.98
NAA	4	1.57	0.39	1.38 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.63	0.12	0.44 ns	2.36	3.34
NAA x TDZ	20	2.83	0.13	0.48 ns	1.75	2.20
ERROR	58	16.52	0.28			
TOTAL	89	48.27				

Grand Mean = 2.49 CV = 21.36 %

** ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.25 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	2.22	1.11	10.88**	3.15	4.98
NAA	4	0.22	0.05	0.55 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.74	0.14	1.45 ns	2.36	3.34
NAA x TDZ	20	3.31	0.16	1.62 ns	1.75	2.20
ERROR	58	5.92	0.10			
TOTAL	89	12.41				

Grand Mean = 1.35 CV = 23.63 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.26 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F .05	F .01
block	2	9.21	4.60	26.23**	3.15	4.98
NAA	4	1.50	0.37	2.14 ns	2.53	3.65
TDZ	5	0.08	0.01	0.10 ns	2.36	3.34
NAA x TDZ	20	4.04	0.20	1.15 ns	1.75	2.20
ERROR	58	10.15	0.17			
TOTAL	89	25.02				

Grand Mean = 3.22 CV = 13.00 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายสุเมธ ตรีศักดิ์ศรี เกิดเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม พ.ศ. 2520 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาพืชสวน จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้