การชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

CALLUS INDUCTION FROM PROTOPLASTS OF LOTUS (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CV. "BUNTHARIK"

จิตสมัย เหมังคิศ

JITKASEM TANGSIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชสวน

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-1788-6

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

CALLUS INDUCTION FROM PROTOPLASTS OF LOTUS (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CV. "BUNTHARIK"

T 060930

จิตเกษม เทียงจิตต์

JITKASEAM THIENGJIT

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 60930
วัน,เดือน,ปี - 7 ม.ค. 2549

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-1786-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b.....
i.....

CALLUS INDUCTION FROM PROTOPLASTS OF LOTUS (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CV. "BUNTHARIK"

JITKASEAM THIENGJIT

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
2005

ISBN 974-15-1786-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2005

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจิตเกษม เที่ยงจิตต์
รหัสประจำตัว	43066224
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	พืชสวน
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุเม อรัญนารถ

บทคัดย่อ

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase เข้มข้น1 และ 2% (w/v) Cellulase เข้มข้น 2 และ 4% (w/v) ร่วมกับ Pectolyase เข้มข้น 0.1 และ 0.2% (w/v) และ ความเข้มข้นของ mannitol 5 ระดับ คือ 0.4 0.5 0.6 0.7 และ 0.8 M ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์ และ ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง 4 สูตร คือ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตรV-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และ วิธี agarose bead จากนั้นศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 สูตร คือ สูตรNAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM สูตรNAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM สูตรNAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM และ สูตรNAA 10.7µM และศึกษาการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ การเลี้ยงด้วยวิธีliquid over agarose วิธีfeeder cell และ วิธีnurse culture ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ และศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ โดยทำการลดออสโมติคัมทุก ๆ 1 2 3 4 5 6 และ 7 วันของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาพบว่าสามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุดในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% (w/v) Cellulase 4% (w/v) ร่วมกับ Pectolyase 0.1% (w/v) mannitol 0.7 M และ MES 5 mM (pH 5.7) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แคลลัสสามารถปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ได้จำนวน 4.33 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด มีความมีชีวิต 82.92% และ เมื่อนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลงKM8P(B) ที่เติม NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM ด้วยวิธี thin layer โดยไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยง และลดออสโมติคัมทุกๆ 1 วันหลังการเพาะเลี้ยง มีผลให้มีเซลล์แบ่งตัวแบบกลุ่มสูงที่สุด คือ 0.67% และเมื่อรวมลักษณะเซลล์แบบอื่นๆ (เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง และเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม) พบว่ามีค่าสูงที่สุด คือ 7.70%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Callus Induction from Protoplasts of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. "Buntharik"
Student	Miss Jitkaseam Thiengjit
Student ID	43066224
Degree	Master of Science
Programme	Horticuture
Year	2005
Thesis Advisor	Assist Prof. Dr. Sumay Arunyanart

ABSTRACT

Effect of enzyme solutions [2 or 4% (w/v) cellulase, 1 or 2% (w/v) pectinase, 0.1 or 0.2% (w/v) pectolyase] and osmoticum (0.4, 0.5, 0.6, 0.7 and 0.8 M mannitol) were investigated for protoplasts isolation from callus of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv.Buntharik. The protoplasts were cultured on modified medium [modified KM8P(B), modified MS(A), modified V-KM(A) and modified V-KM(B)] combined with culture methods (thin layer, liquid over agarose and agarose bead) and growth regulators (50 µM NAA + 0.25 µM TDZ, 2.5 µM NAA + 2 µM BA, 5 µM NAA + 0.005 µM TDZ and 10.7µM NAA). The nurse cells (carrot and tobacco) combined with culture methods (liquid over agarose, feeder cell and nurse culture) were also studied for protoplast growth. The osmoticum was reduced at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days of incubation for protoplast division.

The highest protoplast viability (82.92%) and protoplast yield ($4.33x10^4$ protoplasts/g.f.wt) were obtained from the enzyme solutions containing 2% (w/v) pectinase, 4% (w/v) cellulase, 0.1% (w/v) pectolyase, 0.7 M mannitol and 5 mM MES (pH 5.7) for 2 hours. The greatest percentage (0.67%) of protoplasts formed microcolony and percentages (7.70%) of protoplast growth (budding, multiple budding, changed form division, cell with appendixes, two-cell division and three-cell division) were achieved when cultured on modified KM8P(B) supplemented with 2.5 µM NAA and 2 µM BA and cultured on thin layer method without nurse cell with the reduction of osmoticum at 1 day of incubation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเม อรัญนารถ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการศึกษาทดลอง ตลอดจนจัดหาอุปกรณ์การทดลองและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการทำการทดลอง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ พี่ไก่ พี่แอ๊ด พี่อาร์ท เพื่อน และน้องๆ ทุกคน ที่สนับสนุนช่วยแหลือ เป็นกำลังใจจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรโดยงบประมาณของโครงการวิจัยย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

จิตเกษม เที่ยงจิตต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VI

สารบัญภาพ X

คำย่อและสัญญาลักษณ์ XI

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตการศึกษา 2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา 3

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 โปรโตพลาสต์ 4

2.2 แคลลัส 8

2.3 รายงานการสกัดและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เกี่ยวข้อง 9

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง 16

3.1 อุปกรณ์ 16

3.2 วิธีการ 17

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลอง 27

4.1 ผลการทดลอง 27

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง 61

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 65

บรรณานุกรม 66

ภาคผนวก 71

ภาคผนวก ก 72

ภาคผนวก ข 74

ประวัติผู้เขียน 91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	28
4.2	ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิต	31
4.3	ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเพาะเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	38
4.4	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	45
4.5	ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	53
4.6	ผลของระยะเวลาการลดระดับออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	59
ก.1	องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์	72
ข.1	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 2	74
ข.2	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 4	74
ข.3	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 6	74
ข.4	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 8	75
ข.5	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 2	75
ข.6	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 4	75
ข.7	วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 6	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.8 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิต ของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 8 76

ข.9 วิเคราะห์ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อจำนวนของ โปรโตพลาสต์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 76

ข.10 วิเคราะห์ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อความมีชีวิต ของโปรโตพลาสต์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 77

ข.11 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 77

ข.12 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 78

ข.13 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างแปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 78

ข.14 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 79

ข.15 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 79

ข.16 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 80

ข.17 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะ ของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 80

ข.18 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 81

ข.19 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.20 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 81

ข.21 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 82

ข.22 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 82

ข.23 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 82

ข.24 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 83

ข.25 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 83

ข.26 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 84

ข. 27 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 84

ข.28 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 85

ข.29 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 85

ข.30 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 86

ข.31 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.32 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 87

ข.33 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 87

ข.34 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 88

ข.35 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 88

ข.36 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 88

ข.37 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 89

ข.38 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 89

ข.39 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 89

ข.40 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$ 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์และระยะเวลาการสกัดต่อจำนวนโปรโตพลาสต์	29
4.2	ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์และระยะเวลาการสกัดต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	29
4.3	แสดงลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่พบในการสกัดโปรโตพลาสต์	30
4.4	ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์	32
4.5	ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์	32
4.6	ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเพาะเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	39
4.7	ลักษณะของผนังเซลล์ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง	39
4.8	ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีสีน้ำตาลเข้ม	40
4.9	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบแตกหน่อเดียว	40
4.10	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบแตกหลายหน่อ	40
4.11	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	41
4.12	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบเกิดระยางค์	41
4.13	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง	41
4.14	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	45
4.15	ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	53
4.16	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม	55
4.17	ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบ่งแบบกลุ่ม	55
4.18	ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

%	percentage
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
BA	6-benzyladenine
NAA	Naphthalene acetic acid
TDZ	Thidiazuron
MS	Murashige and Skoog (1962)
CPW	cell and protoplast wash solution
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
PVP-10	polyvinylpyrrolidone (MW 10,000)
rpm	revolutions per minute

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นไม้ตัดดอกที่มีรูปทรงสวยงาม และกำลังได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก ดังจะเห็นได้จากการมีพื้นที่ปลูกบัวหลวงเชิงการค้าทั่วประเทศไทย ถึง 1,915 ไร่ (ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร. 2541) นอกจากเป็นไม้ตัดดอกแล้ว บัวหลวงยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางยาได้ด้วย เช่น เกสรตัวผู้เป็นยาหอมบำรุงหัวใจ บำรุงประสาท ชูกำลัง ดีบัวมีสารอัลคาลอยด์ช่วยขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ เมล็ดบัวช่วยบำรุงครรภ์ บำรุงกำลัง (คณิตา เลขะกุล. 2535) ยางจากก้านใบและดอกแก้ท้องเดิน รากบัวต้มแก้กระหายน้ำ แก้เสมหะ (คณิตา เลขะกุล. 2535; สุนทรี สิงหบุตรา. 2536) บัวหลวงนั้นเป็นพืชน้ำอายุหลายปี อยู่ในวงศ์ Nymphaceae (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา เลขะกุล. 2535) อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเม อรัญนารถ. 2537) จีน ทิเบต และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย(Core. 1955) ซึ่งในประเทศไทยมีบัวหลวงเพียงชนิดเดียว มี 8 สายพันธุ์ คือ บุณฑริก ปทุม บัวเข็มสีชมพู บัวปักกิ่งชมพู สัตตบงกช บัวเข็มสีขาว บัวปักกิ่งขาว และ สัตตบุษย์ (ณพพร ดำรงศิริ. 2530; สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520)

สำหรับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. " Buntharik") เป็นบัวหลวงที่มีลักษณะดอกใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ดอกรา กลีบมีสีขาว ดอกมีกลิ่นหอมอ่อนๆ บานเวลากลางวัน (เสริมลาภ วสุวัต. 2537; สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520) บัวหลวงเป็นดอกไม้ที่มีอายุการใช้งานสั้น ประมาณ 2-3 วัน (โอฬาร พิทักษ์. 2539)และในประเทศไทยพบเพียง 2 สีเท่านั้น คือ สีขาว และสีชมพู (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงให้มีความหลากหลายมากขึ้น ทั้งทางด้าน สี รูปทรง และปรับปรุงให้มีการใช้งานได้ยาวนานขึ้น ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชมากขึ้น เนื่องจาก โปรโตพลาสต์สามารถดูดซับสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในไซโตพลาสซึมได้ จึงใช้โปรโตพลาสต์สำหรับถ่ายทอดชิ้นส่วนของ ดี เอน เอ หรือยีนส์ที่มีลักษณะตามต้องการเข้าไป หรือการผสมโปรโตพลาสต์ของพืช 2 ชนิดเพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีความหลากหลายมากขึ้น (อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541) ซึ่งสิ่งที่สำคัญเกี่ยวกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้ประสบผลสำเร็จสูงสุด ก็คือ ต้องสามารถสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้ได้ปริมาณมากๆ และสามารถทำให้โปรโตพลาสต์นั้นแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (ละออ เส็งประชา. 2542; Chen *et*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al. 1990) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการสกัดและชักนำให้โปรโต-พลาสต์เกิดเป็นแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1.เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.2.2.เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกพัฒนาเป็นแคลลัส

1.2.3.เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกพัฒนาเป็นแคลลัส

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1.ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาสกัดโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 1 และ 2% Cellulase 2 และ 4% ร่วมกับ Pectolyase 0.1 และ 0.2%

1.3.2.ศึกษาระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาสกัดในสารละลายเอ็นไซม์ที่เหมาะสมที่เติม mannitol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.4 0.5 0.6 0.7 และ0.8 M

1.3.3.ศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส โดยนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตรV-KM(A) และ สูตรV-KM(B)ร่วมกับวิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และ วิธีagarose bead

1.3.4.ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 สูตร คือ สูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM สูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM สูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM และ สูตรที่ 4 NAA 10.7 µM

1.3.5.ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับวิธีการเลี้ยงต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส โดยนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงร่วมกับการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ แครอท และ ยาสูบ และวิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีfeeder cell วีธีliquid over agarose และ วิธี nurse culture

1.3.6.ศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยลดความเข้มข้นของออสโมติคัมด้วยการเติมอาหารที่ไม่มี mannitol ทุกๆ 1 2 3 4 5 6 และ7 วันของการเพาะเลี้ยง

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1.ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.4.2.ศึกษาระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.4.3.ศึกษาชนิดของสูตรอาหาร วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และการใช้เซลล์พี่เลี้ยงต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

1.4.4.ศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

1.4.5.วิเคราะห์ผลและจัดทำรูปเล่ม

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1.ทราบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

1.5.2.ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและชักนำให้โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกพัฒนาเป็นแคลลัส

1.5.3.ทราบวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและชักนำให้โปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกพัฒนาเป็นแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ (protoplast) หมายถึง เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์(รังสฎษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540; คำนูญ กาญจนภูมิ. 2524; อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541) มีเพียงเยื่อบาง ๆ (plasma membrane) หุ้มรอบนอก(อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541) ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์พืชทุกชนิดนอกจากจะมีผนังเซลล์ที่เป็นเซลล์เมมเบรนแล้ว ยังมีผนังอีกชั้นหนึ่งเรียกว่า cell wall ประกอบด้วยสารจำพวกเซลลูโลส(cellulose) และเฮมิเซลลูโลส(hemicellulose)ผนังเซลล์ของพืชจะเชื่อมติดกันด้วยชั้น middle lamella ซึ่งประกอบด้วยสารพวกเพคติน(pectin) (รังสฎษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540) เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์มาห่อหุ้ม ดังนั้นโปรโตพลาสต์ จึงเป็นหน่วยของสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ซึ่งเซลล์ปกติที่มีผนังเซลล์ไม่อาจทำได้ เช่นการใส่ชิ้นส่วนของ ดี เอน เอ หรือยีนส์ที่ต้องการเข้าไปในโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้การรวมโปรโตพลาสต์ยังมีประโยชน์ในการผลิตลูกผสมระหว่างพ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจนไม่สามารถผสมข้ามพันธุ์ตามธรรมชาติได้ (ประภา ศรีพิจิตต์. 2536)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์

1. **ชนิดของเนื้อเยื่อและสภาพของพืชที่นำมาสกัดโปรโตพลาสต์** แม้ว่าการสกัดโปรโตพลาสต์ จะสามารถแยกได้จากส่วนต่างๆของพืช เช่น ยอดอ่อน ใบเลี้ยง ราก ลำต้น กลีบดอก ละอองเกสรตัวผู้ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง เอนโดสเปิร์ม ผล เป็นต้น แต่เนื้อเยื่อที่นิยมใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ คือ ใบ แคลลัส และ เซลล์แขวนลอย เนื่องจากสามารถสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อดังกล่าวได้จำนวนมากและโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ สามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (ละออ เส็งประชา. 2542) นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อแล้ว สภาพของพืชที่นำมาสกัดโปรโตพลาสต์ก็มีส่วนอย่างมากโดยเฉพาะในแง่ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้ เช่น พืชที่มีอายุมากจะให้โปรโตพลาสต์น้อยกว่าพืชที่มีอายุน้อย หรือถ้าพืชนั้นอยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตเร็ว โอกาสที่จะได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากและสามารถเลี้ยงได้รอดก็สูงตามไปด้วย (ประสาทพร สมิตะมาน. 2541)

2. **ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซีส** พืชแต่ละชนิดมีแรงดันออสโมซีสแตกต่างกัน ชนิดของสารเคมีที่นำมาใช้บางชนิดอาจเหมาะสมกับพืชชนิดหนึ่ง แต่อาจไม่เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นก็ได้ สารที่ใช้ในการรักษาความดันออสโมซีสที่ เซลล์พืชอาจนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ประโยชน์ได้ เช่น glucose หรือ sucrose หรือไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น mannitol (ประสาทพร สมิตะมาน. 2541)

3. **องค์ประกอบภายในเซลล์พืช** องค์ประกอบในที่นี้หมายถึงสารประกอบบางอย่างที่พืชสะสมไว้ภายในเซลล์ ไม่ว่าจะในรูปของผลึก หรือในรูปของสารละลายเข้มข้น เพราะจะมีผลต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์ หลังจากสกัดได้แล้ว

4. **เทคนิคการสกัดโปรโตพลาสต์** เนื่องจากพืชแต่ละกลุ่มต้องการเทคนิคในการสกัดโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน เช่น ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเราไม่สามารถลอกเอาเซลล์ชั้นนอกออกได้ ต้องใช้วิธีหั่นให้เป็นฝอยแทน ซึ่งพบว่าถ้าหั่นชิ้นหนาเกินไป จะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์น้อยตามไปด้วย การสกัดโดยวิธีอาศัยการเขย่าช่วยก็เช่นกัน ถ้าปรับจำนวนรอบสูงเกินไป ก็จะทำให้โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก ถ้าปรับให้ช้าเกินไป จะเสียเวลานานในการสกัด

5. **อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด** ปัจจัยในข้อนี้ ไม่ค่อยมีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์มากนัก แต่การปรับให้อุณหภูมิสูงเกินไป จะทำให้เอ็นไซม์เสื่อมคุณสมบัติ หรือทำให้โปรโตพลาสต์เสียชีวิตหมด อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิสูงประมาณ 30 องศาเซลเซียส จะช่วยทำให้เวลาที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์สั้นลงกว่าอุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) เนื่องจากว่าในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเหมาะสมกับการทำงานของเอ็นไซม์

6. **บุคคลที่สกัดโปรโตพลาสต์** การศึกษาเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์เป็นงานที่ต้องการความละเอียด และความใจเย็นอย่างยิ่ง ถ้าผู้สกัดโปรโตพลาสต์ขาดคุณสมบัติทั้ง 2 ประการนี้ จะทำการศึกษาให้ดีได้ยาก

7. **ชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ใช้** ชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ จะมีส่วนประกอบต่างกันไปตามชนิดของพืช และชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ เอ็นไซม์ที่นิยมใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) เพกติเนส (pectinase) มาเซอโรไซม์ (macerozyme) และเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) (ละออ เส็งประชา. 2542) Cellulase RS เป็นเอ็นไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุดในกลุ่มเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อย cellulose สามารถใช้ได้ดีกับเซลล์ที่เลี้ยงในห้องทดลอง หรือพืชที่มีผนังเซลล์หนามากๆ Macerase เป็นเอ็นไซม์ที่ใช้มากที่สุดในการย่อยสลาย pectin แต่ถ้าพืชมีผนังเซลล์หนามาก หรือมี pectin ที่ย่อยสลายยากกว่าปกติ มักนิยมใช้ Pectolyase Y23 แทน(ประสาทพร สมิตะมาน. 2541)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

1. **อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์** จะคล้ายคลึงกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป แต่เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์จึงสามารถดูดเกลือแร่ต่างๆ จากอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงควรดัดแปลงให้มีอนิน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรีย์สารในปริมาณต่ำ สูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มากที่สุด คือ 8p(Kao and Michayluk. 1975) และ NT(Nagata and Takebe. 1971)

2. **ออสโมติคัม** (osmoticum) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องควบคุมแรงดันออสโมซิสจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ การควบคุมแรงดันออสโมซิสของอาหารทำได้โดยการเติมน้ำตาลแมนนิทอลหรือซอร์บิทอลความเข้มข้น 500-600 มิลลิโมลต่ออาหาร1ลิตร ในพืชบางชนิดอาจใช้กลูโคสหรือซูโครสแทนได้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปนานประมาณ 7-10 วัน โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาและมีการแบ่งเซลล์ 2-3 ครั้ง ระยะนี้ควรปรับแรงดันออสโมซิสของอาหารให้ค่อย ๆ ลดลง โดยการเติมอาหารที่ไม่มีสารออสโมติคัมหรือมีในปริมาณที่น้อยลง และย้ายลงอาหารที่ไม่มีสารออสโมติคัมเมื่อมีการสร้างโคโลนี

3. **ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง** โดยทั่วไปโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงควรมีความหนาแน่น 1×10^4 ถึง 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ถ้ามีความหนาแน่นมากเกินไป เมื่อแต่ละโปรโตพลาสต์เจริญเป็นโคโลนีอาจเกิดการลุกล้ำเข้าไปในโคโลนีของกันและกัน ทำให้เกิดเนื้อเยื่อหรือกลุ่มเซลล์ที่เป็นไคเมอรา

4. **วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์** (รังสฎษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540)

4.1 **การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว**(Culturing in liquid media)

4.1.1 แบบ Drop Culture หรือ Hanging / Sitting Drop Culture โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารให้มีความหนาแน่นประมาณ $5x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร แล้วใช้ automatic pipette เพื่อหยดสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ลงบนฝาด้านในของจานแก้วให้ได้หยดขนาดเล็กประมาณ 20-40 µl ปิดฝาจานแก้วแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟินเพื่อเก็บรักษาความชื้นภายใน

4.1.2 แบบ Microchamber Culture โดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในช่องเล็กๆ ที่เกิดจากการใช้กระจกปิดสไลด์ 3 แผ่น วางทับและยึดติดกันด้วย mineral oil หรือใช้สไลด์หลุมปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

4.1.3 แบบ Multiple Drop Array โดยหยดโปรโตพลาสต์ขนาดประมาณ 40 µl หลายๆ หยด ลงบนฝาครอบด้านในของจานแก้ว ปิดฝาครอบแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิน

4.1.4 แบบ Microdroplets Culture โดยหยดโปรโตพลาสต์ขนาดเล็กๆประมาณ 0.25-0.5 µl แต่ละหยดให้มีเพียง 1 เซลล์ ลงบนจานแก้วปิดฝาครอบแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิน

4.1.5 แบบ Liquid Culture โดยเลี้ยงสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์ความหนาแน่นประมาณ 5×10^4 ถึง 5×10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร ในจานแก้ว ปิดฝาครอบแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 แบบ Feeder Layer โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนกระดาษกรองที่พับโค้งเป็นรูปสะพาน ที่มีปลาย 2 ข้างจุ่มอยู่ในอาหารเหลวเพื่อดูดซับอาหาร

4.1.7 แบบ Nurse Culture โดยใช้แคลลัสเป็นตัวช่วยในการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากในระยะแรกโปรโตพลาสต์ ยังไม่สามารถผลิตสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง แล้วหยดโปรโตพลาสต์บนกระดาษกรองที่วางทับบนผิวแคลลัส

4.1.8 แบบ Reservoir Media Culture โดยแบ่งพื้นที่ในจานแก้วเป็นช่องอาหารส่วนหนึ่งสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และมีช่องอาหารสำรองไว้อีกส่วนหนึ่ง

4.1.9 แบบ Liquid on Agar Culture โดยเลี้ยงสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์เป็นชั้นบางๆ ประมาณ 5 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ในจานแก้วที่มีอาหารวุ้นปริมาตร 8 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ แล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิน

4.2 **การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง** (Culturing on semisolid media)

4.2.1 ใช้วุ้น ประมาณ 2-4% เป็นตัวทำให้กึ่งแข็ง โดยหลอมที่ 43-45 องศาเซลเซียส แล้วผสมกับโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว

4.2.2 ใช้ Agarose หรือ Alginate ซึ่งได้แก่ agarose alginate k-carageen gelatin และ polyacrylamide แทนการใช้วุ้น

4.3 **การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง** (Culturing on solid media)

4.3.1 แบบ Filter Paper Disc on Agar Media โดยเทอาหารแข็งลงในจานแก้วแล้ววางกระดาษกรองทับเพื่อดูดซับอาหาร จากนั้นหยดโปรโตพลาสต์ลงบนกระดาษกรอง

4.3.2 แบบ Agar Drop Culture โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งในจานแก้ว แล้วเตรียมอาหารที่มีสภาพแข็งกว่ามาหยดลงในหยดของโปรโตพลาสต์เดิมให้เป็นอาหารสำรอง

4.3.3 แบบ Agar Culture ทำโดยการนำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวผสมกับอาหารที่มีวุ้น 1-2% ในปริมาณที่เท่ากัน แล้วเทอาหารวุ้นที่มีโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนจานแก้ว ปิดผนึกฝาจานแก้วด้วยพาราฟิน การเลี้ยงวิธีนี้ชั้นของอาหารวุ้นจะต้องบางเพื่อให้โปรโตพลาสต์ได้รับอากาศเพียงพอ(ประภา ศรีพิจิตต์. 2536)

5. **สภาพการเก็บรักษาโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง** อาจเก็บรักษาไว้ในที่มืดหรือที่มีแสงสลัวๆ โปรโตพลาสต์ของพืชบางชนิดไวแสงมาก ดังนั้นจึงต้องเก็บรักษาไว้ในที่มืดสนิทก่อนประมาณ 4-7 วัน พอโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์แล้วและสามารถทนทานต่อแสงได้จึงนำมาเก็บรักษาไว้ที่มีแสง โดยทั่วไปเราจะเก็บรักษาโปรโตพลาสต์ไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม(รังสฎษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540; คำนูญ กาญจนภูมิ. 2524) เป็นกลุ่มของเซลล์พาเรนไคมาที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์และฟลาโวทีนอยด์ หรือ สีม่วงจากแอนโทไซยานิน (รังสฎษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540) ลักษณะของแคลลัสแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ แคลลัสชนิดที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นแยกจากกันได้ยาก เรียกว่า compact callus หรือ hard callus และแคลลัสชนิดที่กลุ่มเซลล์เกาะกันอยู่หลวมๆแยกจากกันได้ง่าย เรียกว่า friable callus หรือ solf callus พืชชนิดเดียวกันอาจให้แคลลัสเป็นทั้งแบบ ซอฟต์หรือฮาร์ด และอาจเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างกันได้ ขึ้นอยู่กับอาหารที่เลี้ยง(คำนูญ กาญจนภูมิ. 2524)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฎษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540)

1. **ขนาดและรูปร่าง** ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยง ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก

2. **สารควบคุมการเจริญเติบโต** โดยเฉพาะออกซิน และไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยถ้าสัดส่วนมีความสมดุลกันจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่นำมาใช้ โดยความเข้มข้นของออกซิน อยู่ในช่วง 0.01 – 10 มิลลิกรัม/ลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์อยู่ในช่วง 0.01 – 10 มิลลิกรัม /ลิตร

3. **ธาตุอาหาร** นอกจากต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่วๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอนปาติน อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดิน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย

4. **แหล่งของคาร์บอนที่สำคัญ** ได้แก่ น้ำตาลซูโครส และ/หรือแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4%

5. **ปัจจัยสิ่งแวดล้อม** โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วยสภาพอาหาร แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 รายงานการสกัดและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เกี่ยวข้อง

จตุพร กุลอึ้ง (2540) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น และการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า การนำเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสไปสกัดโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 1% (w/v) Pectolyase Y 23 0.1% (w/v) MES 5 mM mannitol 0.7 M และ $CaCl_2 .2H_2O$ 0.01 mM (pH 5.8) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แคลลัสสามารถปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาหนาแน่นสูงสุดคือ 32.49 X 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดแคลลัส เมื่อนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige and Skoog .1962) ที่เติม 2,4-D 2 mg/l โพรลีน 10 mM sucrose 3% และ agarose 1% ทั้งที่มีและไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ได้ใหม่ และสามารถแบ่งเป็น 2 เซลล์ได้

มณฑารพ สุธาธรรม (2540) ทำการศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่า สามารถสกัดโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกได้จากใบอายุ 9 วันขึ้นไป โดยแช่ในสารละลาย เอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 2% (w/v) Macerozyme Onozuka R-10 1% (w/v) และ mannitol 0.5 M (pH 5.8) เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ประภา ศรีพิจิตต์ และ เสาวรี ตังสกุล (2543) ศึกษาการสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากแหล่งของเซลล์ 3 แหล่ง ได้แก่ ใบจากต้นกล้าข้าว แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ และเซลล์แขวนลอย พบว่า แคลลัสและเซลล์แขวนลอยจะปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงเมื่อแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 4% (w/v) Macerozyme R-10 1% (w/v) Pectolyase 0.2% (w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยมีความมีชีวิต (80-90%) สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและแคลลัส (50-60%)

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี (2544) ศึกษาระดับความเข้มข้นของ osmoticum และระดับความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่า การนำใบบัวหลวงอายุ 9 วันมา สกัดโปรโตพลาสต์โดยแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 2% (w/v) Macerozyme Onozuka R-10 1% (w/v) mannitol 0.7 M (pH 5.8) มีความเหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์มากที่สุด

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี (2546) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ใบในสภาพปลอดเชื้อมาสกัดโปรโตพลาสต์ โดยแช่ใบในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 2% (w/v) Macerozyme Onozuka R-10 1% (w/v) และ MES 5 mM ในสารละลาย CPW ที่เติม mannitol 0.5 M (pH 5.4) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สกัดได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลงและที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่างๆ พบว่า การใช้อาหารสูตร KM8P(B) และใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 2.5 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มากที่สุด และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว KM8P(B)ที่เติม NAA 2 mg/l จะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์มากที่สุด

Logan and Sink (1988) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Petunia alpicola* โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัส ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulysin 2% (w/v) Macerase 2% (w/v) Driselase 2% (w/v) mannitol 8% (pH 5.8) เป็นเวลา 17-19 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 mg/l NAA 0.5 mg/l BA 0.5 mg/l และ น้ำมะพร้าว 20% พบว่า โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ plating efficiency เป็น 85%

Li *et al.* (1990) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากส่วนใบเลี้ยงของ Xinjiang muskmelon โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 2% (w/v) Macerozyme R-10 0.5% (w/v) mannitol 0.4 M $CaCl_2 .2H_2O$ 10 mM KH_2PO_4 0.7 mM (pH 5.6) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยง โดยทดสอบวิธีการเลี้ยง 3 วิธี ได้แก่ thin liquid culture, liquid on agar double culture และ agarose bead culture ที่ร่วมกับการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 3 ชนิด ได้แก่ ยาสูบ ข้าว และข้าวโพด พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี agarose bead culture ร่วมกับการใช้เซลล์ของยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุด

Ochatt (1990) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ sour cherry (*Prunus cerasus* L.) โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัส ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Meicelase 2% (w/v) Rhozyme HP-150 2% (w/v) Macerozyme R-10 0.03% (w/v) MES 5 mM เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยง โดยทดสอบวิธีการเลี้ยง 3 วิธี ได้แก่ liquid culture, semi-solid culture และ semi-solid droplet พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี semi-solid droplet ให้ผลดีที่สุด

Punja *et al.* (1990) ศึกษาการสกัด การเพาะเลี้ยง และการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของแตงกวา โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบเลี้ยงและใบ ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 1.25% (w/v) Cellulysin 0.5% (w/v) และPectinase 0.5% (w/v) Cellulysin 1% (w/v)ตามลำดับ และนำโปรโตพลาสต์ไปทดสอบวิธีการเลี้ยง 3 วิธี ได้แก่ liquid culture, droplet culture และ agarose embedded culture พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี agarose embedded culture โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ plating efficiency เป็น 28.3% และ 15% สำหรับสายพันธุ์ 3672 และ 3676 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dhir *et al.* (1991) ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากส่วนใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.5% (w/v) Pectolyase Y 23 0.2% (w/v) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงในอาหาร KP8 ดัดแปลงทั้งแบบในอาหารเหลว และใน agarose medium พบว่า วิธีการเลี้ยงแบบอาหารเหลว โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ plating efficiency เป็น 45-50% และ 55-60% เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี agarose 1.2%

Oliveira and Pais (1991) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayword) โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัส ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.5% (w/v) Macerozyme R-10 0.5% (w/v) mannitol 0.45 M MES 3 mM (pH 5.7) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่บริสุทธิ์มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร PA1[SH(Schenk and Hildebrandt. 1972) + glucose 0.4 M+MES 97 mg/l + cystein 50 mg/l + 2,4-D 1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l pH5.8] หรือ PD1(PA1 + NAA1.5 mg/l + 2,4-D 0.05 mg/l + kinetin 0.1 mg/l) โดยทดสอบวิธีการเลี้ยง 4 วิธี ได้แก่ liquid culture, alginate embedding, agarose embedding, liquid medium over agarose solid medium พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี liquid medium over agarose solid medium โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ และสามารถที่จะพัฒนาต่อเป็นยอดและรากได้

Xiu *et al.* (1991) ศึกษาการสกัดและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อแคลลัสของ *Hibiscus syriacus* L. พบว่า แคลลัสจะปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นที่สูงเมื่อแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka 3% (w/v) Macerozyme Onozuka 1% (w/v) Hemicellulase 0.5% (w/v) Potassium dextran sulphate 0.3% mannitol 0.5 M (pH 5.7) เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 mg/l Kinetin 0.1 mg/l และ mannitol 0.5 M โดยทดสอบวิธีการเลี้ยง 3 วิธี ได้แก่ liquid droplet, liquid thin layer และ agar medium culture พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี liquid thin layer เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกภายในวันที่ 2-3 หลังจากเพาะเลี้ยง

Datta *et al.* (1992) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของข้าว สายพันธุ์ IR72 โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 4% (w/v) Macerozyme R-10 1% (w/v) Pectolyase Y 23 0.02% (w/v) mannitol 0.4 M $CaCl_2$ 6.8 mM (pH 5.6) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในอาหาร PR1 (N6 medium + porline 1 g/l + sucrose 0.4 M + 2,4-D 1.5 mg/l) ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธี agarose bead method โปรโตพลาสต์ มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกภายในวันที่ 4 และสร้างเป็นโคโลนีในวันที่ 12-16

Park and Son (1992) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นยอดจากโปรโตพลาสต์ของ hybrid poplar (*Populus nigra* x *P.maximowiczii*) โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบ ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 2% (w/v) Macerozyme R-10 0.8% (w/v) Hemicellulase 1.2% (w/v) Driselase 2% (w/v) Pectolyase Y 23 0.05% (w/v) mannitol 0.6 M DTT 0.002 M MES 3 mM (pH 5.6) และนำโปรโตพลาสต์ไปทดสอบวิธีการเลี้ยง 4 วิธี ได้แก่ hanging drop, liquid drop, liquid plating และ semi-solid agar plating พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี semi-solid agar plating โปรโตพลาสต์มีการเกิดโคโลนีสูงที่สุด (22.8%)

Terakawa *et al.* (1992) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ creeping bentgrass (*Agrostic palustris* Huds.) โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 2% (w/v) Macerozyme R-10 0.3% (w/v) Pectolyase Y 23 0.1% (w/v) $CaCl_2$ 10 mM mannitol 8% MES 0.1% sucrose 3% (pH 5.8) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ไปเพาะเลี้ยงโดยทดสอบการเติมหรือไม่เติม condition medium (embryogenic cell suspension) ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง พบว่า การเติม condition medium มีส่วนสำคัญในการสร้างและเจริญเติบโตของโคโลนี

Cai *et al.* (1993) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัส ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 2% (w/v) Macerozyme R-10 0.5% (w/v) mannitol 0.7 M $CaCl_2$ 1 mM (pH 5.4) เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในอาหาร TCCW(Tsai *et al.* 1977) ดัดแปลง โปรโตพลาสต์จะมีปริมาตรเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2-3 วัน และมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเกิดขึ้นในวันที่ 10

Dunbar (1993) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Pelargonium* spp.(Geranium) โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัส ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulysin 2% (w/v) Macerase 0.5% (w/v) sucrose 0.5 M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P/KP พบว่า โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกภายใน 48 ชั่วโมง และสร้างเป็นโคโลนี (50 เซลล์)หลังจากเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์

Kitamura (1993) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Dubosia* โดยสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectolyase Y 23 0.2% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 1% (w/v) Driselase 1% (w/v) glucrose 0.5 M $CaCl_2$ 3.4 mM NaH_2PO_4 0.35 mM DTT 2 mM จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลว B5 ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D 1 mg/l Zeatin 1 mg/l น้ำมะพร้าว และ condition medium (suspension อายุ 4 วัน ที่แยกเอาเซลล์ออกแล้ว) เลี้ยงไปจนกระทั่งเป็น protocolonies (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-1 มิลลิเมตร) จึงย้ายลงในอาหารใหม่ที่ลดความเข้มข้นของออสโมติคัมลงจาก 0.4 เป็น 0.2 ที่ไม่มีน้ำมะพร้าวและcondition medium จนกระทั่งได้โคโลนี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร) จึงย้ายลงอาหารแข็ง MS ที่มี 2,4-D 1 mg/l sucrose 3% เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

Niizeki (1993) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Lotus* spp. (Birdsfoot trefoil). โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนแคลลัส ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 4% (w/v) Macerozyme R-10 1% (w/v) Pectolyase Y 23 0.2% (w/v) mannitol 0.7 M (pH 5.8) เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำ โปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P ที่เติม BA 0.5 mg/l และไม่เติมน้ำมะพร้าว พบว่า โปรโตพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกในวันที่ 7

Wei and Xu (1993) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ Sorghum (*Sorghum vulgare.*) โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 3% (w/v) Macerozyme R-10 0.5% (w/v) Pectolyase Y 23 0.1% (w/v) mannitol 0.6 M $CaCl_2.2H_2O$ 7 mM KH_2PO_4 0.7 mM (pH 5.7) เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในอาหาร K8P(Kao. 1977) ที่เติม 2,4-D 1 mg/l glucose 0.55 M โปรโตพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4-5 วัน และสร้างเป็นโคโลนีที่สามารถมองเห็นได้ภายใน 6-8 สัปดาห์หลังจากการเลี้ยง

Cazaux and Auzac (1994) ศึกษาการสร้างแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส ของ *Hevea brasiliensis*. โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.5% (w/v) Macerozyme R-10 0.5% (w/v) MES 3 mM BSA 0.5% (pH 5.6) เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 9 µM Kinetin 0.93 µM glucose 0.6 M และลดปริมาณ NH_4^+ ลงครึ่งหนึ่ง โดยทดสอบวิธีการเลี้ยงแบบต่างๆ พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี liquid culture และ agarose medium culture โปรโตพลาสต์ไม่มีการแบ่งเซลล์และจะตายในที่สุด แต่ถ้าเลี้ยงด้วยวิธี alginate bead ร่วมกับการใช้ feeder cell layer ของยาสูบ โปรโตพลาสต์จะมีความมีชีวิต 33% และมีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ในขณะที่ การไม่ใช้ feeder cell layer โปรโตพลาสต์จะมีการแบ่งเซลล์เพียง 0.01% เท่านั้น

Krautwig *et al.* (1994) ศึกษาผลของสารละลายเอ็นไซม์ต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และการแสดงออกของยีนส์ในข้าวโพด โดยศึกษาสารละลายเอ็นไซม์ 2 สูตร คือ CP ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 1% (w/v) Pectolyase Y 23 0.075% (w/v) และ CPM ประกอบด้วย Cellulase Onozuka RS 1% (w/v) Pectolyase Y 23 0.075% (w/v) Macerozyme

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R-10 0.5% (w/v) (pH 5.7) เป็นเวลา 1.5-3 ชั่วโมง พบว่า สารละลายเอ็นไซม์ทั้ง 2 สูตร สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดได้ไม่แตกต่างกันโดยมีความมีชีวิตอยู่ในช่วง 98-100% แต่พบว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากสารละลายเอ็นไซม์สูตร CPM มีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำกว่า สูตร CP

Burza and Malepszy (1995) ศึกษาการเกิด somatic embryogenesis จากโปรโตพลาสต์ของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.XVIII.) โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จาก embryogenic callus(GLC) และ embryogenic suspension (ESC) ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.2% (w/v) Macerozyme R-10 1.2% (w/v) Driselase 0.3% เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง พบว่า GLC และ ESC สามารถให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุดเป็น 5×10^6 และ 1×10^7 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และ พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกในวันที่ 4-5 และ 7-8 ในโปรโตพลาสต์จาก ESC และ GLC ตามลำดับ

Tello *et al.* (1995) ศึกษาการเกิด somatic embryogenesis และ การพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Lavatera thuringiaca* โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.5% (w/v) Macerozyme R-10 0.5% (w/v) sorbitol 10% (pH 5.7) เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยง โดยทดสอบวิธีการเลี้ยง 3 วิธี ได้แก่ liquid thin layer, nurse culture และ agarose embedded method พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี agarose embedded method มีเปอร์เซ็นต์ plating efficiency สูงที่สุด (30%) ในขณะที่ วิธี nurse culture และ liquid thin layer มีเปอร์เซ็นต์ plating efficiency เป็น 5 และ 0.5% ตามลำดับ

Xiu *et al.* (1995) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของ *Sesbania bispinosa*.โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากส่วนใบเลี้ยง ด้วยสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 3.5% (w/v) Macerozyme Onozuka 1% (w/v) Hemicellulase 0.5% (w/v) Driselase 0.5% (w/v) MES 5 mM mannitol 0-10 mM (pH 5.7) เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D (0.5 1.0 1.5 mg/l) BA (1.5 2.0 2.5 mg/l) glutamine 1 mg/l และ mannitol 0.5 M โดยทดสอบวิธีการเลี้ยง 4 วิธี ได้แก่ liquid droplet, liquid thin layer, agar medium culture และ liquid over agar พบว่า การเลี้ยงด้วยวิธี liquid over agar โดยใช้อาหาร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 mg/l BA 2.0 mg/l glutamine 1 mg/l และ mannitol 0.5 M โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และสร้างเป็นแคลลัส 84% โดยพบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกในวันที่ 3-4

Zafar *et al.* (1995) ศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนเริ่มต้นและจากโปรโตพลาสต์ ที่สกัดจากชิ้นส่วนแคลลัสของ *Medicago littoralis*. โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka YC 0.5% (w/v) Driselase 2% (w/v) Pectinase 1.2% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pectolyase Y 23 0.3% (w/v) พบว่า สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้สูงที่สุด 2.1 ± 0.4 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดของแคลลัส มีความมีชีวิต 70% พบการสร้างผนังเซลล์หลังจากการเลี้ยงได้ 3 วันและพบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากสร้างผนังเซลล์ได้ 2-3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เนื้อเยื่อทดลอง ได้แก่ แคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ชักนำมาจากตาไหลจากเอ็มบริโอตามวิธีการของจิตเกษม เที่ยงจิตต์(2545)

3.1.2 เอ็นไซม์ ได้แก่ Cellulase, Pectinase และ Pectolyase

3.1.3 อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ ก.1)

3.1.3.1 อาหารสูตร KM8P(B)(Kao and Michayluk. 1975) ดัดแปลง(สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี. 2546)

3.1.3.2 อาหารสูตร MS(A) (Murashige and Skoog. 1962) ดัดแปลง

3.1.3.3 อาหารสูตร V-KM(A) (Binding and Nehls. 1977) ดัดแปลง

3.1.3.4 อาหารสูตร V-KM(B) (Binding and Nehls. 1977) ดัดแปลง

3.1.4 สารเคมีและอุปกรณ์ในการสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

- สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ NAA, TDZ และ BA
- สารละลาย CPW
- Mannitol
- MES
- Sucrose
- สีย้อม fluorescien diacetate(FDA)
- จานเพาะเลี้ยงพลาสติก แบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร
- Micropipette
- กระดาษกรอง ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร
- ปากคีบ มีดผ่าตัด
- หลอดทดลองสำหรับเซ็นติฟิวจ์
- บิกเกอร์
- เครื่องเขย่า
- Nylon mesh ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูตะแกรง 100 ไมโครเมตร
- กรวยแก้ว
- หลอดฉีดยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

- filter กระดาษกรอง

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- เตาแก๊ส
- ตู้ปลอดเชื้อ
- เครื่องวัด pH
- ตะเกียงแอลกอฮอร์
- กล้องจุลทรรศน์
- กล้องจุลทรรศน์ แบบ inverted fluorescence
- Haemocytometer
- เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

3.2 วิธีการ

3.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อแคลลัสที่ใช้สกัดโปรโตพลาสต์

- นำเมล็ดบัวหลวงมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยนำเมล็ดบัวหลวงมาล้างน้ำให้สะอาด และฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วย ethanol 70% นาน 1 นาที ตามด้วย clorox 50% + tween 20 นาน 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- นำเมล็ดบัวหลวงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาทำการผ่าตัดเอาเฉพาะส่วนตาไหลของคัพภะบัวหลวงมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่เติม NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส ให้แสง12ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงนำแคลลัสที่ได้มาสกัดโปรโตพลาสต์

3.2.2 การเตรียมสารละลาย CPW ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

- CPW salt : ประกอบด้วย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
60930

3.2.3 การเตรียมสารละลายเอ็นไซม์

- ชั่งเอ็นไซม์แต่ละชนิดตามสูตรของสารละลายเอ็นไซม์ในแต่ละการทดลอง
- นำเอ็นไซม์แต่ละชนิดมาละลายในสารละลาย CPW + mannitol 0.7 M
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.7
- นำสารละลายเอ็นไซม์ที่ปรับ pH แล้วมากรองด้วย filter ที่ใส่กระดาษกรองขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

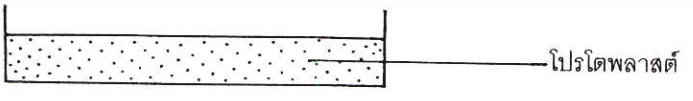
3.2.4การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

- เตรียม stock solution ของ FDA โดยละลาย FDA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ อะซีโตน(acetone)1 มิลลิลิตร
- ทำการเจือจาง stock solution ของ FDA ในสารละลาย CPW ให้มีความเข้มข้น 0.02%
- จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายสีย้อมเข้มข้น 0.02% ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แกว่งเบาๆ ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สีย้อม FDA ซึมผ่านผนังเมมเบรน
- หยดตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence ที่ช่วงแสงสีน้ำเงิน

3.2.5 การเตรียมวิธีการเพาะเลี้ยง

3.2.5.1 วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer

- นำโปรโตพลาสต์มาผสมกับอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์
- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร
- เขย่าจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้สารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์กระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง



3.2.5.2 วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose

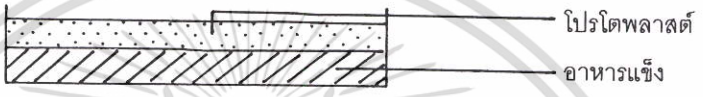
- นำอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มี agarose 0.6%มาหลอมที่ 45-50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใช้ micropipette ดูดอาหารปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร รอจนกระทั่งอาหารแข็ง

- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในอาหารเหลว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ทับลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง

- เขย่าจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้สารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์กระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง

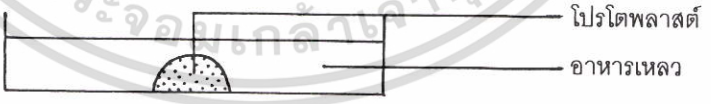


3.2.5.3 วิธีการเลี้ยงแบบ agarose bead

- นำอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มี agarose 1.2%มาหลอมที่ 45-50 องศาเซลเซียส

- นำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารชนิดเดียวกันมาผสมกับอาหารที่มี agarose 1.2%ในปริมาตรเท่ากัน

- ใช้ micropipette ดูดโปรโตพลาสต์ปริมาตร 40 ไมโครลิตร หยดลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร รอจนกระทั่งอาหารแข็ง จึงเททับด้วยอาหารเหลวชนิดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร



3.2.6 การเตรียมวิธีการเลี้ยงร่วมกับการใช้เซลล์พี่เลี้ยง

3.2.6.1 วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose

- นำอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงที่มี agarose 1.2%มาหลอมที่ 45-50 องศาเซลเซียส

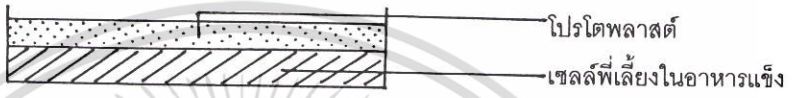
- นำเซลล์แขวนลอยของเซลล์พี่เลี้ยงมาผสมกับอาหารที่มี agarose 1.2%ในปริมาตรเท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใช้ micropipette ดูดอาหารที่มีเซลล์พี่เลี้ยงปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร รอจนกระทั่งอาหารแข็ง

- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในอาหารเหลว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ทับลงบนอาหารแข็งที่มีเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง

- เขย่าจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้สารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์กระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง



3.2.6.2-วิธีการเลี้ยงแบบ feeder cell

- นำอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงที่มี agarose 1.2%มาหลอมที่ 45-50 องศาเซลเซียส

- นำเซลล์แขวนลอยของเซลล์พี่เลี้ยงมาผสมกับอาหารที่มี agarose 1.2%ในปริมาตรเท่ากัน

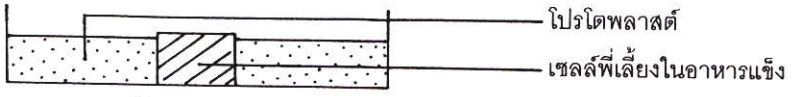
- ใช้ micropipette ดูดอาหารที่มีเซลล์พี่เลี้ยง ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงให้มีความหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร รอจนกระทั่งอาหารแข็ง

- ใช้มีดตัดอาหารที่มีเซลล์พี่เลี้ยงออกเป็นชิ้นสีเหลี่ยมขนาด 0.5 ตารางมิลลิเมตร

- ตักชิ้นอาหารที่มีเซลล์พี่เลี้ยงวางลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ใส่ช่องละ 1 ชิ้น

- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในอาหารเหลว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ทับลงบนอาหารแข็งที่มีเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง

- เขย่าจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้สารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์กระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง



3.2.4.3 วิธีการเลี้ยงแบบ nurse culture

- นำอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงที่มี agarose 0.6%มาหลอมที่ 45-50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใช้ micropipette ดูดอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร รอจนกระทั่งอาหารแข็ง

- ตัดแคลสัสของเซลล์พี่เลี้ยงให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 ตาราง มิลลิเมตร วางลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง

- นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนแคลสัสของเซลล์พี่เลี้ยง

- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยของโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง

3.2.7 วิธีการทดลอง

<u>การทดลองที่1</u> ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลสัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

วิธีการ

- นำแคลสัสบัวหลวงมาสับให้ละเอียด

- plasmolysis ด้วยสารละลาย CPW + mannitol 13% (pH 5.7) นาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด

- ดูดสารละลายเดิมออก แล้วเติมสารละลายเอ็นไซม์สูตรต่างๆ ลงในจานพลาสติก ปิดผนึกจานพลาสติกด้วย แผ่นพาราฟิน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่มืด

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 8 treatment 3 ซ้ำ ดังนี้

treatment 1 = Pectinase 1% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.1%

treatment 2 = Pectinase 1% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.2%

treatment 3 = Pectinase 1% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1%

treatment 4 = Pectinase 1% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.2%

treatment 5 = Pectinase 2% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.1%

treatment 6 = Pectinase 2% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.2%

treatment 7 = Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1%

treatment 8 = Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเอ็นไซม์แต่ละสูตรจะเติมด้วย mannitol 0.7 M และ MES 5 mM

- จากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อม FDA เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ทุกๆ 2 ชั่วโมง

การบันทึกผลการทดลอง

- บันทึกจำนวนโปรโตพลาสต์ทุกๆ 2 ชั่วโมงด้วย Haemocytometer

- บันทึกภาพลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่ช่วงแสงปกติ และ ช่วงแสงสีน้ำเงิน(450-490 nm)

- ทดสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ด้วย FDA 0.01

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

วิธีการ

- นำแคลลัสบัวหลวงมาสับให้ละเอียด

- plasmolysis ด้วยสารละลาย CPW + mannitol 13% (pH 5.7) นาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด

- ดูดสารละลายเดิมออก แล้วเติมสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1% ที่มีความเข้มข้นของ mannitol ที่ระดับต่าง ๆ ตามวิธีการที่กำหนด ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก ปิดผนึกจานพลาสติกด้วยแผ่นพาราฟิน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 treatment 3 ซ้ำ ดังนี้

treatment 1 = mannitol 0.4 M

treatment 2 = mannitol 0.5 M

treatment 3 = mannitol 0.6 M

treatment 4 = mannitol 0.7 M

treatment 5 = mannitol 0.8 M

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มากรองด้วย nylon mesh แล้วใส่ในหลอดทดลองสำหรับเซ็นติฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอ็นไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ เติมสารละลาย CPW + sucrose 20% นำไปปั่นที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

- ดูดเอาโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับเซ็นติฟิวจ์ ล้างโปรโตพลาสต์ ด้วยสารละลาย CPW ร่วมกับ mannitol 0.7 M นำไปปั่นที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อม FDA เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer

การบันทึกผลการทดลอง

- บันทึกจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย Haemocytometer

- บันทึกภาพลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่ช่วงแสงปกติ และ ช่วงแสงสีน้ำเงิน(450-490 nm)

- ทดสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ด้วย FDA 0.01%

<u>การทดลองที่ 3</u> ศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

วิธีการ

- นำแคลลัสบัวหลวงมาสับให้ละเอียด

- plasmolysis ด้วยสารละลาย CPW + mannitol 13% (pH 5.7) ในที่มืด 1 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายเดิมออก แล้วเติมสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1% mannitol 0.7 M ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก ปิดผนึกจานพลาสติกด้วยแผ่นพาราฟืน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- ดูดสารละลายโปรโตพลาสต์มากรองด้วย nylon mesh แล้วใส่ในหลอดทดลองสำหรับเซ็นติฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

- ดูดสารละลายใสตอนบนซึ่งเป็นเอ็นไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ เติมสารละลาย CPW + sucrose 20% นำไปปั่นที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

- ดูดเอาโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับเซ็นติฟิวจ์ ล้างโปรโตพลาสต์ ด้วยสารละลาย CPW ร่วมกับ mannitol 0.7 M นำไปปั่นที่ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

- จากนั้นทำการย้อมสีโปรโตพลาสต์ ด้วยสีย้อม FDA เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer

- นำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยง โดยศึกษาสูตรอาหารดัดแปลงร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยในแต่ละสูตรอาหารจะเติมด้วย mannitol 0.7 M ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 1.5 x10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วางแผนการทดลองแบบ 4 x 3 factorial in CRD มี 12 treatment combination 4 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย A คือ สูตรอาหารดัดแปลง

a1 = KM8P(B)

a2 = MS(A)

a3 = V-KM(A)

a4 = V-KM(B)

ปัจจัย B คือ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

b1 = thin layer

b2 = liquid over agarose (Li *et al.* 1990)

b3 = agarose bead (Li *et al.* 1990)

การบันทึกผลการทดลอง

-บันทึกลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่ช่วงแสงปกติ และ ช่วงแสงสีน้ำเงิน(450-490 nm)

<u>การทดลองที่ 4</u> ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

วิธีการ

- นำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากแคลลัสบัวหลวงมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง KM8P(B) ที่เติม mannitol 0.7 M ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 4 สูตร และทำการเลี้ยงด้วยวิธี thin layer ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 2.5 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 treatment 3 ซ้ำ ดังนี้

treatment 1 = NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM (จิตเกษม เที่ยงจิตต์. 2545)

treatment 2 = NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM (ภัควดี ภีกดีงาม. 2545)

treatment 3 = NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM (กุลวรา จารุพันธ์ และ จันทิมา วรสัมปุรสะ. 2544)

treatment 4 = NAA 10.7 µM (สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี. 2546)

การบันทึกผลการทดลอง

-บันทึกลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่ช่วงแสงปกติ และ ช่วงแสงสีน้ำเงิน(450-490 nm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 5</u> ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับวิธีการเลี้ยงต่อการชักนำให้โปรโต-พลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

<u>การทดลองที่ 5.1</u> ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง(แครอท และ ยาสูบ) ร่วมกับวิธีการเลี้ยง (liquid over agarose และ feeder cell) ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

วิธีการ

- นำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง KM8P(B) ที่เติมด้วย NAA 2.5 µM BA 2 µM และ mannitol 0.7 M (pH 5.7) และศึกษาการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด ร่วมกับวิธีการเลี้ยง 2 วิธี โดยทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

โดยวางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 factorial in RCBD มี 4 treatment combination 2 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย A คือ ชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง

A1 = แครอท

A2 = ยาสูบ

ปัจจัย B คือ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

B1 = liquid over agarose

B2 = feeder cell

<u>การทดลองที่ 5.2</u> ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง(แครอท และ ยาสูบ) ร่วมกับวิธีการเลี้ยงแบบ nurse culture ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

วิธีการ

- นำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง KM8P(B) ที่เติมด้วย NAA 2.5 µM BA 2 µM และ mannitol 0.7 M และศึกษาการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ nurse culture โดยทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

การบันทึกผลการทดลอง

- บันทึกลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่ช่วงแสงปกติ และ ช่วงแสงสีน้ำเงิน(450-490 nm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 6</u> ศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

วิธีการ

- นำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากแคลลัสบัวหลวงมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง KM8P(B) ที่เติมด้วย NAA 2.5 µM BA 2 µM และ mannitol 0.7 M โดยทำการเลี้ยงด้วยวิธี thin layer ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกแบบ 24 ช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร โดยใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 1 x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

- หลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะทำการลดความเข้มข้นของออสโมติคัมตามระยะเวลาที่กำหนดในการทดลอง ด้วยการเติมอาหารที่ไม่มี mannitol ในปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อช่อง

โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 7 treatment 2 ซ้ำ ดังนี้

treatment 1 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 1 วันของการเพาะเลี้ยง

treatment 2 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 2 วันของการเพาะเลี้ยง

treatment 3 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 3 วันของการเพาะเลี้ยง

treatment 4 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 4 วันของการเพาะเลี้ยง

treatment 5 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 5 วันของการเพาะเลี้ยง

treatment 6 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 6 วันของการเพาะเลี้ยง

treatment 7 = ลดออสโมติคัมทุกๆ 7 วันของการเพาะเลี้ยง

การบันทึกผลการทดลอง

- บันทึกลักษณะของโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่ช่วงแสงปกติ และ ช่วงแสงสีน้ำเงิน(450-490 nm)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่1</u> ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยนำแคลลัสบัวหลวงมาสกัดโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase เข้มข้น 1 และ 2% Cellulase เข้มข้น 2 และ 4% และ Pectolyase เข้มข้น 0.1 และ 0.2% ละลายในสารละลาย CPW ร่วมกับการใช้ mannitol 0.7 M pH ของสารละลายเป็น 5.7 จากนั้นทำการนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ทุก ๆ 2 ชั่วโมง พบว่า หลังจากแช่แคลลัสในสารละลายเอ็นไซม์แต่ละสูตร โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มีลักษณะคล้ายกัน คือ โปรโตพลาสต์กลมใส เซลล์ส่วนใหญ่มีเม็ดคลอโลพลาสต์อยู่ภายใน (ภาพที่ 4.3A) บางเซลล์พบสารสีแดงสะสมอยู่ ทำให้เซลล์มีสีแดง หรือสีชมพู แต่จะพบค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 4.3B) บางเซลล์มีแวคคิวโอใหญ่ (ภาพที่ 4.3C)เมื่อนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ พบว่า จำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในทุกๆวิธีการ จะมีจำนวนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 4 ของการสกัด และจะมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นยกเว้นในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 1% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.1% ซึ่งจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ของการสกัด(ภาพที่ 4.1) ซึ่งในชั่วโมงที่ 4 นี้ สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 1% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.2% จะสามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้จำนวนสูงที่สุด คือ 4.27 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1% หรือ 0.2% ที่สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้ 4.06 $x10^4$ และ 4.21 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ลักษณะของชิ้นส่วนแคลลัสในสารละลายเหล่านี้ จะค่อนข้างยุ่ย พบชิ้นส่วนแคลลัสที่ยังไม่ถูกย่อยเพียงเล็กน้อย สารละลายเอ็นไซม์มีสีน้ำตาลปนเขียว ซึ่งเป็นสีของเอ็นไซม์และเนื้อเยื่อแคลลัสที่ถูกย่อยแต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นสารละลายเอ็นไซม์จะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น เนื้อเยื่อแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในทุกๆวิธีการ จะมีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 2 ของการสกัด ยกเว้นในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 1% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.2% และ Pectinase 2% Cellulase 2% และ Pectolyase 0.1% จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 4 ของการสกัด และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตในทุกๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการจะลดลง (ภาพที่ 4.2) ซึ่งในชั่วโมงที่ 2 นี้ สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1% โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 89.08% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ รองลงมาคือ สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.2% โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 79.74% และเมื่อพิจารณาจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 2 นี้ พบว่า สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 1% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.2% จะมีจำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด คือ 3.88 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และ Pectolyase 0.1% หรือ 0.2% ที่สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้ 3.17 $x10^4$ และ 3.82 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)สารละลายเอ็นไซม์มีสีน้ำตาลปนเขียว ชิ้นส่วนแคลลัสค่อนข้างยุ่ยและยังมีสีเขียวอยู่

ตารางที่ 4.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

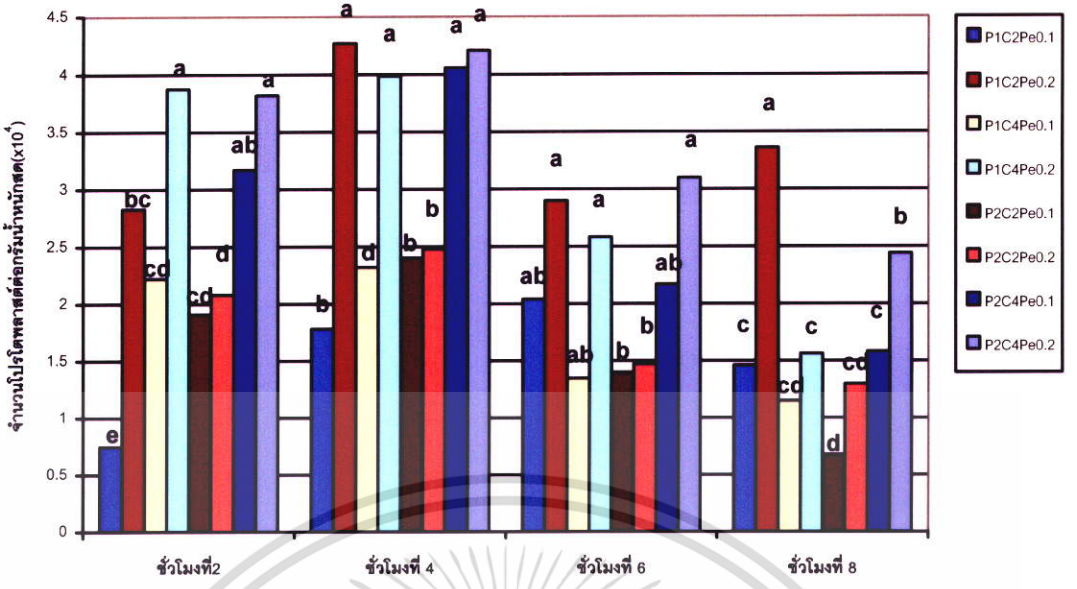
เอ็นไซม์			จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^4$) (±SE)				ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (%)(±SE)			
Pectinase	Cellulase	Pectolyase	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง
1 %	2%	0.1 %	0.75±0.19^{e}	1.78±0.01^{ef}	2.04±0.13^{ab}	1.46±0.14^{c}	62.66±1.43^{c}	57.45±2.65^{ab}	22.68±4.23^{abc}	10.22±0.55
		0.2 %	2.83±0.19^{bc}	4.27±0.36^{a}	2.90±0.22^{a}	3.36±0.07^{a}	66.20±3.95^{c}	73.92±4.12^{a}	14.74±1.58^{bcd}	9.11±0.28
	4%	0.1%	2.22±0.19^{cd}	2.32±0.14^{b}	1.35±0.13^{b}	1.15±0.27^{cd}	69.48±6.21^{bc}	38.80±3.04^{bc}	27.12±3.00^{ab}	8.45±1.11
		0.2 %	3.88±0.08^{a}	3.99±0.23^{a}	2.58±0.34^{a}	1.56±0.11^{c}	61.03±1.16^{c}	44.59±8.25^{bc}	28.24±6.12^{ab}	12.96±0.43
2 %	2%	0.1 %	1.91±0.02^{cd}	2.40±0.13^{b}	1.40±0.13^{b}	0.68±0.10^{d}	30.61±3.76^{d}	34.71±8.57^{c}	8.17±3.39^{cd}	0.00±0.00
		0.2 %	2.08±0.18^{d}	2.48±0.29^{b}	1.47±0.20^{b}	1.30±0.04^{cd}	61.30±1.80^{c}	30.92±3.07^{c}	2.27±0.41^{d}	0.61±0.15
	4%	0.1 %	3.17±0.012^{ab}	4.06±0.06^{a}	2.17±0.09^{ab}	1.58±0.07^{c}	89.08±3.59^{a}	45.41±8.49^{bc}	31.68±7.64^{a}	17.89±0.29
		0.2 %	3.82±0.30^{a}	4.21±0.44^{a}	3.10±0.45^{a}	2.44±0.22^{b}	79.74±5.05^{ab}	29.06±7.61^{c}	18.58±8.17^{abc}	8.23±0.88
F-test			**	**	**	**	**	**	**	ns
CV (%)			11.90	13.66	19.67	15.16	10.03	24.46	45.54	84.39

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

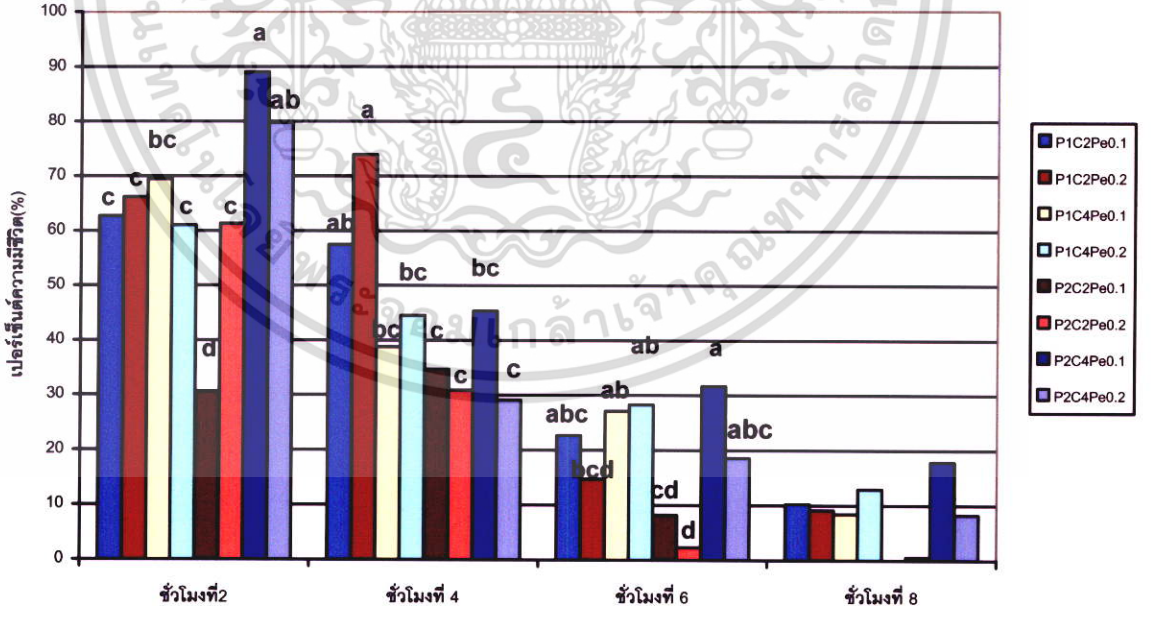
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

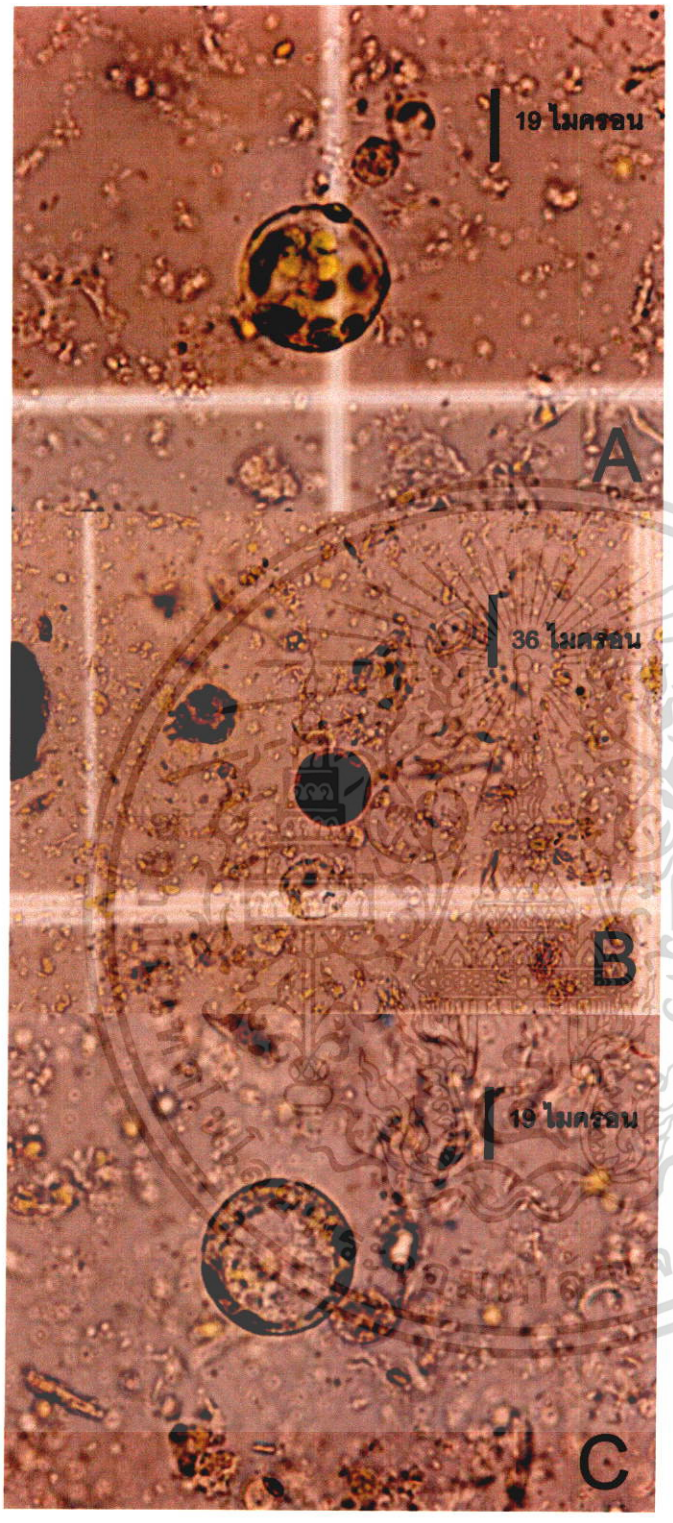


ภาพที่ 4.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์และระยะเวลาการสกัดต่อจำนวนโปรโต-พลาสต์ (P = Pectinase C = Cellulase Pe = Pectolyase ตัวเลขแสดงความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 4.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์และระยะเวลาการสกัดต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์(P = Pectinase C = Cellulase Pe= Pectolyase ตัวเลขแสดงความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่พบในการสกัดโปรโตพลาสต์

A - โปรโตพลาสต์ที่มีเม็ดคลอโรพลาสต์อยู่ภายใน

B - โปรโตพลาสต์ที่สารสีแดงอยู่ภายใน

C - โปรโตพลาสต์ที่มีแวคคิวโอใหญ่อยู่กลางเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำแคลลัสบัวหลวงที่สับจนละเอียดมาแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% และPectolyase 0.1% ที่มีความเข้มข้นของ mannitol ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.4 0.5 0.6 0.7และ 0.8 M เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในสารละลายเอ็นไซม์ที่มี mannitol แต่ละระดับ มีลักษณะกลมใส cell membrane บาง บางเซลล์มีแวคิวโอใหญ่ บางเซลล์พบเม็ดคลอโรพลาสต์อยู่ภายใน จากตารางที่ 4.2 เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในแต่ละวิธีการ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในแต่ละระดับความเข้มข้นของ mannitol โดยสารละลายเอ็นไซม์ที่มี mannitol 0.7 M โปรโตพลาสต์จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 82.92% รองลงมาคือสารละลายเอ็นไซม์ที่ใช้ mannitol ที่ความเข้มข้น 0.5 0.4 0.8 M และต่ำที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 0.6 M คือ 73.63 58.66 53.37 และ 45.47% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4)

สำหรับจำนวนโปรโตพลาสต์ จากตารางที่ 4.2 พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากสารละลายเอ็นไซม์ที่มี mannitol แต่ละระดับความเข้มข้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของ mannitol 0.6 M จะมีจำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด คือ 6.46 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.7 0.5 0.8 และ 0.4 M ซึ่งให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำที่สุด โดยมีจำนวนโปรโตพลาสต์เป็น 4.33 2.59 2.15 และ 1.18 $x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ(ภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.2 ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิต

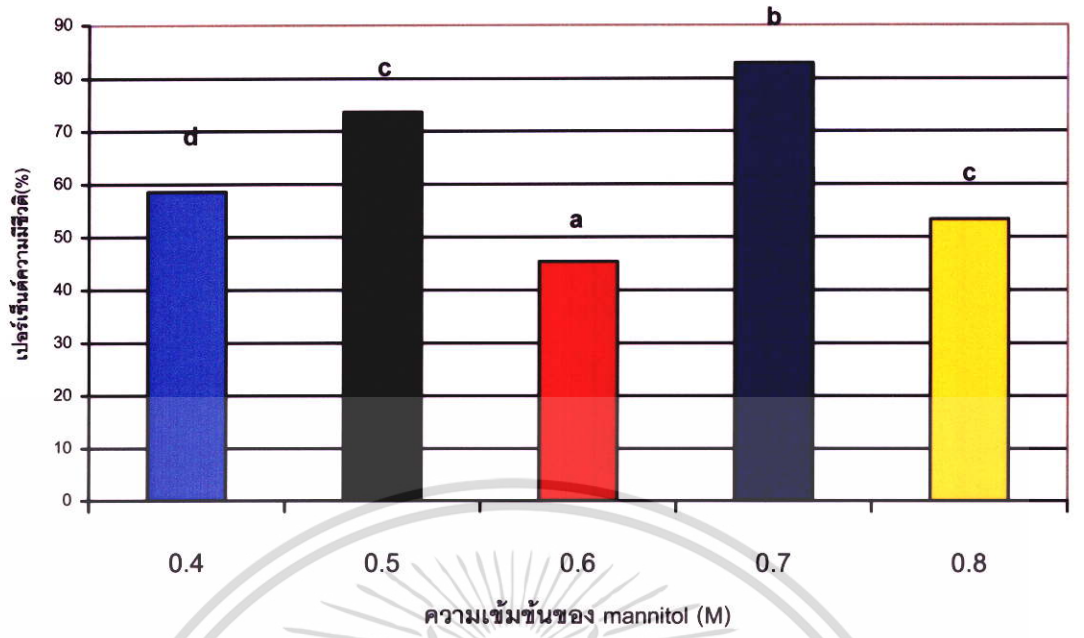
Mannitol (M)	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	F-test	CV%
จำนวนโปรโตรพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)(±SE)	1.18±0.20^d	2.59±0.14^c	6.46±0.19^a	4.33±0.06^b	2.15±0.26^c	**	9.43
ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (%)(±SE)	58.6±69.72	73.6±37.18	45.4±79.29	82.9±29.29	53.37±17.49	ns	29.43

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

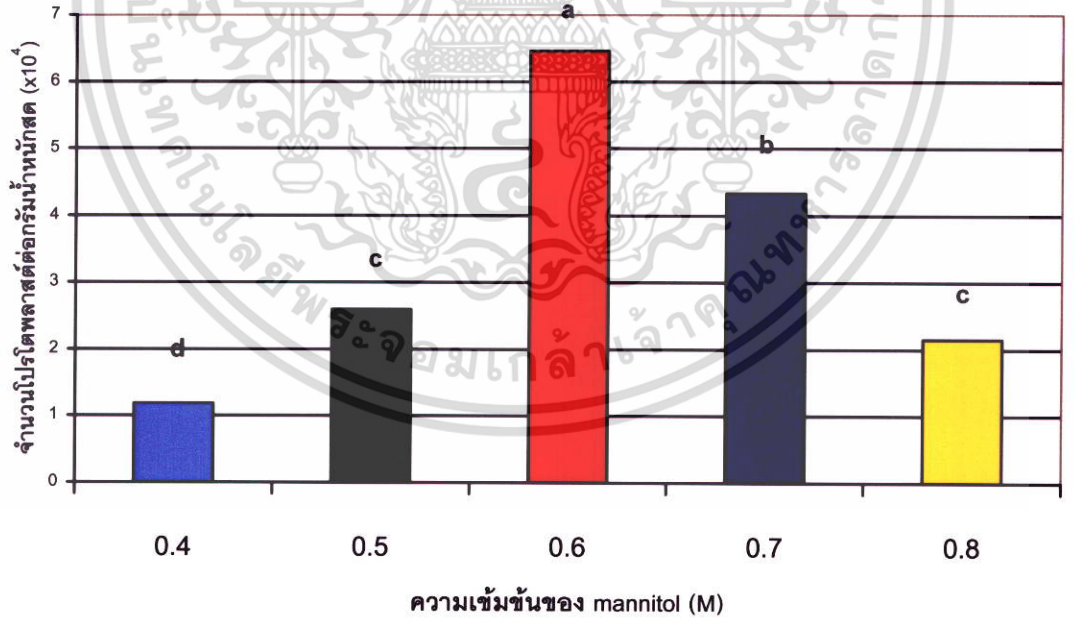
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์



ภาพที่ 4.5 ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 3</u> ศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

การศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตร V-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธีagarose bead โดยนำแคลลัสบัวหลวงที่สับจนละเอียดมาแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase4% และPectolyase 0.1% ที่มีความเข้มข้นของ mannitol 0.7 M เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงร่วมกับวิธีการเลี้ยงต่างๆ จากการทดลองพบว่า ในทุกๆวิธีการโปรโตพลาสต์จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และพบการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane โดยโปรโตพลาสต์ที่พบหลังการสกัดจะมี cell membrane บางใส (ภาพที่ 4.7A) แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเพียงหนึ่งวันโปรโตพลาสต์เริ่มมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป cell membrane หนาขึ้น มีสีเข้ม (ภาพที่ 4.7B) มีการสร้างผนังเซลล์แล้ว โดยจะพบโปรโตพลาสต์ 6 ลักษณะ คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง และเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม ซึ่งในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ยังมีเม็ดคลอโลพลาสต์สีเขียวอยู่ในเซลล์ เริ่มพบการแตกของเซลล์ และเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้นพบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี thin layer และ liquid over agarose เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เม็ดคลอโรพลาสต์สลายไป (ภาพที่ 4.8) มีเซลล์แตกมากขึ้น ไม่พบการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ในขณะที่ โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงด้วยวิธี agarose bead เซลล์มีสีน้ำตาลเข้มและไม่มีการพัฒนาเช่นกัน แต่มีเซลล์แตกเพียงเล็กน้อย

เซลล์แบบแตกหน่อเดียว

จากการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตร MS(A) สูตรV-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธีagarose bead จะพบเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเกิดขึ้นในแต่ละวิธีการ ลักษณะของเซลล์เป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อขึ้นหนึ่งหน่อ โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.9 A B C) เป็นลักษณะของการที่โปรโต - พลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ไซโทพลาซึมจึงดันผ่านบริเวณที่อ่อนของผนังเซลล์ออกมาเป็นผลให้เกิดการแตกหน่อ จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโต-พลาสต์ พบว่าแต่ละสูตรไม่มีผลต่อเซลล์แบบแตกหน่อเดียว โดยจะไม่พบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตรพลาสต์ในแต่ละสูตรอาหาร และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า วิธีการเลี้ยงมีผลต่อเซลล์แบบแตกหน่อเดียวโดยวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะทำให้โปรโตพลาสต์มีเซลล์แบบแตกหน่อเดียวสูงที่สุด คือ 2.55% และแตกต่างจากวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงแบบ liquid over agarose และ agarose bead อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็น 0.59 และ 0.15% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาสูตรอาหาร 4 สูตร ร่วมกับวิธีการเลี้ยงทั้ง 3 วิธี พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวสูงที่สุด คือ 3.22% รองลงมาคือการใช้อาหาร MS(B)ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer คือ 3.08% และไม่พบการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) หรือ V-KM(A) ร่วมกับวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็น 0.00% (ภาพที่ 4.6)

เซลล์แบบแตกหลายหน่อ

จากการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตร V-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธี agarose bead จะพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบแตกหลายหน่อซึ่งเป็นเซลล์ของโปร-โตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อขึ้นหลายๆหน่อ การแตกหน่อมักเกิดด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น หน่อที่แตกขึ้นมาใหม่จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดิม โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.10 A B C) เป็นลักษณะของการที่โปร-โตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ไซโทพลาซึมจึงดันผ่านบริเวณที่อ่อนของผนังเซลล์ออกมาเป็นผลให้เกิดการแตกหน่อ จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหาร พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงแต่ละสูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) จะมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อสูงที่สุด คือ 2.00% รองลงมาคือ อาหาร V-KM(B)(1.74%) และ MS(A)(1.66%)และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุดเป็น 0.82% ในอาหาร V-KM(B) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเพาะเลี้ยง พบว่าวิธีการเลี้ยงมีผลต่อเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อของโปรโตรพลาสต์ในแต่ละวิธีการเพาะเลี้ยง ซึ่งวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะทำให้โปรโตพลาสต์มีเซลล์แบบแตกหลายหน่อสูงที่สุด คือ 2.96% รองลงมาคือวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose (1.51%)และต่ำที่สุดในวิธีการเลี้ยงแบบ agrose bead ที่ให้เปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อเป็น 0.19% และ เมื่อพิจารณาสูตรอาหาร 4 สูตร ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยง 3 วิธี พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อของโปรโตรพลาสต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อสูงที่สุด คือ 5.26% รองลงมาคือการใช้อาหาร V-KM(A) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer คือ 2.64% และไม่พบเซลล์แบบแตกหลายหน่อเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ agrose bead ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อเป็น 0.00%(ภาพที่ 4.6)

เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

จากการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตร V-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธีagarose bead จะพบโปรโตพลาสต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูง เซลล์ของโปรโตพลาสต์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปไม่เป็นทรงกลม อาจเป็นทรงรีหรือบิดเบี้ยวไป บางเซลล์ยาวขึ้นและขอดตรงกลาง ผนังเซลล์หนาเท่ากันทั้งเซลล์ (ภาพที่ 4.11 A B C) พบเซลล์แบบนี้ได้ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหาร พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลงทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง V-KM(B)จะมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงที่สุด คือ 3.92% รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(A), MS(A) และ KM8P(B) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า มีผลต่อการเกิดเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose จะทำให้โปรโต-พลาสต์มีเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงที่สุด คือ 4.61% รองลงมาคือ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น 4.24% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จะแตกต่างจากวิธีการเลี้ยงแบบ agarose bead ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่ำที่สุด คือ 0.45% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาสูตรอาหารดัดแปลงทั้ง 4 สูตร ร่วมกับวิธีการเลี้ยงทั้ง 3 วิธี พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงที่สุด คือ 5.81% รองลงมาคือการใช้อาหาร V-KM(B)ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer คือ 5.75% และต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ agarose bead (0.14%)(ภาพที่ 4.6)

เซลล์แบบเกิดระยางค์

จากการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตร V-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธีagarose bead จะพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบเกิดระยางค์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีระยางค์เกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ ระยางค์มีลักษณะเป็นเส้นยาวออกมาจากเซลล์ ยาวบ้างสั้นบ้าง บางเซลล์เกิดมากกว่าหนึ่งเส้น ระยางค์ใสไม่มีเม็ดคลอโรพลาสต์ เป็นลักษณะของเซลล์ที่พบได้น้อย (ภาพที่ 4.12 A B C) จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหาร พบว่า ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเกิดระยางค์ ในสูตรอาหารดัดแปลงทั้ง 4 สูตร โดยการเพาะเลี้ยงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารดัดแปลง MS(A) จะมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเกิดระยางค์สูงที่สุด คือ 0.23% รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(A), V-KM(B)และ KM8P(B) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเฉพาะผลของวิธีการเลี้ยง พบว่าวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะทำให้โปรโตพลาสต์มีเซลล์แบบเกิดระยางค์สูงที่สุด คือ 0.26% รองลงมาคือวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose(0.16%) และ agarose bead ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเกิดระยางค์ต่ำที่สุด เป็น 0.03% และเมื่อพิจารณาโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง 4 สูตร ร่วมกับวิธีการเลี้ยง 3 วิธี พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเซลล์แบบเกิดระยางค์เกิดสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS(A) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose และอาหาร V-KM(A) ร่วมกับวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เท่ากัน คือ 0.37% รองลงมาคือการใช้อาหาร MS(A) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer คือ 0.29% และไม่พบเซลล์แบบเกิดระยางค์(0.00%) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose และ agarose bead หรือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(A) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ agarose bead (ภาพที่ 4.6)

เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง

จากการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตร V-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธีagarose bead จะพบเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ โดยเห็น cell plate อย่างชัดเจนที่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ บางเซลล์ cell plate อาจไม่ได้อยู่กึ่งกลางเซลล์ (ภาพที่ 4.13 A B C) จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหาร พบว่า สูตรอาหารดัดแปลงสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์แต่ละสูตรไม่มีผลต่อเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง และไม่พบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองในแต่ละสูตรอาหาร และเมื่อพิจารณาเฉพาะผลของวิธีการเลี้ยง พบว่า วิธีการเลี้ยงมีผลต่อเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง โดยวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะทำให้โปรโตพลาสต์มีเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองสูงที่สุด คือ 0.48% และแตกต่างจากวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose และ agarose bead อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเมื่อพิจารณาผลของอาหารดัดแปลงทั้ง 4 สูตร ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงทั้ง 3 วิธี ต่อเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองสูงที่สุด คือ 0.66% รองลงมาคือการใช้อาหาร V-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer คือ 0.62% และไม่พบการแบ่งเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) และ MS(A) ร่วมกับ วิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงแบบ liquid over agarose และ agrose bead หรือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(A) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือการเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(B)ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose และ agrose bead ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเป็น 0.00%(ภาพที่ 4.6)

ผลรวมของลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ทั้งหมด

จากการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ได้แก่ สูตรKM8P(B) สูตรMS(A) สูตร V-KM(A) และ สูตรV-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี คือ วิธีthin layer วิธีliquid over agarose และวิธีagarose bead จากตารางที่ 4.3 ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ และเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เมื่อพิจารณาเฉพาะสูตรอาหาร พบว่า เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อพิจารณาเฉพาะผลของวิธีการเลี้ยง พบว่า วิธีการเลี้ยงมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด โดยวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะทำให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ผลรวมลักษณะเซลล์ทั้งหมดสูงที่สุด คือ 10.52% และแตกต่างจากวิธีการอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose(6.85%) และ agarose bead(0.93%) และเมื่อพิจารณาสูตรอาหารดัดแปลง 4 สูตร ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง 3 วิธี ต่อเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer จะมีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ 12.62% รองลงมาคือการใช้อาหาร MS(A)ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer คือ 10.24% และต่ำที่สุดเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร V-KM(B) ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ agarose bead คือ 0.33%(ภาพที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเพาะเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

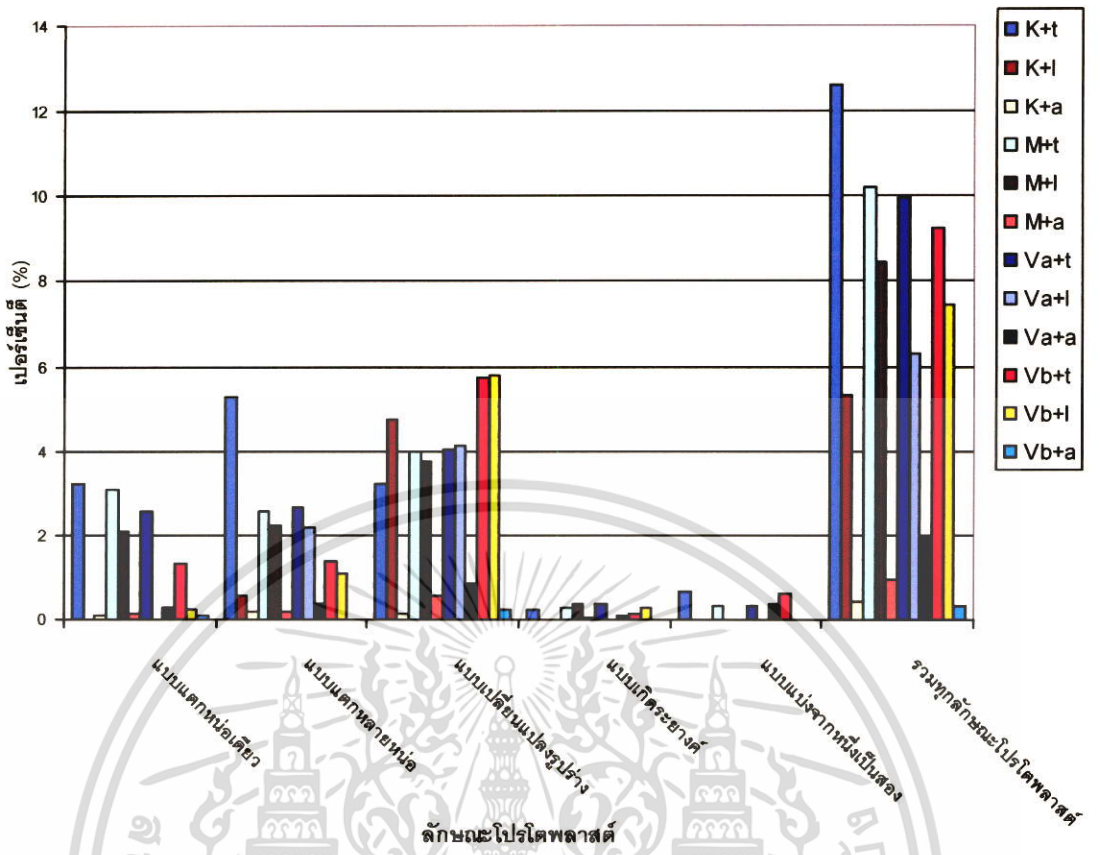
วิธีการ		การเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ(%)(±SE)					
		แบบแตกหน่อเดียว	แบบแตกหลายหน่อ	แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบบเกิดระยางค์	แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง	รวม
KM8P(B)		1.10±0.13	2.00±0.26	2.71±0.73	0.08±0.08	0.22±0.13	6.39±1.09
MS(A)		1.78±0.07	1.66±0.24	2.76±0.29	0.23±0.09	0.10±0.07	6.56±0.42
V-KM(A)		0.95±0.04	1.74±0.47	3.00±0.89	0.15±0.12	0.24±0.04	6.10±0.71
V-KM(B)		0.56±0.09	0.82±0.11	3.92±0.53	0.13±0.09	0.20±0.09	5.68±0.69
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns
thin layer		2.55±0.53^{a}	2.96±0.37^{a}	4.24±0.40^{a}	0.26±0.14	0.48±0.16^{a}	10.52±0.62^{a}
liquid over agarose		0.59±0.16^{b}	1.51±0.41^{b}	4.61±0.66^{a}	0.16±0.10	0.00±0.00^{b}	6.85±0.80^{b}
agarose bead		0.15±0.05^{b}	0.19±0.07^{c}	0.45±0.09^{b}	0.03±0.04	0.09±0.04^{b}	0.93±0.07^{c}
F-test		**	**	**	ns	**	**
KM8P	thin layer	3.22±1.21	5.26±0.51^{a}	3.23±0.71	0.24±0.24	0.66±0.40	12.62±0.92
	liquid over agarose	0.00±0.00	0.55±0.35^{cd}	4.75±2.17	0.00±0.00	0.00±0.00	5.30±2.34
	agarose bead	0.09±0.06	0.19±0.08^{d}	0.14±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	0.43±0.20
MS	thin layer	3.08±0.88	2.56±0.37^{b}	3.98±0.72	0.29±0.17	0.31±0.22	10.20±40.70
	liquid over agarose	2.11±0.85	2.22±0.83^{bc}	3.76±1.39	0.37±0.37	0.00±0.00	8.47±1.42
	agarose bead	0.15±0.05	0.20±0.33^{d}	0.55±2.05	0.05±0.00	0.00±0.00	0.95±2.35
VKM(A)	thin layer	2.57±0.97	2.64±0.68^{b}	4.02±0.66	0.37±0.38	0.34±0.21	9.97±0.65
	liquid over agarose	0.00±0.06	2.18±0.08^{bc}	4.12±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	6.31±0.20
	agarose bead	0.28±0.10	0.38±0.22^{cd}	0.86±0.18	0.09±0.10	0.38±0.16	2.01±0.40
VKM(B)	thin layer	1.33±0.43	1.38±0.52^{bcd}	5.75±0.51	0.13±0.13	0.62±0.26	9.24±0.71
	liquid over agarose	0.26±0.27	1.09±0.77^{bcd}	5.81±1.29	0.28±0.28	0.00±0.00	7.46±2.17
	agarose bead	0.08±0.08	0.00±0.00^{d}	0.25±0.16	0.00±0.00	0.00±0.00	0.33±0.19
F-test		ns	*	ns	ns	ns	ns
CV%		24.81	22.39	25.16	13.84	14.78	18.92

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Rangr Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

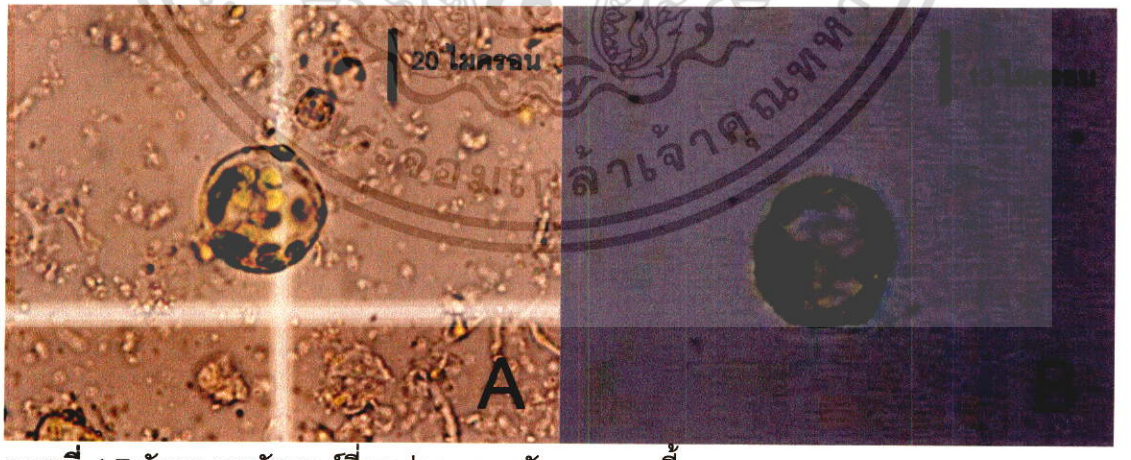
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่4.6 ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเพาะเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ (K = KM8P(B) M =MS(A) Va = V-KM(A) Vb = V-KM(B) t = thin layer l = liquid over agarose a = agarose bead)

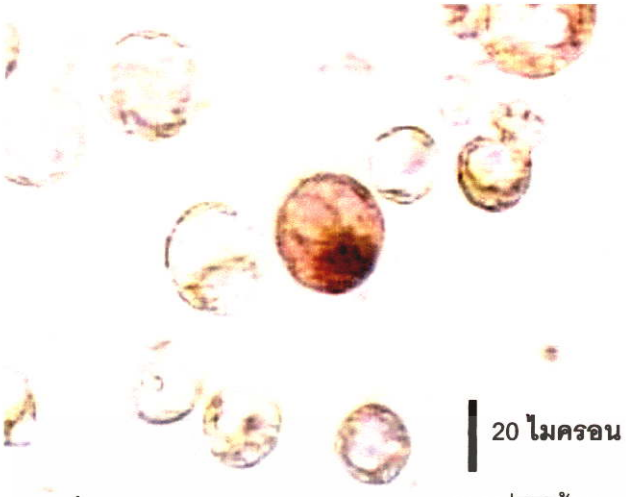


ภาพที่ 4.7 ลักษณะผนังเซลล์ที่พบก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง

A – cell membrane ของโปรโตพลาสต์หลังการสกัดโปรโตพลาสต์

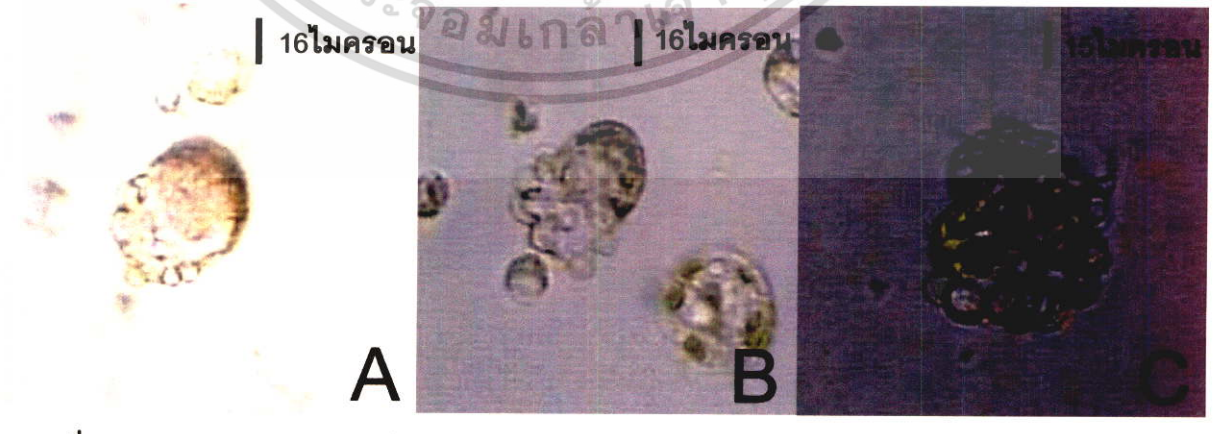
B - cell membrane ของโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



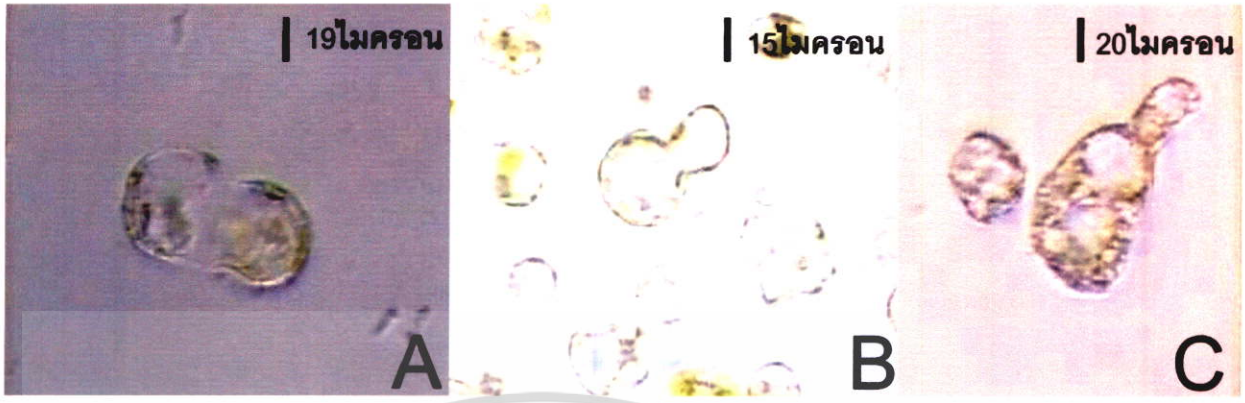
ภาพที่ 4.8 ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีสีน้ำตาลเข้ม

ภาพที่ 4.9 A B C ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบบแตกหน่อเดียว



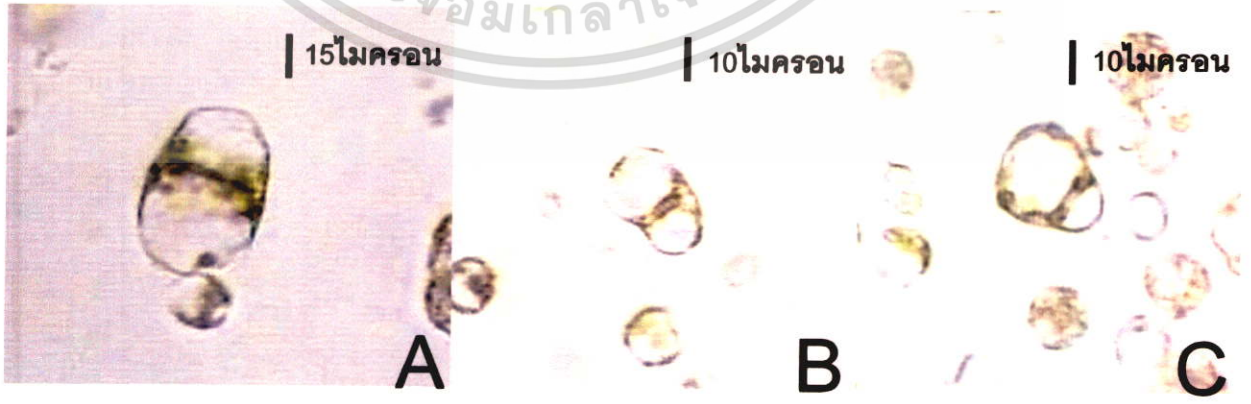
ภาพที่ 4.10 A B C ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบบแตกหลายหน่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 A B C ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ภาพที่ 4.12 A B C ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบบเกิดระยางค์



ภาพที่ 4.13 A B C ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 4</u> ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยนำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 4 สูตร คือ สูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM สูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM สูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM และ สูตรที่ 4 NAA 10.7µM จากการทดลองพบว่า ในทุกๆวิธีการโปรโตพลาสต์จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และพบการเปลี่ยนแปลงของcell membrane โดยโปรโตพลาสต์ที่พบหลังการสกัดจะมี cell membrane บางใส (ภาพที่ 4.7A) แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเพียงหนึ่งวันโปรโต-พลาสต์เริ่มมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป cell membrane หนาขึ้น มีสีเข้ม (ภาพที่ 4.7B) มีการสร้างผนังเซลล์แล้ว และจะพบโปรโตพลาสต์ 6 ลักษณะ คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ และเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง ซึ่งในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในทุกๆวิธีการยังมีเม็ดคลอโลพลาสต์สีเขียวอยู่ในเซลล์ เริ่มพบการแตกของเซลล์ และเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เม็ดคลอโรพลาสต์สลายไป (ภาพที่ 4.8) มีเซลล์แตกมากขึ้น พบเศษเซลล์สีน้ำตาลเข้มมารวมกันอยู่ที่บริเวณกลางช่องเพาะเลี้ยง ไม่พบการพัฒนาของโปรโตพลาสต์

เซลล์แบบแตกหน่อเดียว

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะพบเซลล์แบบแตกหน่อเดียวซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อขึ้นหนึ่งหน่อ โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.9 A B C) เป็นลักษณะของการที่โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ไซโทพลาซึมจึงดันผ่านบริเวณที่อ่อนของผนังเซลล์ออกมาเป็นผลให้เกิดการแตกหน่อ จากตารางที่ 4.4 พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวในอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวสูงที่สุด คือ 0.56% รองลงมาคือโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM สูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM และ สูตรที่ 4 NAA 10.7 µM ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็น 0.49 0.42 และ 0.36% ตามลำดับ(ภาพที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แบบแตกหลายหน่อ

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะพบเซลล์แบบแตกหลายหน่อซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อขึ้นหลายๆหน่อ การแตกหน่อมักเกิดด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น หน่อที่แตกขึ้นมาใหม่จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดิม โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.10 A B C) จากตารางที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อในอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อสูงที่สุด คือ 1.07% รองลงมาคือ โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบสูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM สูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM และสูตรที่ 4 NAA 10.7µM ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อเป็น 1.06 1.05 และ0.66 % ตามลำดับ(ภาพที่ 4.14)

เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะพบเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างปริมาณมากซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปไม่เป็นทรงกลม อาจเป็นทรงรีหรือบิดเบี้ยวไป บางเซลล์ยาวขึ้นและขอดตรงกลาง ผนังเซลล์หนาเท่ากันทั้งเซลล์ (ภาพที่ 4.11 A B C) จากตารางที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างในอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงที่สุด คือ 4.97% รองลงมาคือโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM สูตรที่ 4 NAA 10.7µM และสูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น 4.88 4.58 และ4.48% ตามลำดับ(ภาพที่ 4.14)

เซลล์แบบเกิดระยางค์

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะพบเซลล์แบบเกิดระยางค์ซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีระยางค์เกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ ระยางค์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเส้นยาวออกมาจากเซลล์ บางเซลล์เกิดมากกว่าหนึ่งเส้น ระยางค์ใสไม่มีส่วนของเม็ดคลอโรพลาสต์ เป็นลักษณะที่พบได้น้อยและมักพบเมื่อเพาะเลี้ยงไปแล้วได้ระยะหนึ่ง (ภาพที่ 4.12 A B C) จากตารางที่ 4.4 พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์ในอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์สูงที่สุด คือ 0.07% รองลงมาคือโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM และสูตรที่ 4 NAA 10.7µM ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เท่ากันเป็น 0.04% และไม่พบเซลล์แบบเกิดระยางค์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเกิดระยางค์เป็น 0.00% (ภาพที่ 4.14)

เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะพบเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ และจะเห็น cell plate อย่างชัดเจนที่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ บางเซลล์ cell plate อาจไม่ได้อยู่กึ่งกลางเซลล์ (ภาพที่ 4.13 A B C) จากตารางที่ 4.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองในอาหารแต่ละสูตรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์สูงที่สุด คือ 1.60% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM สูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM และสูตรที่ 4 NAA 10.7µM ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเป็น 0.93 0.86 และ 0.69%ตามลำดับ(ภาพที่ 4.14)

ผลรวมของลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ทั้งหมด

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในตารางที่ 4.4 พบว่า เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ และเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง ในอาหารแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่ 1 NAA 50 µM ร่วมกับ TDZ 0.25 µM จะมีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ 7.52% รองลงมาคือโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบสูตรที่ 3 NAA 5 µM ร่วมกับ TDZ 0.005 µM สูตรที่ 2 NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM และสูตรที่ 4 NAA 10.7µM ที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดเป็น 7.44 7.24 และ6.34% ตามลำดับ(ภาพที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

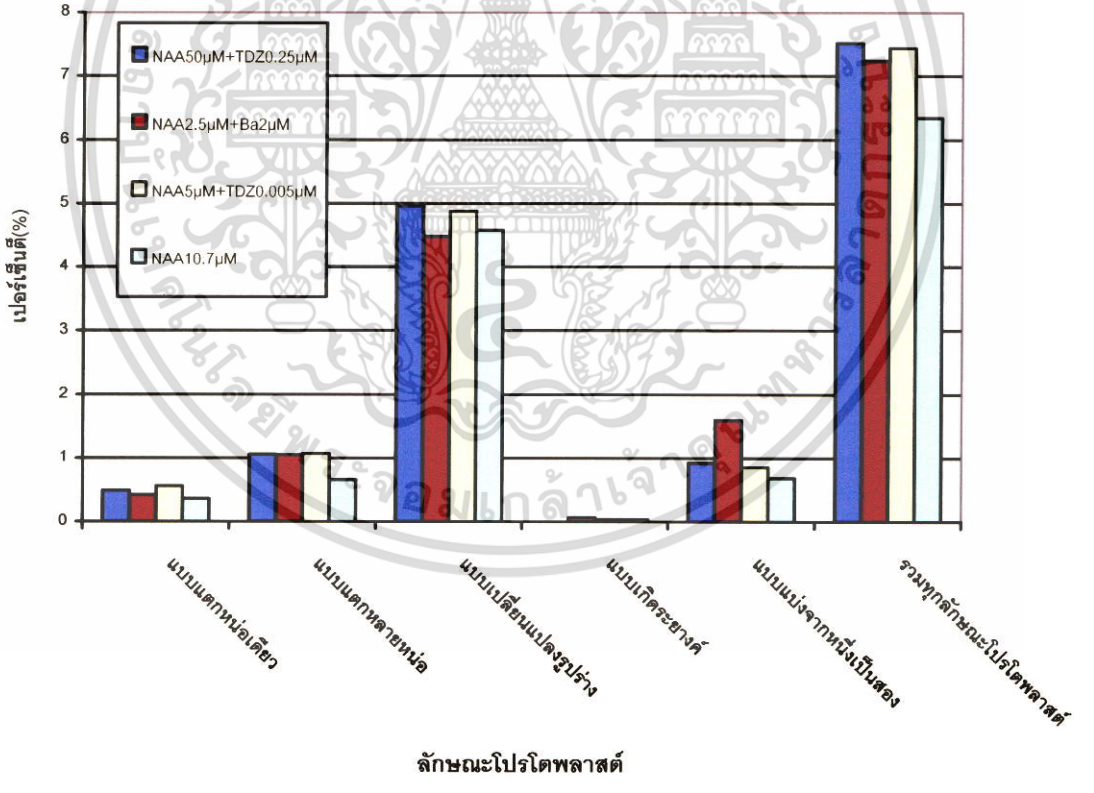
ตารางที่ 4.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต	การเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ(%)(±SE)					
	แบบแตกหน่อเดียว	แบบแตกหลายหน่อ	แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบบเกิดระยางค์	แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง	รวม
NAA50μM+TDZ0.25μM	0.49±0.15	1.06±0.25	4.97±0.56	0.00±0.00	0.93±0.04[b]	7.52±0.93
NAA2.5μM+BA2μM	0.42±0.05	1.05±0.08	4.48±0.19	0.07±0.03	1.60±0.17[a]	7.24±0.11
NAA5μM+TDZ0.005μM	0.56±0.02	1.07±0.11	4.88±0.18	0.04±0.02	0.86±0.03[b]	7.44±0.26
NAA10.7μM	0.36±0.04	0.66±0.08	4.58±0.10	0.04±0.03	0.69±0.02[b]	6.34±0.14
F-test	ns	ns	ns	ns	**	ns
cv (%)	4.69	1.96	2.76	6.43	3.43	5.12

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4.14 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 5</u> ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับวิธีการเลี้ยงต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

<u>การทดลองที่ 5.1</u> ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง(แครอท และ ยาสูบ) ร่วมกับวิธีการเลี้ยง (liquid over agarose และ feeder layer)ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส โดยนำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร KM8P(B) ที่เติมด้วย NAA 2.5 µM BA 2 µM และ mannitol 0.7 M โดยใช้วิธีการเลี้ยง 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ร่วมกับ เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ พบว่าในทุกๆวิธีการโปรโตพลาสต์จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และพบการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane โดยโปรโตพลาสต์ที่พบหลังการสกัดจะมี cell membrane บางใส (ภาพที่ 4.7A) แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเพียงหนึ่งวันโปรโตพลาสต์เริ่มมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป cell membraneหนาขึ้น มีสีเข้ม (ภาพที่ 4.7B) มีการสร้างผนังเซลล์แล้ว โดยจะพบโปรโตพลาสต์ 7 ลักษณะ คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม และ เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม ซึ่งในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ยังมีเม็ดคลอโลพลาสต์สีเขียวอยู่ในเซลล์ แต่จะเริ่มมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงได้เพียง 2 วัน และพบการแตกของเซลล์ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจะมีสีน้ำตาลเข้ม เม็ดคลอโรพลาสต์สลายไป (ภาพที่ 4.8) มีเซลล์แตกมากขึ้น ไม่พบการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ในขณะที่เซลล์พี่เลี้ยงทั้ง 2 ชนิดยังมีการพัฒนาต่อไป จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า

เซลล์แบบแตกหน่อเดียว

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบบแตกหน่อเดียว ซึ่งลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อขึ้นหนึ่งหน่อ โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.9 A B C) เป็นลักษณะของการที่โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ไซโทพลาซึมจึงดันผ่านบริเวณที่อ่อนของผนังเซลล์ออกมาเป็นผลให้เกิดการแตกหน่อ จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็น 0.25% สูงกว่าการใช้แครอทเป็นเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พี่เลี้ยง(0.16%) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (0.22%)จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวสูงกว่าการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (0.19%)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวสูงที่สุด คือ 0.25% รองลงมาคือการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว คือ 0.19% และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุด เมื่อใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (ภาพที่ 4.15)

เซลล์แบบแตกหลายหน่อ

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบบแตกหลายหน่อซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แตกหน่อขึ้นหลายๆหน่อ การแตกหน่อมักเกิดด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น หน่อที่แตกขึ้นมาใหม่จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดิม กลมใส โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.10 A B C) จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อเป็น 1.77% สูงกว่าการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแตกหลายหน่อเป็น 1.20% และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (1.68%)จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อสูงกว่าการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (1.29%)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อสูงที่สุด คือ 2.27% รองลงมาคือการใช้ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell และ การใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหลายหน่อเป็น 1.31 และ 1.27% ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุดเมื่อใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (1.03%)(ภาพที่ 4.15)

เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่พบมากที่สุดและมีหลายแบบ เป็นโปรโตพลาสต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปไม่เป็นทรงกลม อาจเป็นทรงรีหรือบิดเบี้ยวไป บางเซลล์ยาวขึ้นและขอดตรงกลาง ผนังเซลล์หนาเท่ากันทั้งเซลล์ (ภาพที่ 4.11 A B C) จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น 3.70% สูงกว่าการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง (3.51%) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (3.98%) จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงกว่าการใช้วิธีการแบบ liquid over agarose (3.23%)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธี การเลี้ยง 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงแบบ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงที่สุด คือ 4.51% รองลงมาคือการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เป็น 3.95 และ 3.45% ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุด เมื่อใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโต-พลาสต์แบบ liquid over agarose (ภาพที่ 4.15)

เซลล์แบบเกิดระยางค์

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบบเกิดระยางค์ซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีระยางค์เกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ ระยางค์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเส้นยาวออกมาจากเซลล์ บางเซลล์เกิดมากกว่าหนึ่งเส้น ระยางค์ใสไม่มีส่วนของเม็ดคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 4.12 A B C) จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์แบบเกิดระยางค์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เป็น 0.25% สูงกว่าการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยงซึ่งไม่พบเซลล์แบบเกิดระยางค์(0.00%) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยง โปรโตพลาสต์แบบ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เท่ากับการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose คือ 0.13%

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์ของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เท่ากัน คือ 0.25% สำหรับการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell จะไม่พบเซลล์แบบเกิดระยางค์(0.00%)(ภาพที่ 4.15)

เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ โดยจะเห็น cell plate อย่างชัดเจนที่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ บางเซลล์ cell plate อาจไม่ได้อยู่กึ่งกลางเซลล์ (ภาพที่ 4.13 A B C) จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง(0.39%) สูงกว่าการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง(0.26%) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (0.37%) จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์สูงกว่าการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (0.28%)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับวิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์สูงที่สุด คือ 0.50% รองลงมาคือการใช้แครอท หรือ ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์เท่ากัน คือ 0.28% และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุด เมื่อใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (ภาพที่ 4.15)

เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งจากหนึ่งเซลล์เป็นสามเซลล์ โดยจะเห็น cell plate ในสองตำแหน่งทำให้มองเห็นเป็น 3 ส่วนใน 1 เซลล์ (ภาพที่ 4.16 A B) จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามเป็น 0.33% สูงกว่าการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงซึ่งไม่พบเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม (0.00%) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ของเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม (0.19%)สูงกว่าการใช้วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose (0.12%)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามสูงที่สุด คือ 0.47% รองลงมาคือการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามเป็น 0.19% และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell จะไม่พบเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม(0.00%)(ภาพที่ 4.15)

เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส จะพบเซลล์แบ่งแบบกลุ่มซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์จนเกิดเป็นกลุ่มอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 4.17 A B C) จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท เป็นเซลล์พี่เลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มเป็น 0.30% ส่วนการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงนั้นไม่พบเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์เซลล์แบ่งแบบกลุ่มของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (0.23%)จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มสูงกว่าการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (0.09%)

เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มสูงที่สุด คือ 0.38% รองลงมาคือการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มเป็น 0.23% และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุด เมื่อใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell จะไม่พบเซลล์แบ่งแบบกลุ่ม(0.00%)(ภาพที่ 4.15)

ผลรวมของลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ทั้งหมด

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส พบว่า เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม และ เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ผลรวมลักษณะเซลล์ทั้งหมดของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ ยาสูบ หรือ แครอท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเซลล์พี่เลี้ยง โดยการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดเป็น 6.17% สูงกว่าการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง (5.94%) และเมื่อพิจารณาเฉพาะวิธีการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดของโปรโต-พลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose หรือ feeder cell ซึ่งการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (6.16%) จะมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดสูงกว่าการใช้วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose (5.94%)

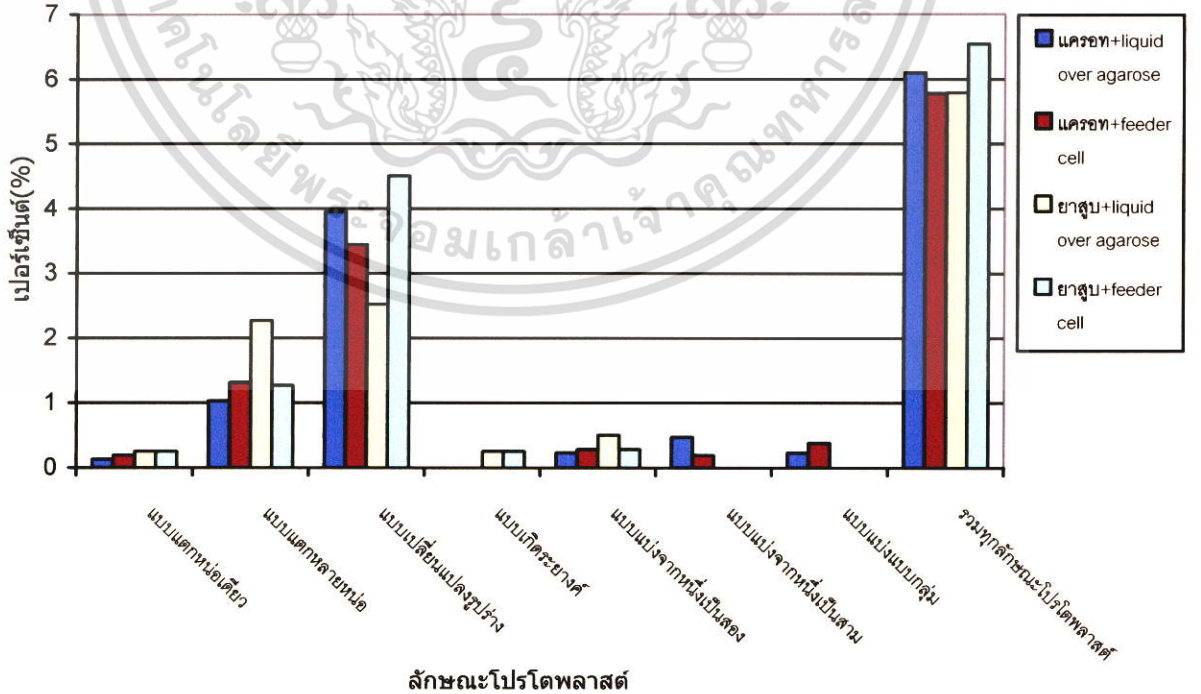
เมื่อพิจารณาผลของการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 2 แบบ คือ liquid over agarose และ feeder cell ต่อเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell จะมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดสูงที่สุด คือ 6.54% รองลงมาคือการใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ liquid over agarose และการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดเป็น 6.10 และ 5.79% ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำที่สุดเป็น 5.78% เมื่อใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ feeder cell (ภาพที่ 4.15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

วิธีการ	การเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ(%)(±SE)							
	แบบแตกหน่อเดียว	แบบแตกหลายหน่อ	แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบบเกิดระยางค์	แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง	แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม	แบบแบ่งแบบกลุ่ม	รวม
แครอท	0.16±0.32	1.20±1.24	3.70±1.05	0.00±0.00	0.26±0.05	0.33±0.65	0.30±0.61	5.94±1.09
ยาสูบ	0.25±0.00	1.77±1.98	3.51±1.94	0.25±0.50	0.39±0.78	0.00±0.00	0.00±0.00	6.17±3.64
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Liquid over agarose	0.19±0.38	1.68±1.57	3.23±0.21	0.13±0.25	0.37±0.27	0.12±0.47	0.23±0.23	5.94±1.66
Feeder cell	0.22±0.06	1.29±1.65	3.98±1.10	0.13±0.25	0.28±0.56	0.19±0.19	0.09±0.37	6.16±3.07
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
แครอท+ Liquid over agarose	0.13±0.13	1.03±0.31	3.95±0.22	0.00±0.00	0.23±0.23	0.47±0.47	0.23±0.23	6.10±0.88
แครอท + Feeder cell	0.19±0.19	1.31±0.94	3.45±0.83	0.00±0.00	0.28±0.28	0.19±0.19	0.38±0.37	5.78±0.21
ยาสูบ + Liquid over agarose	0.25±0.25	2.27±1.27	2.52±0.01	0.25±0.25	0.50±0.50	0.00±0.00	0.00±0.00	5.79±0.78
ยาสูบ+ Feeder cell	0.25±0.25	1.27±0.71	4.51±1.93	0.25±0.25	0.28±0.28	0.00±0.00	0.00±0.00	6.54±2.86
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
cv(%)	10.57	8.70	17.65	9.84	16.75	12.22	13.05	11.56

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



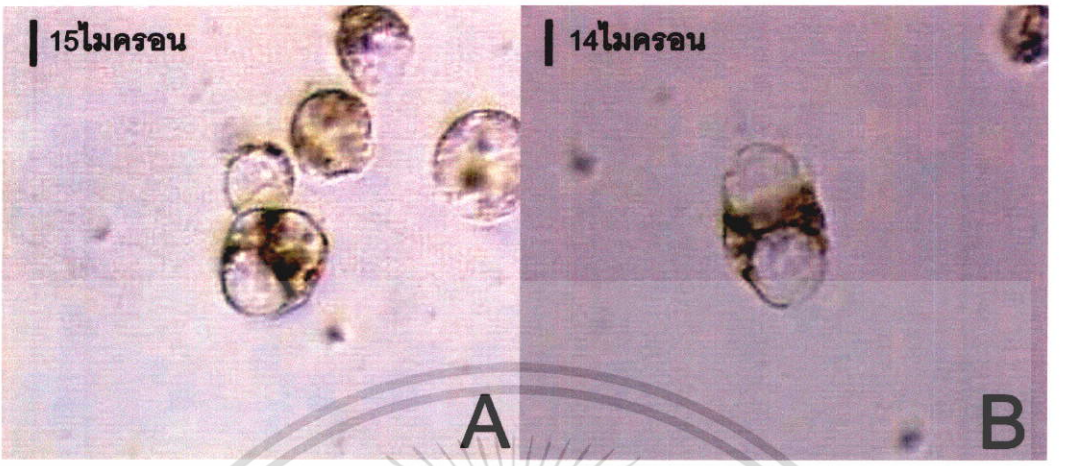
ภาพที่ 4.15 ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์ลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 5.2</u> ศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยงแครอทและยาสูบ ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ nurse culture ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส

จากการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ ด้วยวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบ nurse culture ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส โดยนำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร KM8P(B) ที่เติมด้วย NAA 2.5 μM BA 2 μM และ mannitol 0.7 M ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ nurse culture โดยใช้ เซลล์พี่เลี้ยง 2 ชนิด คือ แครอท และ ยาสูบ พบว่า การใช้แครอท และ ยาสูบ เป็นเซลล์พี่เลี้ยงในวิธีการ nurse culture ไม่มีผลต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัส และ ในการศึกษาไม่สามารถตรวจนับเซลล์ของโปรโตพลาสต์แต่ละลักษณะได้ เนื่องจากวิธีการเลี้ยงแบบ nurse culture เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง แล้วหยดโปรโตพลาสต์บนกระดาษกรองที่วางทับบนผิวแคลลัส ซึ่งกระดาษกรองนั้นเป็นอุปสรรคในการตรวจวัดลักษณะของโปรโตพลาสต์ ทำให้ไม่สามารถตรวจนับเซลล์ของโปรโตพลาสต์แต่ละลักษณะได้ จากการทดลอง พบว่า การใช้แครอทเป็นเซลล์พี่เลี้ยงนั้น แคลลัสของแครอทสามารถเจริญเติบโตได้ต่อไป แคลลัสมีสีเหลืองปนเขียว มีขนาดใหญ่ขึ้น ในขณะที่แคลลัสของยาสูบที่ใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงนั้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงบนกระดาษกรองในเซลล์พี่เลี้ยงทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 A B ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม

ภาพที่ 4.17 A B C ลักษณะเซลล์ของโปรโตพลาสต์แบ่งแบบกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การทดลองที่ 6</u> ศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยนำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบ NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM และ mannitol 0.7M ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ thin layer และทำการเติมอาหารที่ไม่มี mannitol ทุกๆ 1 2 3 4 5 6 และ 7 วันของการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 15 วัน จากการทดลองพบว่า ในทุกๆวิธีการโปรโตพลาสต์จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และพบการเปลี่ยนแปลงของcell membrane โดยโปรโตพลาสต์ที่พบหลังการสกัดจะมี cell membrane บางใส (ภาพที่ 4.7A) แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเพียงหนึ่งวันโปรโตพลาสต์เริ่มมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป cell membrane หนาขึ้น มีสีเข้ม (ภาพที่ 4.7B) มีการสร้างผนังเซลล์แล้ว โดยจะพบโปรโตพลาสต์ 7 ลักษณะ คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม และ เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่มีการลดออสโมติคัมในช่วง 1 และ 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ยังมีเม็ดคลอโลพลาสต์สีเขียวอยู่ในเซลล์ โดยเม็ดคลอโรพลาสต์มักจะมาอยู่ติดกับผนังเซลล์ เริ่มพบการแตกของเซลล์บ้างเล็กน้อย และเมื่อเลี้ยงครบ 7วัน พบว่า โปรโตพลาสต์ที่ได้รับการลดออสโมติคัมในช่วง 1 2 และ 3 วันของการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเล็กน้อย เม็ดคลอโรพลาสต์เริ่มสลายไป มีเซลล์แตกมากขึ้น ในขณะที่ โปรโตพลาสต์ได้รับการลดออสโมติคัมในช่วง 4 ถึง 7 วันหลังการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์จะมีสีน้ำตาลเข้มกว่า เซลล์แตกมากขึ้น และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 15 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ที่ได้รับการลดออสโมติคัมในทุกๆระยะเวลา มีสีน้ำตาลเข้ม มีเซลล์แตกมาก พบเศษเซลล์ที่ก้นของภาชนะเพาะเลี้ยง และไม่พบการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ (ภาพที่ 4.8)

เซลล์แบบแตกหน่อเดียว

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบบแตกหน่อเดียวซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อขึ้นหนึ่งหน่อ โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน เป็นลักษณะของการที่โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ไซโทพลาซึมจึงดันผ่านบริเวณที่อ่อนของผนังเซลล์ออกมาเป็นผลให้เกิดการแตกหน่อ (ภาพที่ 4.9 A B C) ในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ2วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวสูงที่สุด คือ 1.81 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 5 และ 7 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็น 1.57% และการลดออสโมติคัมทุกๆ 3 4 และ 6 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวเป็น 1.45 1.28 และ1.19% ตามลำดับ และต่ำที่สุดเมื่อทำการลดออสโมติคัมทุกๆ 1 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อเดียวเป็น 0.92% (ภาพที่ 4.18)

เซลล์แบบแตกหลายหน่อ

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบบแตกหลายหน่อซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแตกหน่อขึ้นหลายๆหน่อ การแตกหน่อมักเกิดด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น หน่อที่แตกขึ้นมาใหม่จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เดิม โดยส่วนของผนังเซลล์ที่แตกออกมาใหม่จะบางกว่าผนังของเซลล์เดิมชัดเจน (ภาพที่ 4.10 A B C)ที่พบในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ 6 วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อสูงที่สุด คือ 2.03 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 1 3 2 7 5 และ 4 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อเป็น 1.91 1.86 1.72 1.60 1.31 และ 1.21% ตามลำดับ(ภาพที่ 4.18)

เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปไม่เป็นทรงกลม อาจเป็นทรงรีหรือบิดเบี้ยวไป บางเซลล์ยาวขึ้นและขอดตรงกลาง ผนังเซลล์หนาเท่ากันทั้งเซลล์ (ภาพที่ 4.11 A B C) ที่พบในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ1วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างสูงที่สุด คือ 2.97 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 3 2 4 5 8 และ 6 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น 2.92 2.79 2.66 2.53 2.29 และ 2.21% ตามลำดับ(ภาพที่ 4.18)

เซลล์แบบเกิดระยางค์

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบบเกิดระยางค์ซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีระยางค์เกิดขึ้นที่ผิวเซลล์ ระยางค์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเส้นยาวออกมาจากเซลล์ ยาวบ้างสั้นบ้าง บางเซลล์เกิดมากกว่าหนึ่งเส้น ระยางค์ใสไม่มีส่วนของเม็ดคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 4.12 A B C)ที่พบในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ 6 วันของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์สูงที่สุด คือ 0.33 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 5 2 7 และ 3 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เป็น 0.24 0.19 0.14 และ 0.13% ตามลำดับ และ ต่ำที่สุดเมื่อทำการลดออสโมติคัมทุกๆ 1 และ 4 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบเกิดระยางค์เป็น 0.06%(ภาพที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ และเห็น cell plate อย่างชัดเจนที่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ หรือบางเซลล์ cell plate อาจไม่ได้อยู่กึ่งกลางเซลล์ (ภาพที่ 4.13 A B C) ที่พบในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ1วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์สูงที่สุด คือ 1.60 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 2 3 6 4 7 และ 5 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเป็น 1.27 1.23 1.02 0.95 0.91และ 0.76% ตามลำดับ(ภาพที่ 4.18)

เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามเซลล์ ซึ่งจะเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งจากหนึ่งเซลล์เป็นสามเซลล์ โดยจะเห็น cell plate ในสองตำแหน่งทำให้มองเห็นเป็นสามส่วนในหนึ่งเซลล์ (ภาพที่ 4.16 A B) ที่พบในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ 1 และ 3 วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามเซลล์สูงที่สุด คือ 0.24 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 5 และ 2 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามเป็น 0.22 และ 0.17% ตามลำดับ และ การลดออสโมติคัมทุกๆ 4 6 และ7 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสามเท่ากัน คือ 0.12% (ภาพที่ 4.18)

เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เซลล์แบ่งแบบกลุ่มที่พบเป็นกลุ่มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์หลายๆครั้งจนเซลล์ซ้อนกันอย่างหนาแน่นไม่สามารถแยกจากกันได้ กลุ่มของเซลล์มีขนาดใหญ่บ้างเล็กบ้าง (ภาพที่ 4.17 A B C) ซึ่งในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ1วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มสูงที่สุด คือ 0.67% กลุ่มเซลล์จะมีขนาดใหญ่ เกาะกันแน่น และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ การลดออสโมติคัมทุกๆ 2 5 4 6 และ 3 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มเป็น 0.38 0.27 0.19 0.16 และ 0.13% ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ และ การลดออสโมติคัมทุกๆ7วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์แบ่งแบบกลุ่มต่ำที่สุด คือ 0.10 % ซึ่งกลุ่มเซลล์ที่พบจะมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลรวมของลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรโตพลาสต์ทั้งหมด

จากการศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด คือ เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม และ เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม ที่พบในแต่ละระยะเวลาการลดออสโมติคัมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากตารางที่ 4.6 พบว่า การลดออสโมติคัมทุกๆ 1 วัน ของการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดสูงที่สุด คือ 8.37 % รองลงมา คือ การลดออสโมติคัมทุกๆ 2 3 6 5 7 และ 4 วันของการเพาะเลี้ยง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดเป็น 8.33 7.93 7.05 6.91 6.73 และ 6.37% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18)

ตารางที่ 4.6 ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

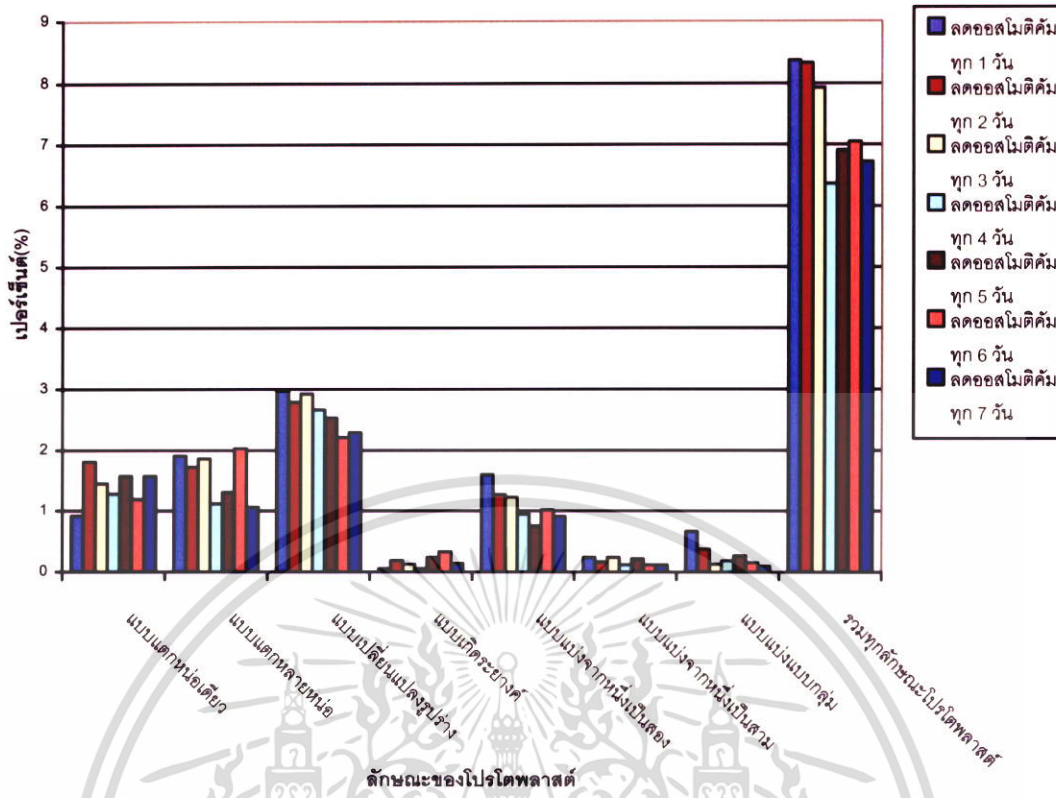
จำนวนวัน	การเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ(%)(±SE)							
	แบบแตกหน่อเดียว	แบบแตกหลายหน่อ	แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง	แบบเกิดระยางค์	แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง	แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม	แบบแบ่งแบบกลุ่ม	รวม
1	0.92±0.06	1.91±0.99	2.97±0.27	0.06±0.03	1.60±0.11	0.24±0.07	0.67±0.16^{a}	8.37±1.10
2	1.81±0.21	1.72±0.17	2.79±0.12	0.19±0.02	1.27±0.40	0.17±0.10	0.38±0.18^{b}	8.33±0.15
3	1.45±0.16	1.86±0.57	2.92±0.32	0.13±0.04	1.23±0.04	0.24±0.03	0.13±0.08^{bc}	7.93±0.41
4	1.28±0.04	1.12±0.51	2.66±0.33	0.06±0.00	0.95±0.09	0.12±0.06	0.19±0.03^{bc}	6.37±0.04
5	1.57±0.35	1.31±0.04	2.53±0.47	0.24±0.04	0.76±0.20	0.22±0.01	0.27±0.01^{bc}	6.91±0.24
6	1.19±0.40	2.03±0.89	2.21±0.08	0.33±0.20	1.02±0.18	0.12±0.02	0.16±0.03^{bc}	7.05±1.58
7	1.57±0.76	1.06±0.54	2.29±0.23	0.14±0.04	0.91±0.10	0.12±0.03	0.10±0.10^{c}	6.73±0.88
f-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
cv(%)	23.47	23.30	5.17	14.47	12.42	21.58	14.65	6.77

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวง พบว่า การนำแคลลัสบัวหลวงที่สับละเอียดแล้วมาแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase 4% Pectinase 2% ร่วมกับ Pectolyase 0.1% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีความเหมาะสมในการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสมากที่สุด เนื่องจาก สามารถทำให้แคลลัสปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมาก 3.17 x 10^4โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และทำให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 89.08% จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาในการแช่เพิ่มขึ้นจะทำให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง สอดคล้องกับที่ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุธาทิพย์ การรักษา (2545) รายงานว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ใบมะเขือเทศนานขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จะลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมามีโอกาสถูกย่อยเยื่อหุ้มเซลล์นานขึ้น โปรโตพลาสต์จึงแตกเพิ่มขึ้น และ สิ่งเจือปนที่อยู่ในเอ็นไซม์มีผลต่อไซโตพลาซึม ดังนั้นในระหว่างการสกัดโปรโตพลาสต์จึงจำเป็นต้องให้เซลล์อยู่ในสารละลายเอ็นไซม์น้อยที่สุด จนกว่าการทำลายผนังเซลล์สิ้นสุดลง (คำนูญ กาญจนภูมิ. 2545) และการใช้ mannitol ที่ความเข้มข้น 0.7 M เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้รักษาแรงดันออสโมติกในช่วงการสกัดโปรโตพลาสต์ ซึ่งสอดคลองกับระดับ mannitol ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของพืชชนิดอื่น เช่น ต้นยาง (Cazaux and Auzac. 1994) แอปเปิล(Hurwitz and Agrios. 1984) กีวี่(Cai *et al.* 1993)หรือ sour cherry(Ochatt. 1990.)และจากใบบัวหลวงอายุ 9 วัน (สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี.2544) โดยระดับ osmotic potential ของโปรโตพลาสต์จะผันแปรไปตามแหล่งของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ใช้แต่โดยทั่วไประดับ mannitol ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.3-0.7 M (Eriksson. 1989)

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นแคลลัส

จากการศึกษาสูตรอาหารดัดแปลง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่พบในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากอาหารทั้ง 4 สูตร ดัดแปลงให้ใช้น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนชนิดเดียวกันจึงทำให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างกัน ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยง พบว่า วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยงมากที่สุด เนื่องจากโมเลกุลของสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง และโปรโตพลาสต์สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ สำหรับวิธี liquid over agarose จะทำให้โปรโตพลาสต์มาเกาะกลุ่มกัน และวิธี agarose bead นั้นไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์จะถูกตรึงและกระจายอยู่ในอาหาร โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างอิสระเหมือนการเลี้ยงในอาหารเหลว ทำให้การแลกเปลี่ยนสารประกอบที่จำเป็นต่อเซลล์มีประสิทธิภาพลดลง สอดคล้องกับ ประสาทพร สมิตะมาน (2541) ซึ่งกล่าวว่า อาหารเหลวเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ในระยะแรกมากกว่าอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในระยะแรกโปรโตพลาสต์อยู่ในสภาพที่ยังไม่สามารถสังเคราะห์สารประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญได้ ทำให้ต้องแลกเปลี่ยนสารประกอบจากภายนอกและในอาหารเหลวการแลกเปลี่ยนสารประกอบทำได้อย่างมีประสิทธภาพมากกว่าอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร KM8P(B) ร่วมกับวิธี thin layer ทำให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์รวมสูงที่สุด อาจเนื่องมาจาก อาหาร KM8P(B) เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อนมักใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่นต่ำเพราะสามารถชดเชยเกลือแร่และเมทาบอไลต์บางอย่างที่สูญเสียไปในระหว่างการสกัดโปรโตพลาสต์(คำนูญ กาญจนภูมิ. 2545) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ orchardgrass (Horn *et al.* 1998)และ *Gentiana crassicaulis* (Meng *et al.* 1996) และเมื่อใช้ร่วมกับวิธี thin layer ซึ่งโมเลกุลของสารแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง จึงมีผลให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์รวมสูงที่สุด

สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวง พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM ทำให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนามากที่สุด โดยทำให้เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง มีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ 1.06% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชนิด และ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรอื่นๆและยังมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมด สูง คือ 7.24% ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงมักเริ่มด้วยออกซินในปริมาณที่สูง เช่น NAA หรือ 2,4-D ในปริมาณ 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร (5 -15µM) ร่วมกับไซโทไคนินในปริมาณต่ำ เช่น BAP หรือ Zeatin 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.4-4 µM)(คำนูญ กาญจนภูมิ. 2545) และตามที่ ภัควดี ภักดีงาม (2545) ได้ศึกษาการเกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสบัวหลวงในอาหารที่มี NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM แคลลัสจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และยังสอดคล้องกับการศึกษาการชักนำแคลลัสในต้นหน้าแมว ที่พบว่า การใช้ NAA 2.6 µM ร่วมกับ BA 2.2 µM สามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด (Prakash *et al.* 1999)

การศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส พบว่า การใช้แครอทและยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงมีผลให้การเกิดเซลล์ลักษณะต่างๆของโปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ต่ำ จากงานทดลองของ Li *et al.*(1990) พบว่าลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของเซลล์พี่เลี้ยงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์ และการช่วยการเจริญของเซลล์พี่เลี้ยงต่อโปรโตพลาสต์ ดูเหมือนว่าจะเกี่ยวพันกับสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโตของเซลล์พี่เลี้ยง ซึ่งการที่เซลล์พี่เลี้ยงมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วอาจทำให้องค์ประกอบที่สำคัญในอาหารถูกใช้หมดไปทำให้ไปขัดขวางการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า แคลลัสของแครอทที่ใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงในวิธีการเลี้ยงทั้ง 3 วิธี คือ liquid over agarose , feeder cell และ nurse culture มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว แคลลัสแครอทจึงอาจไปดูดใช้อาหารของโปรโตพลาสต์ ทำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงไม่สามารถพัฒนาต่อได้ สำหรับการใช้ยาสูบเป็นเซลล์พี่เลี้ยงในวิธีการเลี้ยงทั้ง 3 แบบ ถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสยาสูบจะไม่ดีแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด แต่ก็ยังไม่สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาต่อได้ อาจเป็นเพราะว่ายาสูบมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของบัวหลวง สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ *Brassica oleracea* ของ Walters and Earle (1990) ที่ศึกษาการใช้เซลล์พี่เลี้ยง 4 ชนิด คือ เซลล์แขวนลอย *Brassica oleracea* เซลล์แขวนลอยมะเขือเทศ เซลล์แขวนลอยข้าว และ เซลล์แขวนลอยยาสูบ พบว่า การใช้เซลล์แขวนลอยของ *Brassica oleracea* และ มะเขือเทศ เป็นเซลล์พี่เลี้ยงจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างโคโลนีของโปรโตพลาสต์ *Brassica oleracea* ในขณะที่การใช้เซลล์แขวนลอยของข้าว และ ยาสูบ เป็นเซลล์พี่เลี้ยงไม่สามารถทำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์และโคโลนีได้

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ตั้งแต่การทดลองที่ 3 จนถึงการทดลองที่ 5 จะพบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ และ แบ่งเซลล์ ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของเซลล์แบบต่าง ๆ ทั้ง 7 ลักษณะ คือ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเกิดระยางค์ และ เซลล์แบ่งแบบกลุ่ม ในการทดลองที่ 6 จึงได้ศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสม ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกพัฒนาเป็นแคลลัส พบว่า การลดระดับออสโมติคัมทุกๆ 1 วันของการเพาะเลี้ยงทำให้เซลล์ของโปรโตพลาสต์มีการพัฒนาจนได้เป็นกลุ่มเซลล์สูงที่สุด คือ 0.67% และแตกต่างจากการลดระดับออสโมติคัมในวันอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดลักษณะเซลล์แบบต่างๆ รวมกันสูงที่สุด คือ 8.37% สอดคล้องกับที่ คำนูญ กาญจนภูมิ (2545) ได้กล่าวไว้ว่า ตราบใดที่โปรโตพลาสต์ยังไม่สร้างผนังเซลล์ ในอาหารเพาะเลี้ยงก็คงยังต้องการสารปรับระดับความดันอยู่ แต่เมื่อโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์และมีการแบ่งเซลล์แล้ว ควรมีการปรับแรงดันออสโมซิสของอาหารให้ค่อยๆลดลง ด้วยการเติมอาหารใหม่ที่ไม่มีสารออสโมติคัมหรือมีในปริมาณที่น้อยลง และเมื่อโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีขนาดใหญ่แล้วจึงย้ายลงสู่อาหารใหม่ที่ไม่มีสารออสโมติคัม (ประภา ศรีพิจิตต์. 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาทั้งหมดที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น พบว่า สามารถหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก จนสามารถชักนำให้โปรโต-พลาสต์เกิดเป็นเซลล์แบ่งแบบกลุ่มได้ แต่ยังไม่สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกพัฒนาเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ได้ จึงควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆที่สำคัญ เช่น ศึกษาอาหารพื้นฐานชนิดอื่น หรือ การใช้อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอนปาติน อาร์จินิน พิวรีน ไพริมิดิน หรือ สารสกัดจากมอลท์ และยีสต์ ซึ่งมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลัสได้ด้วย ศึกษาการดัดแปลงปริมาณและระยะเวลาในการลดอสโมติคัม ชนิดของออสโมติคัม หรือ การใช้เซลล์พี่เลี้ยงชนิดอื่นที่มีพันธุกรรมที่เหมาะสม ซึ่งอาจมีผลช่วยชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์จากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงได้ต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่า สามารถสกัดโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุดในสารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย Pectinase 2% Cellulase 4% Pectolyase 0.1% mannitol 0.7 M และ MES 5 mM (pH 5.7) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก ($4.33x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด)และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุด(82.92%)

สำหรับการศึกษาชนิดของสูตรอาหารดัดแปลง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ การใช้วิธีการเลี้ยงแบบ thin layer มีผลให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาของเซลล์ลักษณะต่างๆรวมกันสูงที่สุด คือ 12.62% และ ลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์แบบแตกหน่อเดียว และ เซลล์แบบแตกหลายหน่อ มีค่าสูงที่สุด คือ 0.66 3.22 และ 5.26% ตามลำดับ

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร KM8P(B) ร่วมกับ การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.5 µM ร่วมกับ BA 2 µM ทำให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนามากที่สุด โดยทำให้เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ มีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ 1.06% และมีเปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์ทั้งหมดสูง คือ 7.24%

สำหรับการศึกษาชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพัฒนาเป็นแคลลัส พบว่า การใช้เซลล์พี่เลี้ยงทั้งแครอทและยาสูบ ร่วมกับ วิธีการเลี้ยงทั้ง 3 แบบ คือ liquid over agarose, feeder layer และ nurse culture ไม่เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เพราะมีผลให้การเกิดเซลล์ลักษณะต่างๆของโปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ต่ำ

การศึกษาระยะเวลาการลดออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์พบว่า การลดระดับออสโมติคัมทุกๆ 1 วันของการเพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์ของโปรโตพลาสต์มีการพัฒนาจนได้เซลล์แบ่งแบบกลุ่มสูงที่สุด คือ 0.67% และทำให้เปอร์เซ็นต์ผลรวมของลักษณะเซลล์แบบอื่นๆรวมกันสูงที่สุด คือ 7.70%(เซลล์แบบแตกหน่อเดียว เซลล์แบบแตกหลายหน่อ เซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เซลล์แบบเกิดระยางค์ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง และ เซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กุลวรา จารุพันธุ์ และ จันทิมา วรสัมปุรสะ. 2544. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์ "สัตตบงกช" ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คณิตา เลขะกุล. 2535. **บัว ราชินีแห่งไม้น้ำ :มูลนิธิสวนหลวง ร.9**. กรุงเทพ ฯ : ด่านสุทธาการพิมพ์จำกัด.

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

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

จตุพร กุลอึ้ง. 2540. "การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น และการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิตเกษม เที่ยงจิตต์. 2545. "การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก". ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณพพร ดำรงศิริ. 2530. **พฤกษอนุกรมวิธาน**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ : น่ำกังการพิมพ์.

ประภา ศรีพิจิตต์ และ เสาวรี ตังสกุล. 2543. "การสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวหอม (*Orysa sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105". **วารสารวิชาการเกษตร**.18(3) : 265-275.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2536. **เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการ เรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง**. นครปฐม : ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2541. **โปรโตพลาสต์เทคโนโลยี**. เชียงใหม่ : นพบุรีการพิมพ์.

ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร. 2541. **รายชื่อกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกไม้ดอกเชิงการค้าปี 2539**. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร.

ภัควดี ภักดีงาม. 2545. "การศึกษาผลของแสงร่วมกับ ∝ -Napthalene Acetic Acid และ Benzyladenine ต่อการเกิดโซมาติคเอมบริโอจีนีซีสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก". ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มณฑารพ สุธาธรรม. 2540. "การศึกษาเบื้องต้นในการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก". ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

ละออ เส็งประชา. 2542. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. นครปฐม : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครปฐม.

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

สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520. **ทะเบียนพันธุ์ไม้ประดับ**. กรุงเทพ ฯ : บพิธการพิมพ์.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. **พรรณไม้น้ำ**. กรุงเทพ ฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนทรี สิงหบุตรา. 2536. **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด**. กรุงเทพฯ : โอเอส พริ้นติ้งเฮ้าส์.

สุเม อรัญนารถ. 2537 . บัวตัดดอกที่อนาคตยังสดใส. **ชัยพฤกษ์วิทยาศาสตร์**. 291:30-32.

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี. 2544. "การแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก". ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุเมธ ตรีศักดิ์ศรี. 2546. "การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เสริมลาภ วสุวัต. 2537. **บัวไม้ดอกไม้ประดับ**. กรุงเทพ ฯ : อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลัชชิ่ง .

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์**. กรุงเทพฯ:อติสรรค์.

โอฬาร พิทักษ์. 2539. **การผลิตและการจัดการพืชสวนประดับ หน่วย** 3. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

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

Burza,W. and Malepszy,S. 1995. "*In Vitro* Culture of *Cucumis sativus* L. XVIII.Plants from Protoplasts through Direct Somatic Embryogenesis." **Plant Cell , Tissue and Organ Culture**.41 : 259-266.

Cai,G.Q. Qian,Q.Y. Ke,Q.S. and He,C.Z. 1993. "Regeneration of Plants from Protoplast of Kiwifruit(*Actinidia deliciosa*)". 3-17. In Bajaj,Y.P.S.(ed.)**Biotechnology on Agriculture and Forestry V.23**.Verlag Berlin Heidelberg:Springer.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cazaux,E. and Auzac,J. 1994. "Microcallus Formatiom from *Hevea brasiliensis* Protoplast Isolated from Embryogenic Callus". **Plant Cell Reports** .13 : 272-276.

Chen,Z. Evans,A.D. Sharp,R.W. Ammirato,V.P. and Sondahl,R.M. 1990. **Handbook of Plant Cell Culture V.6.**United States of America : McGraw - Hill.

Core,L.E. 1955. **Plant Taxonomy**. New Jersey : Prentice –Hall.

Datta,K. Potrykus,I. and Datta,K.S. 1992. "Efficient Fertile Plant Regeneration from Protoplast of the Indica Rice Breeding Line IR72(*Oryza sativa* L.)". **Plant Cell Reports. 11 : 229-233.**

Dhir,K.S. Dhir,S. and Widholm,M.J. 1991. "Plantlet Regeneration form Immature Cotyledon Protoplasts of Soybean(*Glycine max* L.)". **Plant Cell Reports** .10 : 39-43.

Dunbar,B.K. 1993. "Regeneration of Plants from Protoplast of *Pelargonium* spp. (Geranium).". 89-96. In Bajaj,Y.P.S.(ed.). **Biotechnology on Agriculture and Forestry V.22.** Verlag Berlin Heidelberg : Springer.

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

Horn,E.M. Conger,V.B. and Harms,T.C. 1998. "Plantlet Regeneration from Protoplasts of Embryogenic suspension cultures of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)." **Plant Cell Reports.** 7:371-374.

Hurwitz,D.C. and Agrios,N.G. 1984. "Isolation and of Protoplasts from Apple Callus and Cell Suspension Cultures". **J.Amer .Soc. Hort.Sci. 109** : 348-350.

Kao,K.N. 1977. "Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*.". **Mol Gen Cenet.** 150:225-230.

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.

Kitamura,Y. 1993. "Regeneration of Plant from Protoplasts of *Duboisia*.". 18-31. In Bajaj,Y.P.S.(ed.). **Plant Protoplast and Genetic Engineering VI**. Verlag Berlin Heidelberg : Springer .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krautwig,B. Lazzeri,A.P. and Lorz,H. 1994. "Influence of Enzyme Solution on Protoplast Culture and Transient Gene Expression in Maize(*Zea mays* L.)". **Plant Cell ,Tissue and Organ Culture.** 39 : 43-48.

Li,Z. and Murai,N. 1990. "Efficient Plant Regeneration from Rice Protoplasts in General Medium.". **Plant Cell Reports.** 9 : 216-220.

Li,R. Sun,Y. Zhang,L. and Li,X. 1990. "Plant Regeneration from Cotyledon Protoplasts of Xinjiang muskmelon.". **Plant Cell Reports.** 9 : 199-203.

Logan,F.O. and Sink,C.K. 1988. "Plant Regeneration from Protoplasts of *Petunia alpicola*.". **Plant Science.** 23(2) : 393-395.

Meng,Y. Gao,Y. and Jia,J. 1996. "Plant Regeneration from Protoplasts Isolation from Callus of *Gentiana crassicaulis*." **Plant Cell Reports** .16:88-91

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

Nagata,T. and Takebe,I. 1971."Isolation and Culture of protoplast from Brassica." **Planta.** 99:12-20.

Niizeki,M. 1993. "Regeneration of Plants from Protoplast of *Lotus* spp. (Birdsfoot Trefoil).". 69-78. In Bajaj,Y.P.S(ed.). **Biotechnology on Agriculture and Forestry V.22.** Verlag Berlin Heidelberg:Springer.

Ochatt,J.S. 1990. "Plant Regeneration from Root Callus Protoplasts of Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.).". **Plant Cell Reports.** 9 : 268-271.

Oliveira,M.M. and Pais,S.S.M. 1991. "Plant Regeneration from Protoplats of Long-term Callus Culture of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayword(Kiwifruit)." **Plant Cell Reports** .9 : 643-646.

Park,G.Y. and Son,H.S. 1992. "*In Vitro* Shoot Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplast of Hybrid Poplar(*Populus nigra* x *P. maximowiczii*).". **Plant Cell Reports.** 11 : 2-6.

Prakash,E. 1999. "Regeneration of Plant from Seed Derived Callus *of Hybanthus enneraspermus* L. Muell.,A Rare Ethnobotanical.". **Plant cell Reports.** 18(10) : 873-878.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Punja,K.Z. Tang,A.F. and Sarmento,G.G. 1990. "Isolation, Culture and Plantlet Regeneration form Cotyledon and Mesophyll Protoplasts of Two Plckling Cucumber(*Cucumis sativus* L.) Genotypes.". **Plant Cell Reports.** 9 : 61-64.

Schenk,R.U. and Hildebrant,A.C. 1972."Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures." **Can.J.Bot.**50:199-204.

Tello,V.A. Hidaka,M. and Uozumi,T. 1995. "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Isolated Protoplasts of *Lavatera thuringiaca.*". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 40 : 169-177.

Terakawa,T. Sato,T. and Koike,M. 1992. "Plant Regeneration from Protoplast Isolated from Embryogenic Suspension Culture of Creeping Bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.).". **Plant Cell Reports.** 11 : 457-461.

Tsai,C.K. Chien,Y.C. Chou,Y.L. Wu,S.H. 1977. "Regeneration of plant from tobacco protoplasts and some factors affecting the plant differentiation.". **Sci Sin.** 20:458-468.

Walters,W.T. and Earle,D.E. 1990. "A Simple, Versatile Feeder Layer System for *Brassica oleracea* Protoplast Culture.". **Plant Cell Reports.** 9 : 316-319.

Wei,M.Z. and Xu,H.Z. 1993. "Regeneration of Plants from Protoplast of Sorghum (*Sorghum vulgare*).". 123-131. In Bajaj,Y.P.S.(ed.).**Biotechnology on Agriculture and Forestry** V.23. Verlag Berlin Heidelberg:Springer.

Xiu,Y.Z. Yi,D.H. and Harris,C.J.P. 1995. "Plant Regeneration form Protoplasts Isolated from Cotyledons of *Sesbania bispinosa.*". **Plant Cell ,Tissue and Organ Culture.** 40 : 119-123.

Xiu,Y.Z. Harris,C.J.P. and Yi,D.H. 1991. "Isolation and Culture of Protoplasts form Callus Tissue of *Hibiscus syriacus* L.". **Plant Cell ,Tissue and Organ Culture.** 25 : 17-19.

Zafar,Y. Nenz,E. Damiani,F. Pupilli,F. and Arcioni,S. 1995. "Plants Regeneration from Explant and Protoplasts Derived Calluses of *Medicago littoralis.*". **Plant Cell ,Tissue and Organ Culture.** 41 : 41-48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

สารเคมี	KM8P(B)	MS(A)	V-KM(A)	V-KM(B)
Macroelement (mg/l)				
NH_4NO_3	600	-	1444	-
KNO_3	1900	1900	1480	1480
$CaCl_2.2H_2O$	600	440	735	753
$MgSO_4.7H_2O$	300	370	934	934
KH_2PO_4	170	170	68	68
KCl	300	-	300	300
$FeSO_4.7H_2O$	-	27.8	27.8	27.8
Na_2-EDTA	-	37.3	37.3	37.3
Sequestrene 330 Fe	28	-	-	-
Microelement(mg/l)				
H_3BO_3	3	6.2	3	3
$MnSO_4.H_2O$	10	22.3	10	10
$ZnSO_4.2H_2O$	2	8.6	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	0.75	0.85	0.75	0.75
Sugar(g/l)				
Sucrose	10	10	10	10
Mannose	0.25	0.25	0.25	0.25
Glucose	5	5	5	5
Fructose	0.25	0.25	0.25	0.25
Ribose	0.25	0.25	0.25	0.25
Xylose	0.25	0.25	0.25	0.25
Rhamnose	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellbiose	0.25	0.25	0.25	0.25
Sorbitol	0.25	0.25	0.25	0.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ต่อ องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

Mannitol	0.7M	0.7M	0.7M	0.7M
Vitamins and Organic acid (mg/l)	-	2	-	-
Glycine	100	100	100	100
Inositol	1	0.5	1	1
Nicotinic acid	1	0.5	1	1
Pyridoxin-HCl	1	0.1	1	1
Thiamine-HCl	1	-	1	1
D-Ca-pantothenate	0.4	-	0.4	0.4
Folic acid	0.02	-	0.02	0.02
p-Aminobenzoci acid	0.01	-	0.01	0.01
Biotin	1	-	1	1
Cholinchloride	2	-	2	2
Ascorbic acid	0.01	-	0.01	0.01
Vitamin A	0.01	-	0.01	0.01
Vitamin D_3	0.02	-	0.02	0.02
Vitamin B_{12}	20	-	20	20
Na-pyruvate	40	-	40	40
Citric acid	40	-	40	40
Malate	40	-	40	40
Fumarate		-		
Organic supplement(mg/l)	250	-	250	250
Casein Hydrolysate	20 ml/l	20 ml/l	20 ml/l	20 ml/l
Coconut milk				
Others supplement	5mM	5mM	5mM	5mM
MES	5mM	5mM	5mM	5mM
PVP-10				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 2 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	373.41	53.3457	35.38**	2.66	4.03
Error	16	24.12	1.50			
Total	23	397.54	17.28			

Grand mean = 10.31 CV = 11.90%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.2 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 4 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	358.54	51.22	16.86**	2.66	4.03
Error	16	48.60	3.03			
Total	23	407.14	17.70			

Grand mean = 12.75 CV = 13.66%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.3 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 6 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	158.84	22.69	8.10**	2.66	4.03
Error	16	44.80	2.80			
Total	23	203.64	8.58			

Grand mean = 8.50 CV = 19.67%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 8 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	234.70	33.52	31.87**	2.66	4.03
Error	16	16.83	1.05			
Total	23	251.53	10.93			

Grand mean = 6.76 CV = 15.16%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.5 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 2 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	6108.28	872.61	20.51**	2.66	4.03
Error	16	680.59	42.53			
Total	23	6788.87	295.16			

Grand mean = 65.01 CV = 10.03%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.6 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 4 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	4754.02	679.14	5.76**	2.66	4.03
Error	16	1885.00	117.81			
Total	23	6639.02	288.65			

Grand mean = 44.36 CV = 24.46%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 6 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	2222.79	317.54	4.16**	2.66	4.03
Error	16	1221.86	76.36			
Total	23	3444.86	149.76			

Grand mean = 19.18 CV = 45.54%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.8 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ในชั่วโมงที่ 8 แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	7	737.52	105.36	2.08**	2.66	4.03
Error	16	811.00	50.68			
Total	23	1548.52	67.32			

Grand mean = 8.43 CV = 84.39%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.9 วิเคราะห์ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อจำนวนของโปรโตพลาสต์แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	4	831.43	207.85	130.73**	3.48	5.99
Error	10	15.9	1.59			
Total	14	847.33				

Grand mean = 13.36 CV = 9.43%

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 วิเคราะห์ผลของระดับความเข้มข้นของ mannitol ต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	4	2597.22	649.30	1.85^{ns}	3.48	5.99
Error	10	3506.75	350.67			
Total	14	6103.97				

Grand mean = 63.61 CV = 29.43%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.11 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	0.69	0.06	2.41**	2.08	2.80
A	3	0.07	0.02	0.95^{ns}	2.84	4.31
B	2	0.33	0.16	6.32**	3.22	5.18
A +B	6	0.28	0.04	1.83^{ns}	2.33	3.29
Error	36	0.94	0.02			
Total	47	1.63	0.03			

Grand mean = 1.09 CV = 14.78%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	7.12	0.64	5.63**	2.08	2.80
A	3	0.85	0.28	2.48ns	2.84	4.31
B	2	5.16	2.58	22.46**	3.22	5.18
A +B	6	1.10	0.18	1.06ns	2.33	3.29
Error	36	4.13	0.11			
Total	47	11.25	0.23			

Grand mean = 1.36 CV = 24.81%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.13 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	15.01	1.36	5.80**	2.08	2.80
A	3	1.00	0.33	1.43ns	2.84	4.31
B	2	12.91	6.45	27.43**	3.22	5.18
A +B	6	1.09	0.1	0.77ns	2.33	3.29
Error	36	8.47	0.23			
Total	47	23.49	0.49			

Grand mean = 1.92 CV = 25.16%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	0.15	0.01	0.6^{ns}	2.08	2.80
A	3	0.04	0.01	0.69^{ns}	2.84	4.31
B	2	0.07	0.03	1.75^{ns}	3.22	5.18
A +B	6	0.04	0.006	0.32^{ns}	2.33	3.29
Error	36	0.76	0.02			
Total	47	0.92	0.01			

Grand mean = 1.05 CV = 13.84%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.15 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเกาะกลุ่มกัน แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	10.98	0.99	5.28^{**}	2.08	2.80
A	3	1.97	0.65	3.48^{*}	2.84	4.31
B	2	4.69	2.34	12.41^{**}	3.22	5.18
A +B	6	4.31	0.71	3.80^{**}	2.33	3.29
Error	36	6.81	0.18			
Total	47	17.80	0.37			

Grand mean = 1.40 CV = 30.93%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.16 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	8.66	0.78	6.86**	2.08	2.80
A	3	0.74	0.24	2.15ns	2.84	4.31
B	2	5.85	2.92	25.51**	3.22	5.18
A +B	6	2.06	0.34	2.99*	2.33	3.29
Error	36	4.13	0.11			
Total	47	12.79	0.27			

Grand mean = 1.51 CV = 22.39%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ ข.17 วิเคราะห์ผลของสูตรอาหารดัดแปลงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	11	36.27	3.29	14.9**	2.08	2.80
A	3	0.37	0.12	0.57ns	2.84	4.31
B	2	33.86	16.93	76.52**	3.22	5.18
A +B	6	2.03	0.33	1.53ns	2.33	3.29
Error	36	7.96	0.22			
Total	47	44.24	0.94			

Grand mean = 2.48 CV = 18.92%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.16	0.05	22.68**	4.07	7.59
Error	8	0.01	0.002			
Total	11	0.18	0.01			

Grand mean = 1.41 CV = 3.43%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ ข.19 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.02	0.007	0.56ns	4.07	7.59
Error	8	0.10	0.01			
Total	11	0.12	0.01			

Grand mean = 2.21 CV = 4.81%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.20 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์แบบเกาะกลุ่มกัน แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.02	0.006	1.75ns	4.07	7.59
Error	8	0.03	0.003			
Total	11	0.05	0.004			

Grand mean = 2.24 CV = 2.76%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.21 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.01	0.004	1.32^{ns}	4.07	7.59
Error	8	0.02	0.003			
Total	11	0.03	0.003			

Grand mean = 1.20 CV = 4.69%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.22 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.04	0.01	1.88^{ns}	4.07	7.59
Error	8	0.06	0.008			
Total	11	0.11	0.01			

Grand mean = 1.39 CV = 6.43%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.23 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.002	0.0008	2.00^{ns}	4.07	7.59
Error	8	0.003	0.0004			
Total	11	0.005	0.0005			

Grand mean = 1.01 CV = 1.96%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.24 วิเคราะห์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Treatment	3	0.08	0.02	1.26^{ns}	4.07	7.59
Error	8	0.17	0.02			
Total	11	0.25	0.02			

Grand mean = 2.84 CV = 5.12%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.25 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.06	0.06	1.72^{ns}	10.13	34.12
Treatment	3	0.01	0.004	0.12^{ns}	9.28	29.46
A	1	0.005	0.005	0.15^{ns}	10.13	34.12
B	1	0.002	0.0021	0.06^{ns}	10.13	34.12
A+B	1	0.005	0.005	0.15^{ns}	10.13	34.12
Error	3	0.109	0.03			
Total	7	0.18	0.02			

Grand mean = 1.14 CV = 16.75%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.26 วิเคราะห์ผลของเชลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเชลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.03	0.03	2.29^{ns}	10.13	34.12
Treatment	3	0.05	0.01	1.00^{ns}	9.28	29.46
A	1	0.03	0.03	2.29^{ns}	10.13	34.12
B	1	0.006	0.006	0.35^{ns}	10.13	34.12
A+B	1	0.006	0.006	0.35^{ns}	10.13	34.12
Error	3	0.05	0.01			
Total	7	0.14	0.02			

Grand mean = 1.07 CV = 12.22%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.27 วิเคราะห์ผลของเชลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเชลล์แบบเกาะกลุ่ม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.035	0.03	2.76^{ns}	10.13	34.12
Treatment	3	0.038	0.01	1.00^{ns}	9.28	29.46
A	1	0.035	0.03	2.76^{ns}	10.13	34.12
B	1	0.001	0.001	0.12^{ns}	10.13	34.12
A+B	1	0.001	0.001	0.12^{ns}	10.13	34.12
Error	3	0.038	0.012			
Total	7	0.111	0.01			

Grand mean = 1.06 CV = 10.57%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.28 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.01	0.01	0.11^{ns}	10.13	34.12
Treatment	3	0.21	0.07	0.50^{ns}	9.28	29.46
A	1	0.009	0.009	0.06^{ns}	10.13	34.12
B	1	0.04	0.04	0.35^{ns}	10.13	34.12
A+B	1	0.15	0.15	1.09^{ns}	10.13	34.12
Error	3	0.42	0.14			
Total	7	0.65	0.09			

Grand mean = 2.12 CV = 17.65%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.29 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.01	0.01	0.55^{ns}	10.13	34.12
Treatment	3	0.003	0.001	0.06^{ns}	9.28	29.46
A	1	0.003	0.003	0.16^{ns}	10.13	34.12
B	1	0.0002	0.0002	0.01^{ns}	10.13	34.12
A+B	1	0.0004	0.0004	0.02^{ns}	10.13	34.12
Error	3	0.06	0.02			
Total	7	0.07	0.01			

Grand mean = 1.09 CV = 13.05%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.30 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.52	0.52	22.39**	10.13	34.12
Treatment	3	0.14	0.04	2.02 ns	9.28	29.46
A	1	0.05	0.05	2.49 ns	10.13	34.12
B	1	0.02	0.02	1.24 ns	10.13	34.12
A+B	1	0.05	0.05	2.34 ns	10.13	34.12
Error	3	0.06	0.02			
Total	7	0.73	0.10			

Grand mean = 1.54 CV = 9.84%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.31 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.02	0.02	3.00 ns	10.13	34.12
Treatment	3	0.02	0.008	1.00 ns	9.28	29.46
A	1	0.02	0.02	3.00 ns	10.13	34.12
B	1	0.00	0.00	0.00 ns	10.13	34.12
A+B	1	0.00	0.00	0.00 ns	10.13	34.12
Error	3	0.02	0.008			
Total	7	0.07	0.01			

Grand mean = 1.05 CV = 8.7%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.32 วิเคราะห์ผลของเซลล์พี่เลี้ยงและวิธีการเลี้ยงต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.39	0.39	4.26^{ns}	10.13	34.12
Treatment	3	0.01	0.004	0.05^{ns}	9.28	29.46
A	1	0.0008	0.0008	0.01^{ns}	10.13	34.12
B	1	0.0008	0.0008	0.01^{ns}	10.13	34.12
A+B	1	0.01	0.011	0.12^{ns}	10.13	34.12
Error	3	0.27	0.09			
Total	7	0.68	0.09			

Grand mean = 2.63 CV = 11.56%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.33 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.01	0.01	0.94	5.99	13.75
Treatment	6	0.21	0.03	2.10^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.10	0.01			
Total	13	0.32	0.02			

Grand mean = 1.04 CV = 12.42%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.34 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแบ่งจากหนึ่งเป็นสาม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table F.05	F-table F.01
Block	1	0.02	0.02	3.23	5.99	13.75
Treatment	6	0.06	0.01	1.47^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.04	0.007			
Total	13	0.13	0.10			

Grand mean = 0.40 CV = 21.58%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.35 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบเกาะกลุ่ม แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table F.05	F-table F.01
Block	1	0.11	0.11	9.45	5.99	13.75
Treatment	6	0.43	0.07	5.79*	4.28	8.47
Error	6	0.07	0.01			
Total	13	0.63	0.04			

Grand mean = 0.47 CV = 23.47% * แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ

ตารางที่ ข.36 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table F.05	F-table F.01
Block	1	0.02	0.02	2.32	5.99	13.75
Treatment	6	0.07	0.01	1.29^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.05	0.009			
Total	13	0.15	0.01			

Grand mean = 1.90 CV =5.17 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.37 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหน่อเดียว แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.15	0.15	5.36	5.99	13.75
Treatment	6	0.18	0.03	1.06^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.17	0.02			
Total	13	0.51	0.03			

Grand mean = 1.16 CV = 14.65%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.38 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบแตกหลายหน่อ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.60	0.60	18.29	5.99	13.75
Treatment	6	0.19	0.03	1.00^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.19	0.03			
Total	13	1.00	0.07			

Grand mean = 1.25 CV = 14.47% ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ ข.39 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์แบบเกิดระยางค์แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.04	0.04	6.34	5.99	13.75
Treatment	6	0.17	0.02	3.69^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.04	0.007			
Total	13	0.26	0.02			

Grand mean = 0.37 CV = 23.30%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.40 วิเคราะห์ผลของระยะเวลาการลดออสโมติคัมต่อลักษณะของเซลล์รวมทุกลักษณะ แปลงข้อมูลแบบ $\sqrt{(X+1)}$

Source	df	SS	MS	F-test	F-table	
					F.05	F.01
Block	1	0.12	0.12	3.69	5.99	13.75
Treatment	6	0.26	0.04	1.33^{ns}	4.28	8.47
Error	6	0.20	0.03			
Total	13	0.59	0.04			

Grand mean = 2.71 CV = 6.77%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจิตเกษม เที่ยงจิตต์ เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2522 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้