บทที่ 3

ผลการทดลอง

การศึกษาเทคนิคการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้บางพันธุ์นี้ ได้แบ่งการรายงานผลเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ผลของการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้
2. ผลของการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์
3. ผลของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

1. ผลของการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ โดยสังเกตจากลักษณะภายนอก โดยศึกษาการเจริญและความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อ

1.1 ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส protocorm-like body

สูตร ก พบว่าแคลลัสที่ได้ของ Cattleya dowiana, Dendrobium x Jaquelyn Thomas และ Den. pachyphyllum มีสีเขียว-เหลือง หลังจากเลี้ยงแคลลัสต่อไปประมาณ 2 สัปดาห์ สีของแคลลัสจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองมากขึ้น แต่ยังสามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสสีเขียว-เหลืองได้อีก (ภาพที่ 2-4)

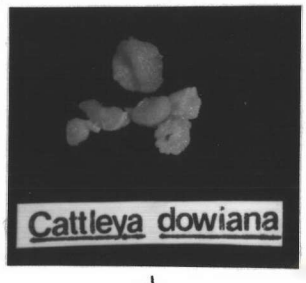
สูตร ค พบว่าแคลลัสที่ได้จากกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีจำนวนมาก สีของแคลลัสเป็นสีเขียวถึงเขียวเข้ม สามารถเจริญต่อไปได้แคลลัสสีเขียวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ภาพที่ 5-7)

1.2 ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้น

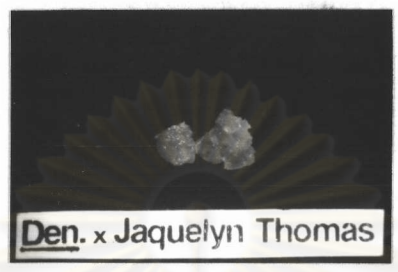
แคลลัสที่ได้จากเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในสูตร ก เมื่อย้ายลงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นทั้ง 2 สูตรคือ สูตร ข และ สูตร ง แคลลัสเจริญเป็นต้นน้อยมากและต้นที่ได้มีใบสีเหลือง (ภาพที่ 8-10) ส่วนแคลลัสที่ได้จากเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในสูตร ค เมื่อย้ายลงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร ข และสูตร ง แคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ทั้ง 2 สูตร (ภาพที่ 11-13) นอกจากนี้เมื่อเพาะเมล็ดของ C.dowiana, Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ในอาหารสูตร ข และสูตร ง ประมาณ 1 เดือน เกิด

protocorm ขึ้น หลังจากนั้นจึงพัฒนาเป็นต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ ได้ใบสีเขียวจำนวนมาก (ภาพที่ 14-18)

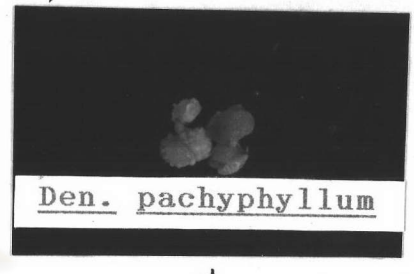
ภาพที่ 2-4 แคลลัสของกล้วยไม้ 3 พันธุ์ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตร ก (กำลังขยาย x 0.9)



ภาพที่ 2



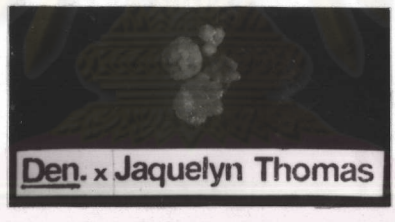
ภาพที่ 3



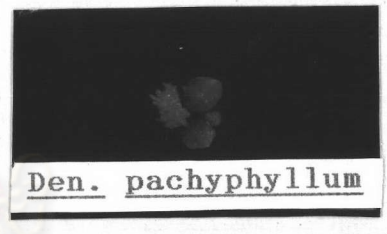
ภาพที่ 4

ภาพที่ 5-7 แคลลัสของกล้วยไม้ 3 พันธุ์ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตร ค (กำลังขยาย x 0.9)

ภาพที่ 5



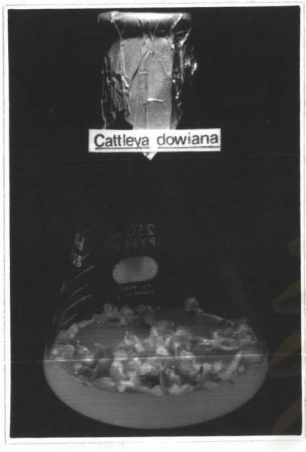
ภาพที่ 6



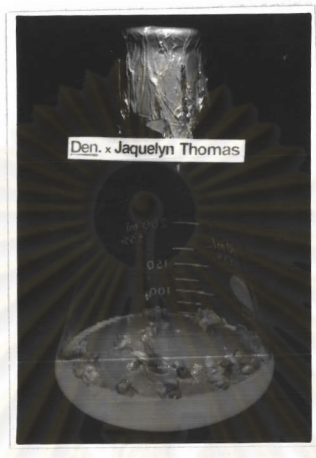
ภาพที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

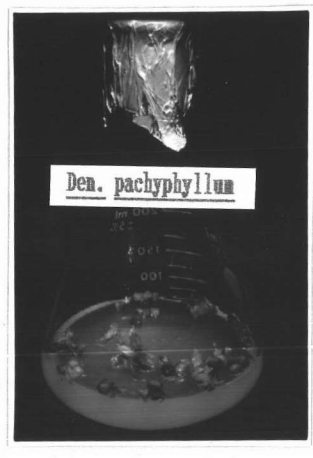
ภาพที่ 8-10 ต้นกล้วยไม้ 3 พันธุ์ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร ข หรือ สูตร ง ที่เจริญจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตร ก
(กำลังขยาย x 0.4)



ภาพที่ 8

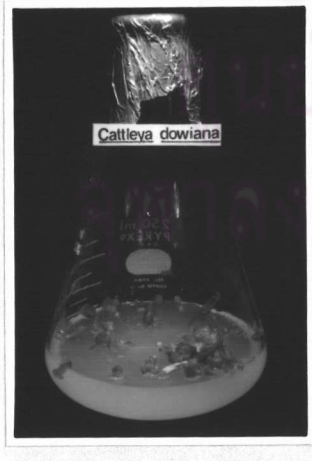


ภาพที่ 9

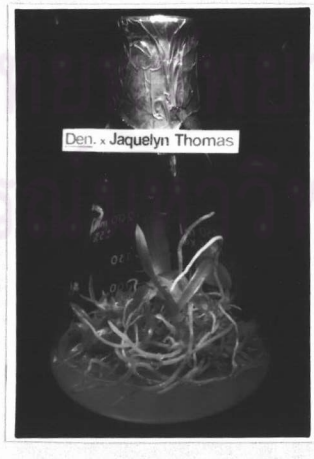


ภาพที่ 10

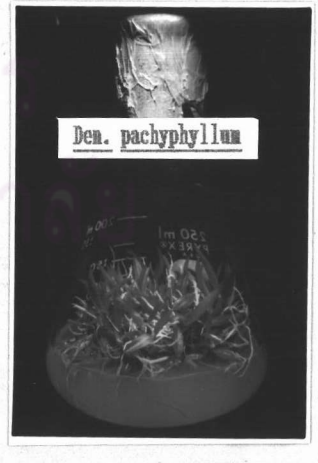
ภาพที่ 11-13 ต้นกล้วยไม้ 3 พันธุ์ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร ข หรือ สูตร ง ที่เจริญจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตร ค
(กำลังขยาย x 0.4)



ภาพที่ 11



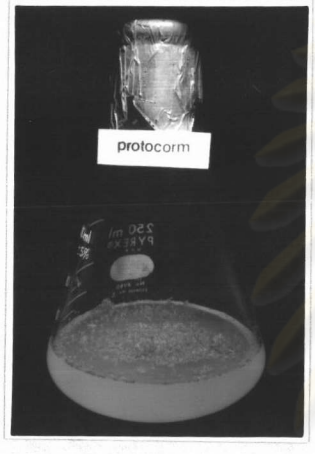
ภาพที่ 12



ภาพที่ 13

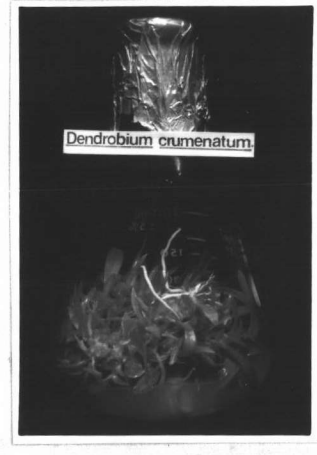
ภาพที่ 14 protocorm ของกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร ข หรือ สูตร ง (กำลังขยาย x 0.4)

ภาพที่ 15-18 ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร ข หรือ สูตร ง (กำลังขยาย x 0.4)



ภาพที่ 14

ภาพที่ 15



ภาพที่ 16

ภาพที่ 17

ภาพที่ 18

2 ผลของการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์และสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส อุณหภูมิ เวลาที่ใช้ ความเข้มแสง ขนาดของผ้ากรอง centrifugation เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ โดยใช้ปริมาณของแคลลัสหรือใบ 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์เมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างกันพบว่า การใช้ cellulase RS ความเข้มข้น 0.5% และ 1% กับ macerozyme R-10 0.2% ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์ เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ macerozyme R-10 เป็น 0.5% และ 1.0% ร่วมกับ cellulase RS 1.0% แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Spathoglotis hybrid ได้บ้างเล็กน้อย จากนั้นเปลี่ยน cellulase RS เป็น cellulase R-10 ซึ่งมีความบริสุทธิ์น้อยกว่า ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% และ macerozyme R-10 ความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0% พบว่า cellulase R-10 0.5% กับ macerozyme R-10 0.2% ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์ และ cellulase R-10 1.0% กับ macerozyme R-10 0.2% แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้บ้าง แต่จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้มีจำนวนน้อย ส่วนใหญ่โปรโตพลาสต์ยังอยู่กันเป็นกลุ่ม และเมื่อใช้ cellulase R-10 1.0% กับ macerozyme R-10 0.5% แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและใบของ C. dowiana ได้เล็กน้อย และจากใบของ Den. x Jaquelyn Thomas, Den. pachyphyllum, Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เป็น $0.15x10^6$, $0.24x10^6$, $0.78x10^6$, $1.13x10^6$ และ $1.20x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด ส่วน cellulase R-10 1.0% กับ macerozyme R-10 1.0% แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและใบของ C. dowiana และจากแคลลัสของ Den. x Jaquelyn Thomas และ Den. pachyphyllumได้เล็กน้อย และแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Den. x Jaquelyn Thomas, Den. pachyphyllum, Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวน $0.31x10^6$, $0.35x10^6$, $0.88x10^6$, $1.31x10^6$ และ $1.18x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด

ตารางที่ 4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ โดยใช้ mannitol 9.6% และ $CaCl_2$ 0.019% (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/แต่ละพันธุ์และความเข้มข้น)

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์	(x10^6) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด								
	C. dowiana		Den. x Jaquelyn Thomas[1] Den. pachyphyllum[2]				Den. crumenatum	Acriopsis-indica	Spathoglotis hybrid
	แคลลัส	ใบ	แคลลัส		ใบ		ใบ	ใบ	ใบ
			[1]	[2]	[1]	[2]			
cellulase RS 0.5%+macerozyme R-10 0.2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellulase RS 1.0%+macerozyme R-10 0.2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellulase RS 1.0%+macerozyme R-10 0.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	น้อยมาก*
cellulase RS 1.0%+macerozyme R-10 1.0%	-	-	-	-	-	-	-	-	น้อย*
cellulase R-10 0.5%+macerozyme R-10 0.2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellulase R-10 1.0%+macerozyme R-10 0.2%	-	-	-	-	-	-	-	น้อย**	น้อย*
cellulase R-10 1.0%+macerozyme R-10 0.5%	น้อยมาก	น้อยมาก	-	-	0.15*	0.24*	0.78*	1.13**	1.20*
cellulase R-10 1.0%+macerozyme R-10 1.0%	น้อยมาก	น้อยมาก	น้อย*	น้อย*	0.31*	0.35*	0.88*	1.31**	1.18*

หมายเหตุ : - หมายถึงแยกโปรโตพลาสต์ไม่ได้

น้อย หมายถึงจำนวนโปรโตพลาสต์ < 0.13x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด

น้อยมาก หมายถึงจำนวนโปรโตพลาสต์ < 0.06x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด

* หมายถึง มีผลิกรูปเข็ม

** หมายถึงมีผลิกรูปเข็มจำนวนมาก

ตารางที่ 5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ โดยใช้ cellulase R-10 1% กับ macerozyme R-10 0.5%) (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/แต่ละพันธุ์และความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ออสโมซิส)

ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส	($x10^6$) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด								
	C. dowiana		Den. x Jaquelyn Thomas[1] Den. pachyphyllum[2]				Den. crumenatum	Acriopsis-indica	Spathoglotis hybrid
	แคลลัส	ใบ	แคลลัส		ใบ		ใบ	ใบ	ใบ
glucose 9.01%	+	+	+[1]	+[2]	+[1]	+[2]	+	+	+
mannitol 9.10% + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mannitol 9.50% + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019%	+	+	+	+	น้อย*	น้อย*	0.28*	0.86**	0.57*
mannitol 9.60% + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019%	น้อย	น้อย	น้อย*	น้อย*	น้อย*	น้อย*	0.80*	1.38**	1.06*
mannitol 9.70% + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019%	น้อย	น้อย	น้อย*	น้อย*	น้อย*	0.36*	0.95*	1.75**	1.61*
mannitol 9.75% + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019%	น้อย	น้อย	น้อย*	น้อย*	น้อย*	0.29*	0.89*	1.48**	1.65*
mannitol 9.80% + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019%	น้อย	น้อย	น้อย*	น้อย*	น้อย*	น้อย*	0.62*	1.30**	1.71*

หมายเหตุ : + หมายถึงโปรโตพลาสต์แตก

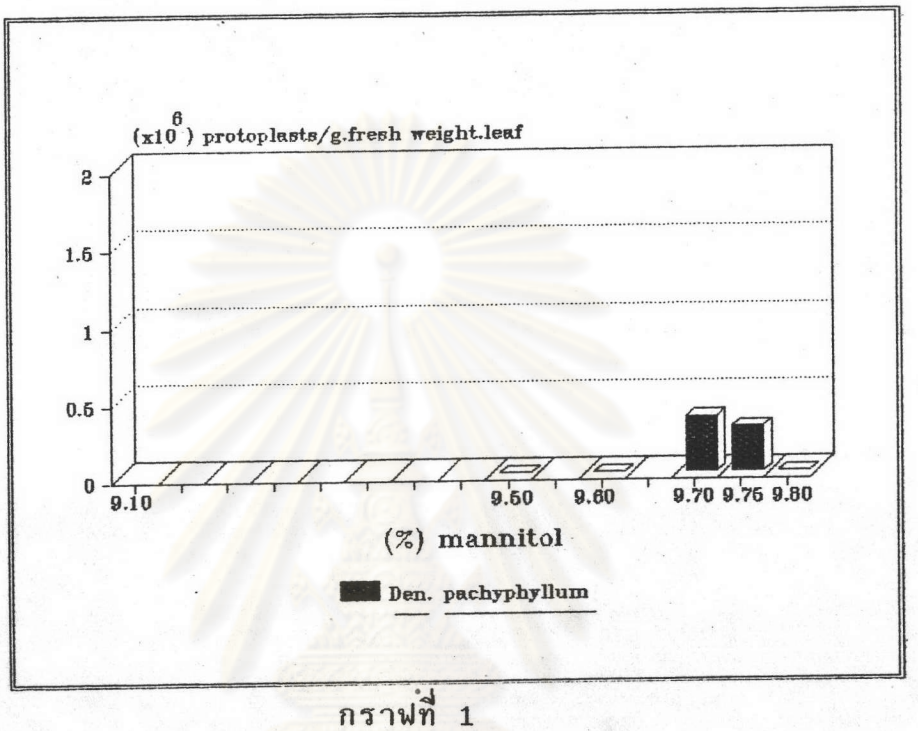
น้อย หมายถึงจำนวนโปรโตพลาสต์ < $0.13x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด

* หมายถึง มีผลิกรูปเข็ม

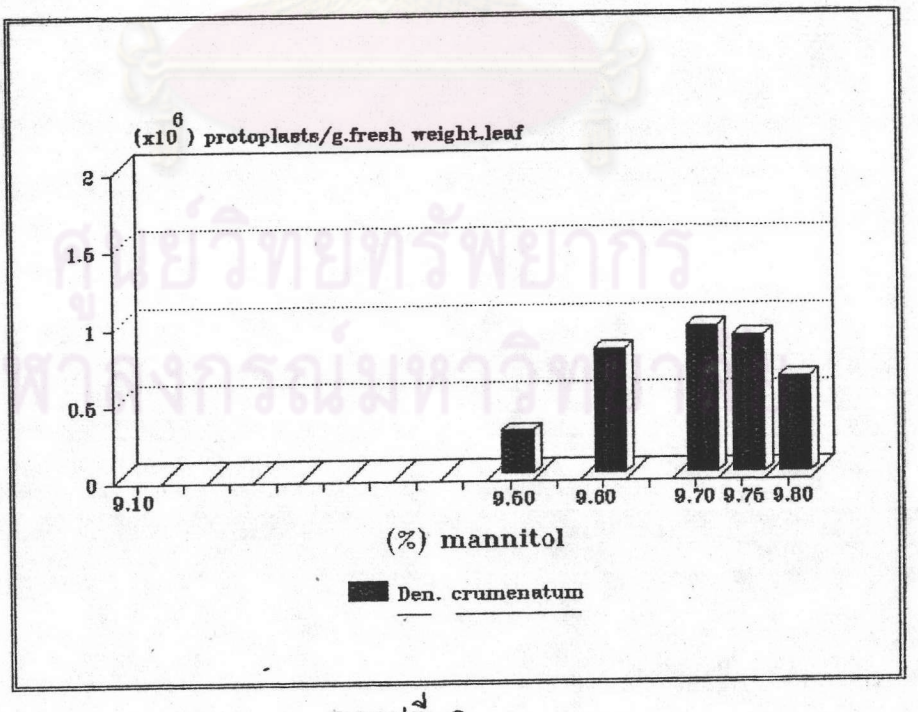
** หมายถึงมีผลิกรูปเข็มจำนวนมาก

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์เมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสต่างกัน พบว่าการใช้ glucose ความเข้มข้น 9.01% เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์แตกทั้งหมด เมื่อเปลี่ยนมาใช้ mannitol เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 9.1%, 9.5%, 9.7%, 9.75% และ 9.8% ร่วมกับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.019% ตามลำดับ mannitol ความเข้มข้น 9.1% โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์แตกทั้งหมด mannitol ความเข้มข้น 9.5 % แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Den. x Jaquelyn Thomas, Den. pachyphyllum ได้บ้าง และแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid เป็น 0.28×10^6, 0.86×10^6 และ 0.57×10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด แต่โปรโตพลาสต์ยังแตกอยู่มาก mannitol ความเข้มข้น 9.6% แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและใบของ C. dowiana, Den. x Jaquelyn Thomas และ Den. pachyphyllum ได้เล็กน้อย และแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เป็น 0.80×10^6, 1.38×10^6 และ 1.06×10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด mannitol ความเข้มข้น 9.7% และ 9.75% แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและใบของ C. dowiana และจากแคลลัสของ Den. x Jaquelyn Thomas, Den. pachyphyllum และจากใบของ Den. x Jaquelyn Thomas ได้จำนวนเล็กน้อย ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบของ Den. pachyphyllum, Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid เมื่อความเข้มข้น mannitol 9.7% ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ 0.36×10^6, 0.95×10^6, 1.75×10^6 และ 1.61×10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อความเข้มข้น mannitol 9.75% ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ 0.29×10^6, 0.89×10^6, 1.48×10^6 และ 1.65×10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และ mannitol ความเข้มข้น 9.8 % แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและใบของ C. dowiana, Den. x Jaquelyn Thomas, Den. pachyphyllum ได้เล็กน้อย และแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Den. crumenatum, Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เป็น 0.62×10^6, 1.3×10^6 และ 1.71×10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด (กราฟที่ 1-4)

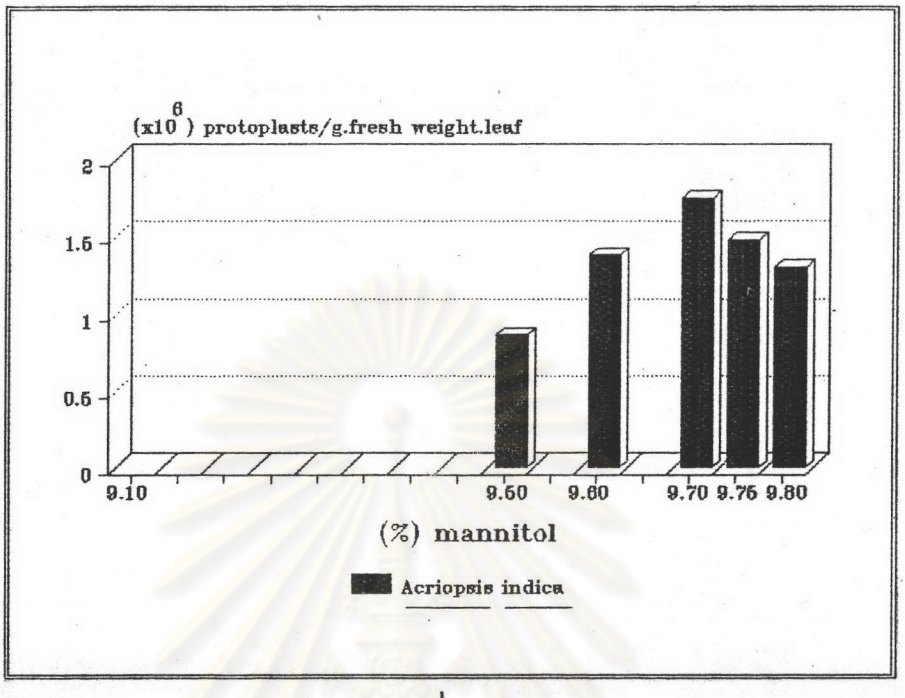
กราฟที่ 1-4 ความเข้มข้นของ mannitol ที่ใช้ในการรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสและจำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด ของกล้วยไม้ 4 พันธุ์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/แต่ละพันธุ์และความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ออสโมซิส)



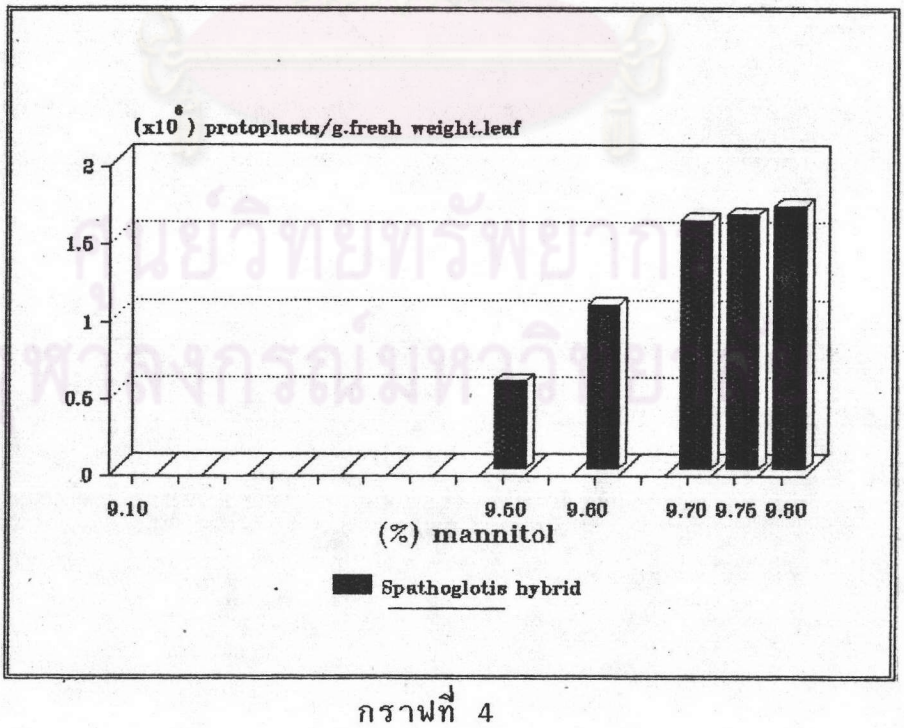
กราฟที่ 1



กราฟที่ 2



กราฟที่ 3



กราฟที่ 4

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิและช่วงระยะเวลาในการบ่มที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์
(เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/แต่ละอุณหภูมิและช่วงเวลา)

อุณหภูมิ	ช่วงระยะเวลา (ชม.)	($x10^6$) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด	
		Acriopsis indica ใบ	Spathoglotis hybrid ใบ
30-32 °C	4	-	0.19
	6	1.45	1.88
	8	1.73	1.94
	10	0.20	0.59
	12	น้อย	น้อย
24-27 °C	4	-	-
	6	-	-
	8	-	-
	10	0.36	1.23
	12	1.40	1.31
	14	1.78	1.60
	16	1.26	0.78

หมายเหตุ : - หมายถึงแยกโปรโตพลาสต์ไม่ได้

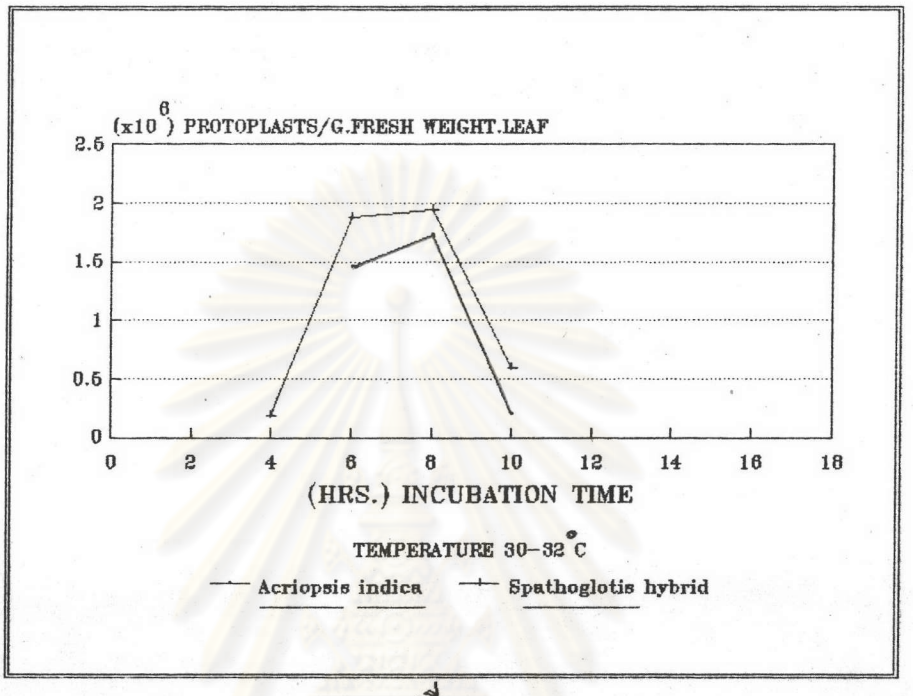
จากตารางที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ เมื่อใช้อุณหภูมิและช่วงระยะเวลาในการบ่มต่างกัน พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 30-32 °C เวลา 4 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Spathoglotis hybrid ได้จำนวน $0.19x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด แต่เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.45x10^6$ และ $1.88x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อเวลา 8 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้นคือ $1.73x10^6$ และ

I10306444

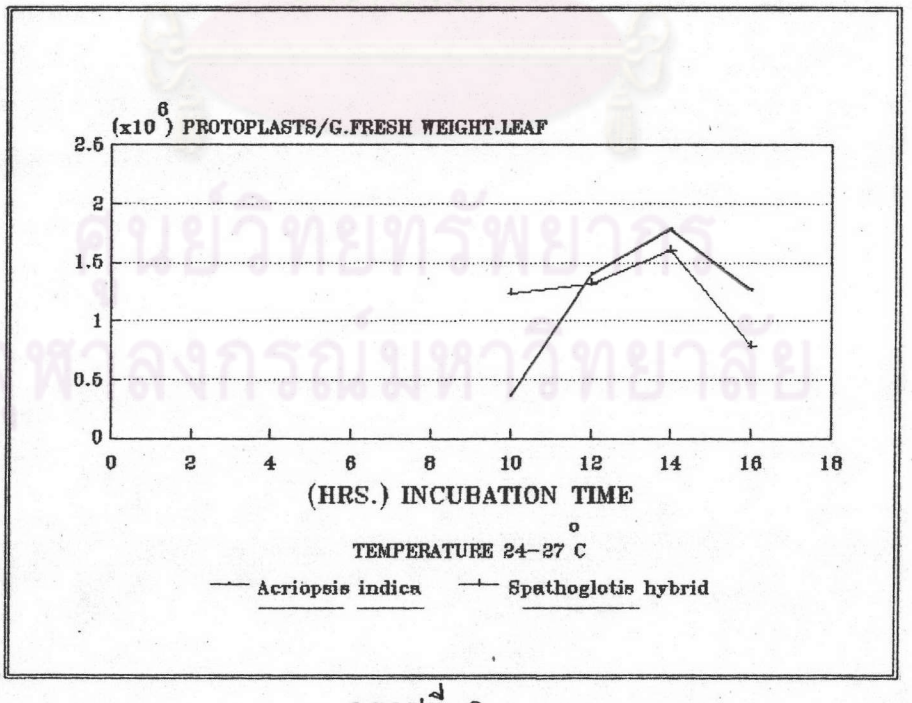
$1.94x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้เป็น $0.2x10^6$ และ $0.59x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชม.แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ได้จำนวนน้อย เมื่อใช้อุณหภูมิ 24-27 °C เวลา 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวน 0.36×10^6 และ $1.23x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเวลา 12 ชั่วโมงแยกโปรโตพลาสต์จากกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ได้จำนวน $1.4x10^6$ และ $1.31x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเวลา 14 ชั่วโมง แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวน $1.78x10^6$ และ $1.60x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเวลา 16 ชั่วโมงแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวน $1.26x10^6$ และ $0.78x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด (กราฟที่ 5-6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 5-6 อุณหภูมิและช่วงระยะเวลาในการบ่มโปรโตพลาสต์ และจำนวนโปร-โตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด ของกล้วยไม้ 2 พันธุ์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/แต่ละอุณหภูมิและช่วงเวลา)



กราฟที่ 5



กราฟที่ 6

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มแสงระหว่างการบ่มที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/ความเข้มแสง 0 และ 1,200 ลักส์)

ความเข้มแสง	(x10^6) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด	
	Acriopsis indica ใบ	Spathoglotis hybrid ใบ
0 ลักส์	1.51	1.31
1,200 ลักส์	0.98	1.01

จากตารางที่ 7 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ เมื่อใช้ความเข้มแสงระหว่างการบ่มต่างกัน พบว่าความเข้มแสง 0 ลักส์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนมากคือ $1.51x10^6$ และ $1.31x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด ส่วนที่ความเข้มแสง 1,200 ลักส์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ได้เป็น $0.98x10^6$ และ $1.01x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด

ตารางที่ 8 ผลของการใช้ผ้ากรอง ขนาดผ้ากรอง 20, 30 และ 40 ไมครอน ที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/ขนาดผ้ากรอง 20, 30 และ 40 ไมครอน)

ขนาดผ้ากรอง	(x10^6) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด	
	Acriopsis indica ใบ	Spathoglotis hybrid ใบ
20 ไมครอน	0.56	0.53
30 ไมครอน	1.28	1.25
40 ไมครอน	1.49	1.57

จากตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ เมื่อใช้ขนาดผ้ากรองต่างกัน พบว่าเมื่อใช้ผ้ากรองขนาด 20 ไมครอน กรองโปรโตพลาสต์ ได้จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid เป็น $0.56x10^6$ และ $0.53x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และใช้ผ้ากรองขนาด 30 ไมครอน ได้โปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์มากขึ้น คือ $1.28x10^6$ และ $1.25x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และใช้ผ้ากรองขนาด 40 ไมครอน ได้โปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์มากที่สุด คือ $1.49x10^6$ และ $1.57x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด

หลังจากกรองโปรโตพลาสต์ด้วยผ้ากรองแล้ว จึงนำโปรโตพลาสต์มาล้างเอนไซม์ออกโดยการ centrifuge ประมาณ 3-4 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ (washing solution) ซึ่งส่วนประกอบที่สำคัญคือน้ำกลั่น mannitol และ $CaCl_2$ ที่ช่วยรักษาดุลยภาพของโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ 2) และในขั้นตอนการล้างโปรโตพลาสต์ ด้วยสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ พบว่าการใช้สารละลาย Percoll ช่วยให้โปรโตพลาสต์สะอาดขึ้น และไม่มีผลเสียต่อการอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ (Gamborg และคณะ, 1983) โดย Percoll ทำให้สารละลายแยกชั้น และโปรโตพลาสต์แขวนลอยอยู่ด้านบน ส่วนเศษของเซลล์ตกอยู่ในชั้นของ Percoll ซึ่งอยู่ด้านล่าง

ตารางที่ 9 ผลของ centrifugation ที่มีต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/centrifugation ที่ 227 g (1,000 รอบ/นาที) และ 159-182 g (700-800 รอบ/นาที))

centrifugation	($x10^6$) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด	
	Acriopsis indica ใบ	Spathoglotis hybrid ใบ
227 g	0.31	0.55
159-182 g	1.44	1.34

จากตารางที่ 9 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ เมื่อใช้ centrifugation ต่างกัน เมื่อ centrifugation ที่ 227 g แยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวน 0.31x 10^6 และ 0.55x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อ centrifugation ต่ำลงเป็น 159-182 g แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ได้มากขึ้นเป็น 1.44x10^6 และ 1.34x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด ตามลำดับ

2.2 ศึกษาสภาพแวดล้อมของกล้วยไม้ก่อนที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ โดยใช้ปริมาณใบ 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร

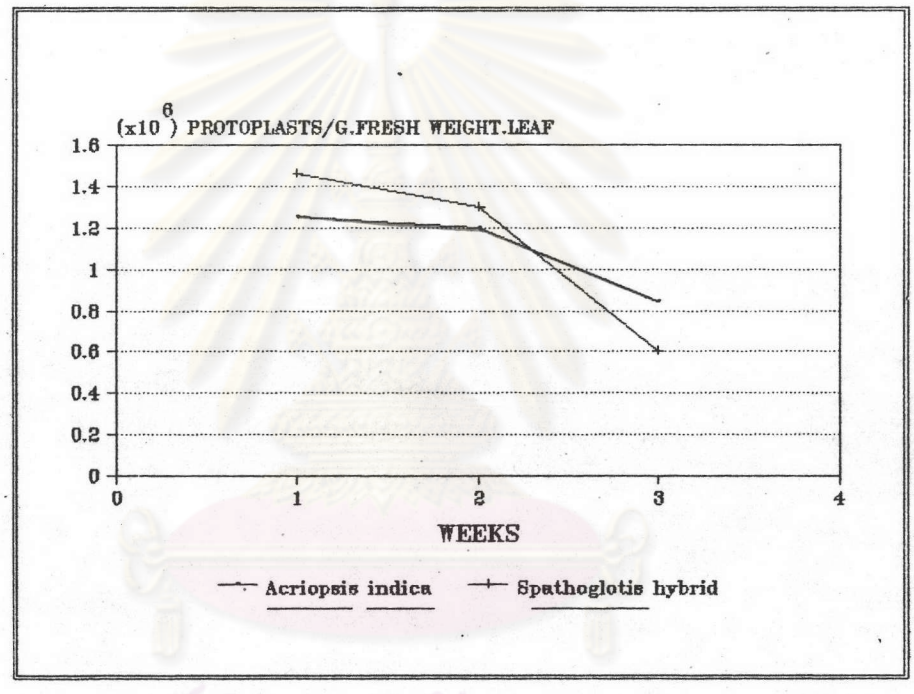
ตารางที่ 10 ผลของการเปลี่ยนอาหารของแคลลัสและต้นอ่อนกล้วยไม้ ทุก 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ความเข้มแสง 1,200 ลักส์ ที่มีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/การเปลี่ยนอาหารทุก 1, 2 และ 3 สัปดาห์)

การเปลี่ยนอาหาร	(x10^6) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด	
	Acriopsis indica ใบ	Spathoglotis hybrid ใบ
1 สัปดาห์	1.25	1.46
2 สัปดาห์	1.10	1.30
3 สัปดาห์	0.84	0.60

จากตารางที่ 10 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ เมื่อเปลี่ยนอาหารกล้วยไม้ทุก 1, 2 และ 3 สัปดาห์ก่อนที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าเมื่อเปลี่ยนอาหารบ่อยๆคือทุก 1 สัปดาห์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ได้จำนวนมากคือ 1.25x10^6 และ 1.46x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อเปลี่ยนอาหารกล้วยไม้ทุก 2 สัปดาห์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ เป็นจำนวน

$1.10x10^6$ และ $1.3x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อเปลี่ยนอาหารกล้วยไม้ทุก 3 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์มีจำนวนน้อยลงคือ $0.84x10^6$ และ $0.60x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด (กราฟที่ 7)

กราฟที่ 7 การเปลี่ยนอาหารทุก 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ความเข้มแสง 1,200 ลักส์ และจำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม น้ำหนักสด (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/การเปลี่ยนอาหารทุก 1, 2 และ 3 สัปดาห์)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

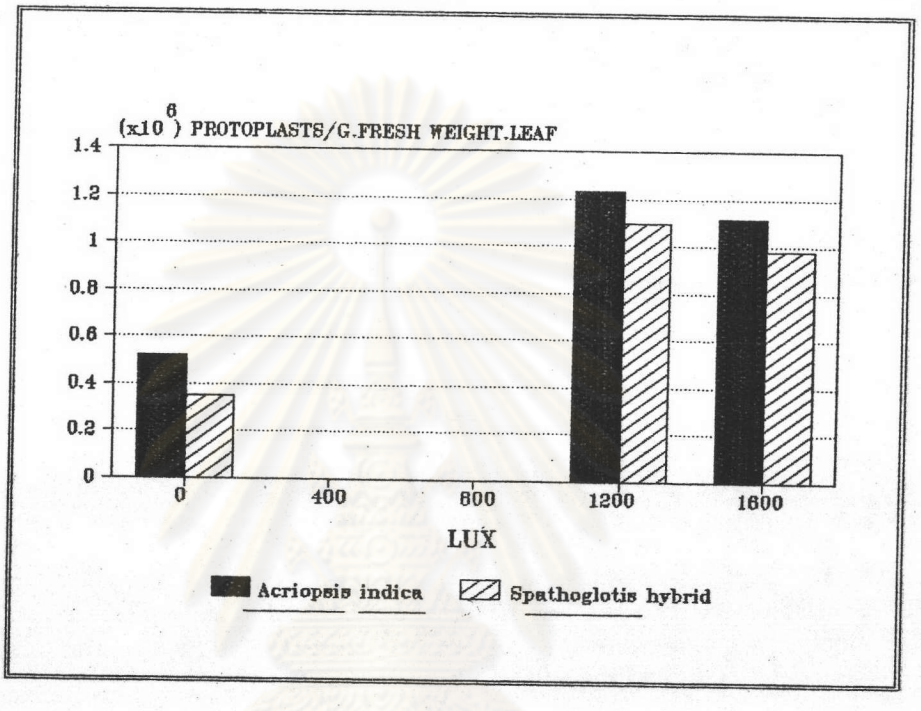
ตารางที่ 11 ผลของความเข้มแสงที่ให้กับกล้วยไม้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารทุก 1 สัปดาห์ (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/ความเข้มแสง 0, 1,200 และ 1,600 ลักส์)

ความเข้มแสง	($x10^6$) จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด	
	Acriopsis indica ใบ	Spathoglotis hybrid ใบ
0 ลักส์	0.52	0.35
1,200 ลักส์	1.23	1.10
1,600 ลักส์	1.12	0.98

จากตารางที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ เมื่อใช้ความเข้มแสงที่ให้กับกล้วยไม้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ เป็น 0, 1,200 และ 1,600 ลักส์ พบว่าเมื่อกล้วยไม้ได้รับแสง 0 ลักส์ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวน $0.52x10^6$ และ $0.35x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และความเข้มแสง 1,200 ลักส์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ได้เป็น $1.23x10^6$ และ $1.10x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด และเมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 1,600 ลักส์ พบว่าแยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ได้จำนวน $1.12x10^6$ และ $0.98x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัม.น้ำหนักสด (กราฟที่ 8)

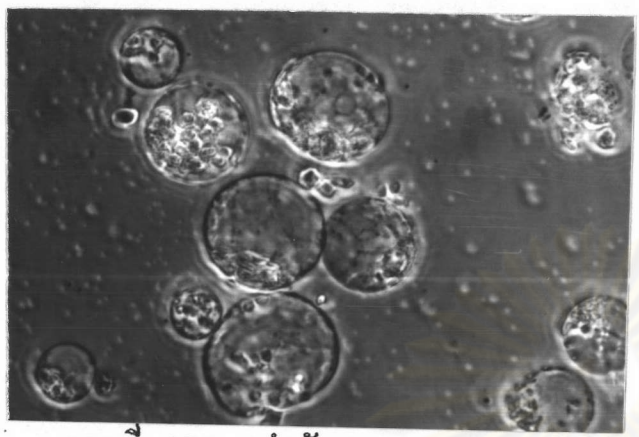
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 8 ความเข้มแสง 0, 1,200 และ 1,600 ลักส์ ที่ให้กับกล้วยไม้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ และจำนวนโปรโตพลาสต์/กรัม น้ำหนักสด (เฉลี่ยจากการทดลอง 6 ซ้ำ/ความเข้มแสง 0, 1,200 และ 1,600 ลักส์)

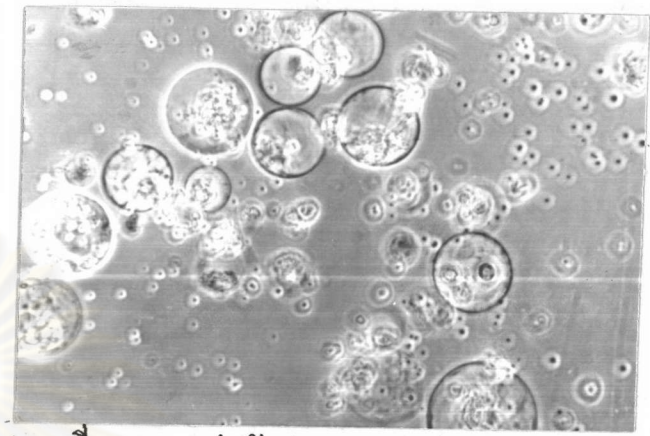


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

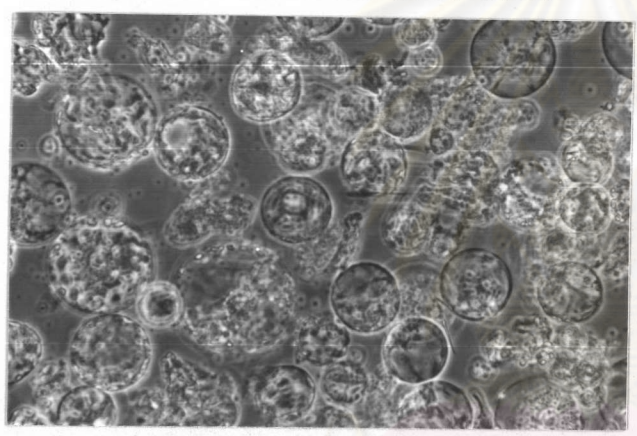
ภาพที่ 19-24 แสดงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ 6 ชนิดที่แยกได้ หลังจากล้างเอาเอนไซม์ออกแล้ว



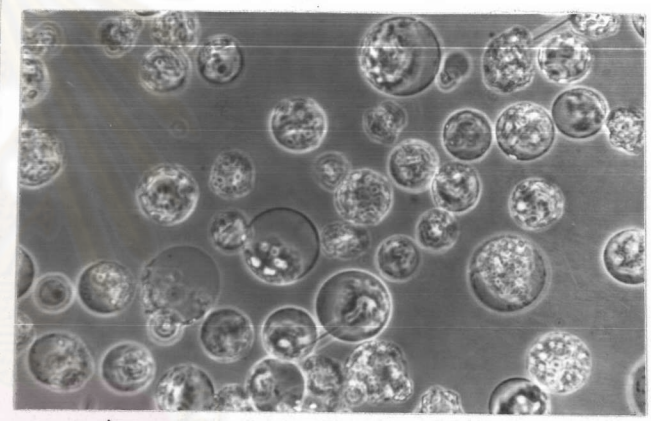
ภาพที่ 19ก (กำลังขยาย x 300)



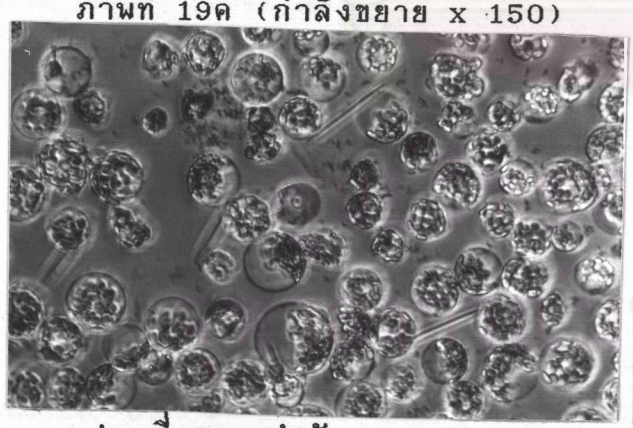
ภาพที่ 19ข (กำลังขยาย x 300)



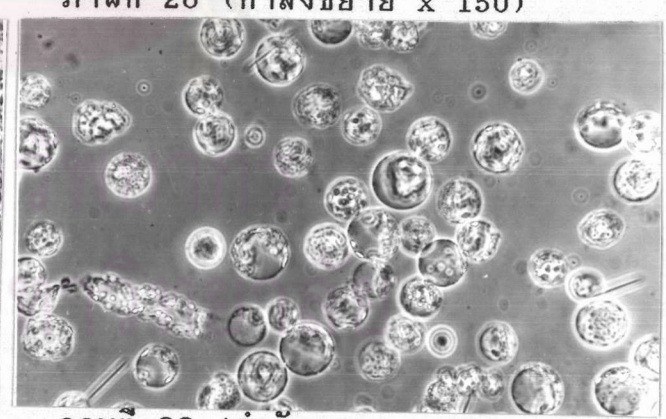
ภาพที่ 19ค (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 20 (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 21 (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 22 (กำลังขยาย x150)

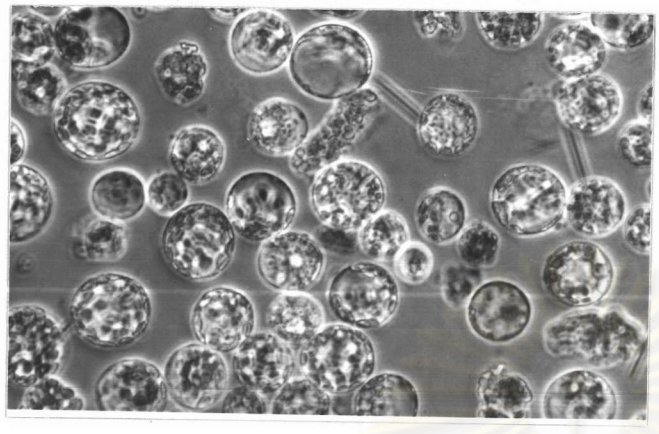
ภาพที่ 19 ก-ค โปรโตพลาสต์ของ Cattleya dowiana

ภาพที่ 20 โปรโตพลาสต์ของ Dendrobium x Jaquelyn Thomas

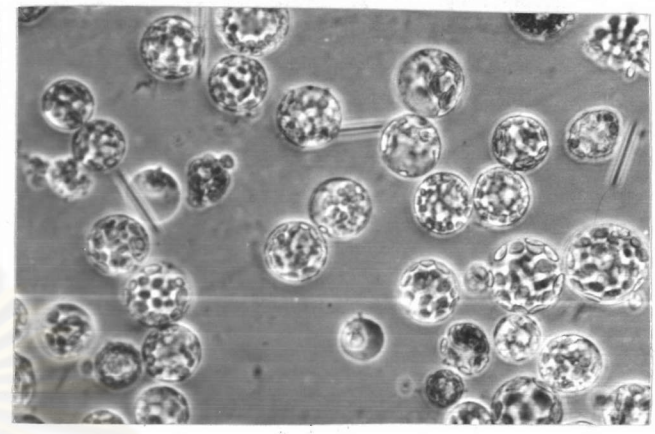
ภาพที่ 21 โปรโตพลาสต์ของ Dendrobium pachyphyllum

ภาพที่ 22 โปรโตพลาสต์ของ Dendrobium crumenatum

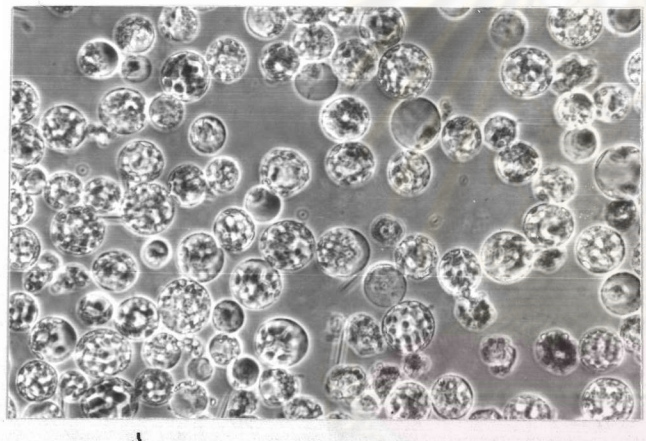
ภาพที่ 23 ก-ฉ โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica



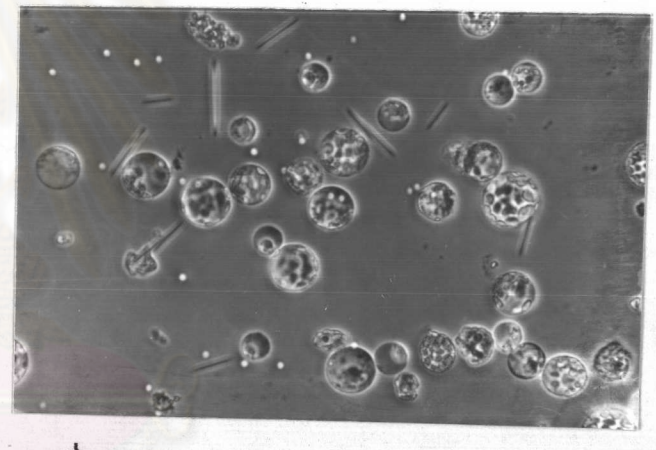
ภาพที่ 23ก (กำลังขยาย x 238)



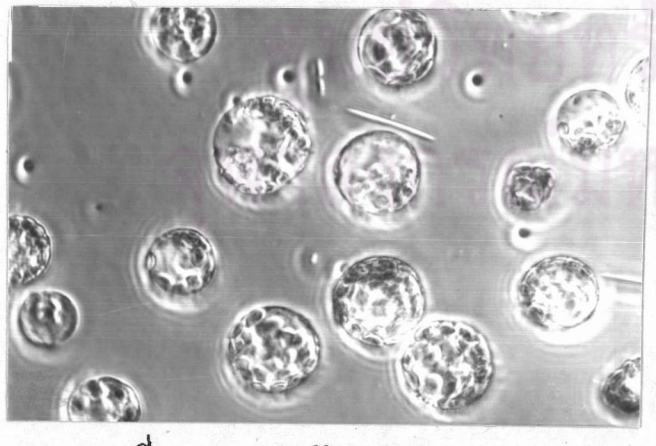
ภาพที่ 23ข (กำลังขยาย x 238)



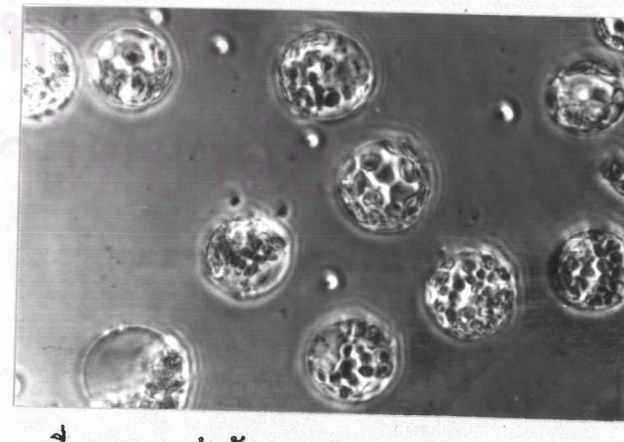
ภาพที่ 23ค (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 23ง (กำลังขยาย x 150)

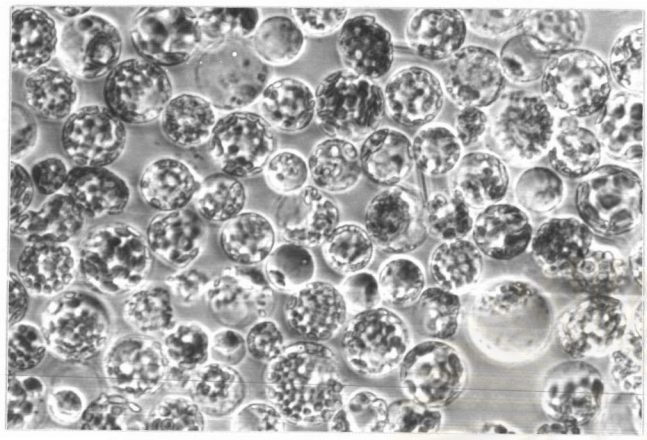


ภาพที่ 23จ (กำลังขยาย x 300)

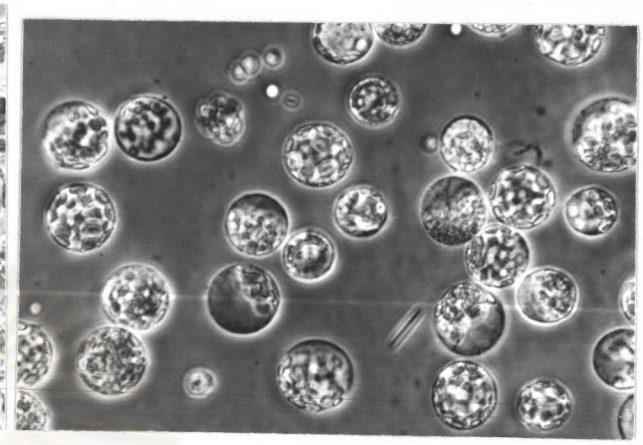


ภาพที่ 23ฉ (กำลังขยาย x300)

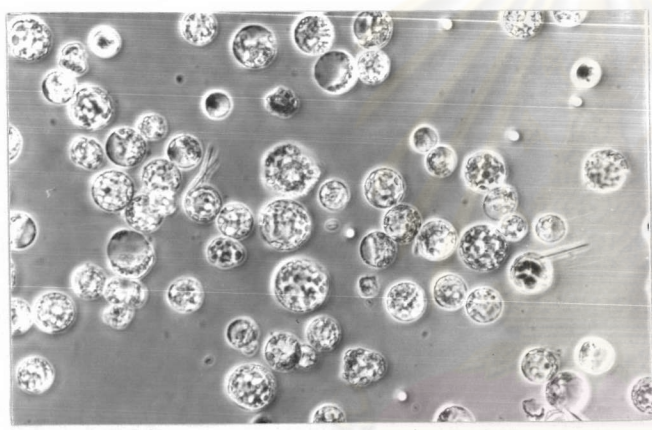
ภาพที่ 24 ก-ฉ โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid



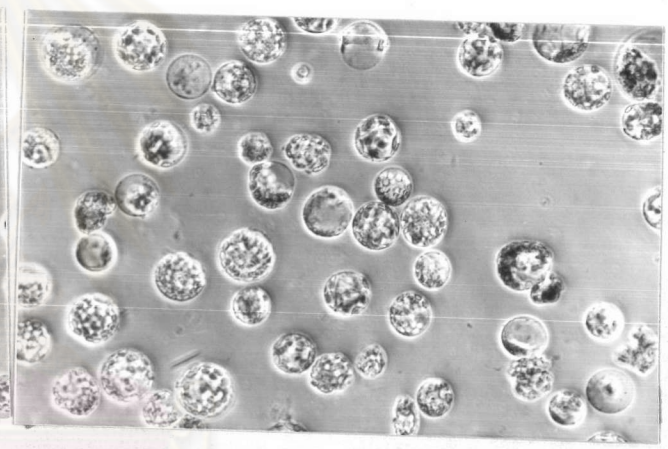
ภาพที่ 24ก (กำลังขยาย x 238)



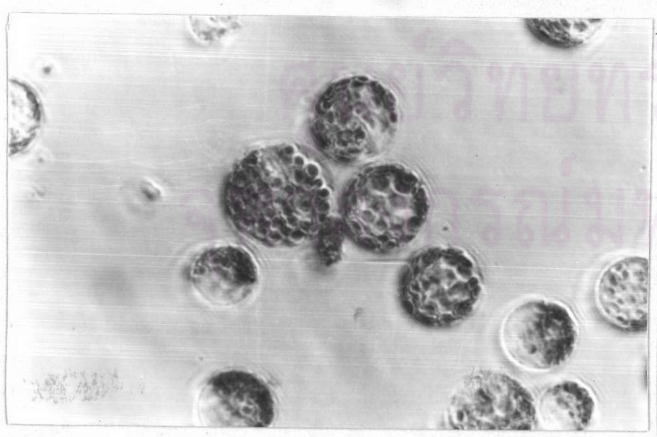
ภาพที่ 24ข (กำลังขยาย x 238)



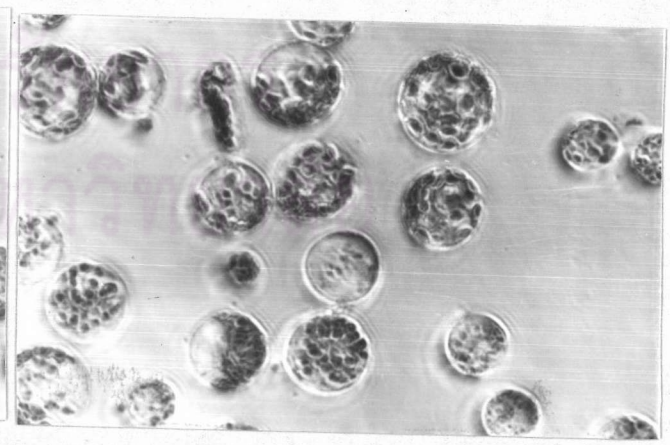
ภาพที่ 24ค (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 24ง (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 24จ (กำลังขยาย x 300)



ภาพที่ 24ฉ (กำลังขยาย x300)

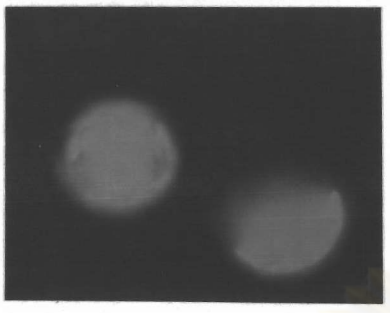
การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้บางพันธุ์ ได้ศึกษาถึงผลของอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการอยู่รอดและการเจริญของโปรโตพลาสต์ โดยควบคุมปัจจัยที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงโปรโตพลาสต์เช่น ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่ออาหารที่ใช้เลี้ยง และความเข้มแสงระหว่างการเลี้ยง โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ที่ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร และการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ระยะแรก เลี้ยงในที่ความเข้มแสงน้อยประมาณ 100 ลักส์ หลังจากโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์แล้วจึงเพิ่มความเข้มแสงเป็น 1,200 ลักส์

3. ผลของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

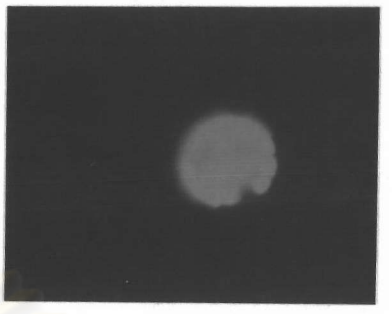
เมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid ในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 1 วัน โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่

ทดสอบการมีผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ Spathoglotis hybrid ด้วยการย้อมสีโปรโตพลาสต์ด้วย Calcofluor White แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence โดยแบ่งการทดสอบเป็น 4 ระยะ คือ หลังจากแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ (ภาพที่ 25) หลังจากเลี้ยงในอาหาร 5 ชั่วโมง (ภาพที่ 26) หลังจากเลี้ยงในอาหาร 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 27) หลังจากเลี้ยงในอาหาร 25 ชั่วโมง (ภาพที่ 28)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 25 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากแยกด้วยเอนไซม์ ย้อมด้วย Calcofluor White (กำลังขยาย x 340)



ภาพที่ 26 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงในอาหาร 5 ชั่วโมง ย้อมด้วย Calcofluor White (กำลังขยาย x 340)

ภาพที่ 27 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงในอาหาร 24 ชั่วโมง ย้อมด้วย Calcofluor White (กำลังขยาย x 340)

ภาพที่ 28 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงในอาหาร 25 ชั่วโมง ย้อมด้วย Calcofluor White (กำลังขยาย x 340)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการใช้สูตรต่างๆเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ (จากตารางที่ 3)

B_5 (1985) เป็นสูตรดัดแปลงสำหรับ เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ ยาสูบ ส่วนประกอบที่สำคัญคือคาร์โบไฮเดรตซึ่งใช้เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส โดยใช้ในรูปของซูโครส 250 มิลลิกรัม/ลิตร และ กลูโคส 72,100 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid แตกทั้งหมด

B_5-1 องค์ประกอบของอาหารอื่นๆคือธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก-น้อย สารอินทรีย์ วิตามิน และสารควบคุมการเจริญ เหมือน B_5 (1985) ยกเว้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลเป็นซูโครส 267 มิลลิกรัม/ลิตร และกลูโคส 76,854 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อให้สารละลายของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีค่าออสโมติกโพเทนเชียลต่ำลง ทำให้ป้องกันการแตกของโปรโตพลาสต์ พบว่าโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ และโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica บางส่วนสามารถอยู่รอดได้นาน 3-5 วัน โดยมีลักษณะโปรโตพลาสต์เป็นรูปทรงกลม ไม่พบการแบ่งเซลล์ (ภาพที่ 29) ส่วนโปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid เมื่อเลี้ยงในอาหาร 2 วันโปรโตพลาสต์ตายหมด

B_5-2 องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน B_5 (1985) และน้ำตาลเหมือน B_5-1 ยกเว้นสารควบคุมการเจริญโดยเปลี่ยนเป็น NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 5% เพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์แบ่งตัว พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ภาพที่ 30-31) สันนิษฐานว่าเกิดการแบ่งไซโตพลาสซึมจากเซลล์เดิมโดยการคอดของไซโตพลาสซึม เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ 3-4 เซลล์ แต่หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ตาย

B_5-3 องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน B_5 (1985) ยกเว้นเปลี่ยนน้ำตาลเป็น ซูโครส 150 มิลลิกรัม/ลิตร กลูโคส 36,000 มิลลิกรัม/ลิตร ribose 125 มิลลิกรัม/ลิตร และ mannitol 27,330 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเปลี่ยนน้ำตาลตาม Durand และคณะ (1973) และ Kao (1977) (อ้างถึงใน Gamborg และคณะ,1981) เพื่อให้โปรโตพลาสต์อยู่รอดได้นานขึ้น พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spatho-

glotis hybrid สร้างผนังเซลล์ เมื่อเลี้ยงได้ 3 วันมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ภาพที่ 32-33) สันนิษฐานว่าโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica เกิดการแบ่งไซโตพลาสซึม เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ 2-3 เซลล์ แต่โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ยังเป็นทรงกลมอยู่ สามารถเลี้ยงให้รอดได้นาน 4-5 วัน อัตราการอยู่รอดต่ำประมาณ 5% ส่วนโปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid เกิดแตกหน่อและโปรโตพลาสต์มีชีวิตอยู่ได้ 3-4 วัน

SH เปลี่ยนสูตรอาหารจาก B_5 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ตาม Schenk & Hildebrandt(1972) โดยเพิ่มน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสคือ mannitol 72,880 มิลลิกรัม/ลิตร และ ribose 125 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อให้โปรโตพลาสต์อยู่รอดได้นานและแบ่งตัว พบว่าหลังจากเลี้ยง 24 ชั่วโมงโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ เมื่อเลี้ยงได้ 3 วันโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ตาย ไม่พบการแบ่งเซลล์

SH-1 ดัดแปลงสูตรอาหารของ Schenk & Hildebrandt (1972) โดยเพิ่มธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก คือ $CaCl_2.2H_2O$ เป็น 800 มิลลิกรัม/ลิตร ตาม Kao และคณะ (1973) ซึ่งพบว่าปริมาณ $CaCl_2$ สูง 5.3 mM (583 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลทำให้การแบ่งเซลล์ของ Vicia hajastana สูงขึ้น และใช้น้ำตาลตาม SH เพื่อให้โปรโตพลาสต์แบ่งตัว พบว่าอาหารที่ได้ตกตะกอน

SH-2 ดัดแปลงสูตรอาหารของ Schenk & Hildebrandt (1972) ตามถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) โดยลดธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากลงครึ่งหนึ่ง ยกเว้น $CaCl_2.2H_2O$ ยังคงใช้ 800 มิลลิกรัม/ลิตร เปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเป็น NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 5% เพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์แบ่งตัว พบว่าอาหารที่ได้ตกตะกอน

SH-3 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-1 แต่ลด $NH_4.H_2PO_4$ ลง 1/4 เพื่อไม่ให้อาหารตกตะกอน และลด NH_4^+ ตาม Kao และคณะ (1973) และ Okamura และคณะ (1983) ซึ่งยืนยันว่า NH_4^+ เป็นตัวยับยั้งการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ โปรโต-

พลาสต์มีชีวิตรอดอยู่ได้ 3-5 วัน และเมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้ 3 วันส่วนใหญ่โปรโตพลาสต์มีการเปลี่ยนแปลง สันนิษฐานว่าเกิดการแบ่งไซโตพลาสซึมและเกิดแตกหน่อเป็นกลุ่มเซลล์ 2-4 เซลล์ แต่ส่วนใหญ่เป็น 2 เซลล์ (ภาพที่ 34-35)

SH-4 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-2 แต่ลด $NH_4.H_2PO_4$ ลง 1/4 เพื่อไม่ให้อาหารตกตะกอน พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมงโปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid มีการสร้างผนังเซลล์ และเมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์บางส่วนสันนิษฐานว่าเกิดการแบ่งไซโตพลาสซึม เป็นกลุ่มเซลล์ 2-3 เซลล์ แต่อัตราการอยู่รอดต่ำประมาณ 5% (ภาพที่ 36) หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ตาย

SH-5 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-4 ยกเว้นน้ำมะพร้าวเพิ่มเป็น 10% และ mannitol เปลี่ยนเป็นความเข้มข้น 80,000 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อป้องกันการแตกของโปรโตพลาสต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ สามารถเลี้ยงมีชีวิตรอดได้ 7-10 วัน อัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นประมาณ 10% และภายใน 7 วัน หลังจากเลี้ยงเกิดกลุ่มเซลล์ 2-6 เซลล์ ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดการแบ่งไซโตพลาสซึมและแตกหน่อ (ภาพที่ 37ก-37ข)

SH-6 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-5 ยกเว้น mannitol เปลี่ยนเป็นความเข้มข้น 81,000 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อป้องกันการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ บางส่วนมีชีวิตรอดได้นานถึง 2 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์บางส่วนสันนิษฐานว่ามีการแบ่งไซโตพลาสซึมเป็นกลุ่มเซลล์ 2-4 เซลล์ อัตราการอยู่รอด 15% (ภาพที่ 38ก-38ข)

SH-7 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-6 ยกเว้นสารควบคุมการเจริญเปลี่ยนเป็น NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร 2,4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลที่ใช้เป็น ซูโครส 150 มิลลิกรัม/ลิตร กลูโคส 150 มิลลิกรัม/ลิตร mannitol 54,660 มิลลิกรัม/ลิตร และ ribose 150 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อรักษาสมดุลย์ของออสโมซิสและชักนำให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์ พบว่าหลังจากเลี้ยง 2 วัน โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hy-

brid แตกทั้งหมด

SH-8 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-7 ยกเว้นน้ำตาลเปลี่ยนมาใช้ mannitol 82,000 มิลลิกรัม/ลิตร และ ribose 150 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อรักษาสมดุลย์ของออสโมซิส พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ สามารถเลี้ยงรอดได้ประมาณ 2 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์บางส่วนเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ภาพที่ 39ก-39ข) แต่หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์หยุดชะงักการเจริญ

SH-9 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-8 ยกเว้นสารควบคุมการเจริญใช้ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และ น้ำตาลเปลี่ยนมาใช้ mannitol 83,000 มิลลิกรัม/ลิตร และ ribose 150 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อรักษาสมดุลย์ของออสโมซิส พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ และเมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน โปรโตพลาสต์บางส่วนของ Acriopsis indica ประมาณ 1% เกิดการแบ่งเซลล์ ส่วนโปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid มีการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์ (ภาพที่ 40-41) สามารถเลี้ยงมีชีวิตอยู่รอดได้นานถึง 3 สัปดาห์ อัตราการอยู่รอด 20-30% แต่โปรโตพลาสต์ไม่แบ่งเซลล์เพิ่ม

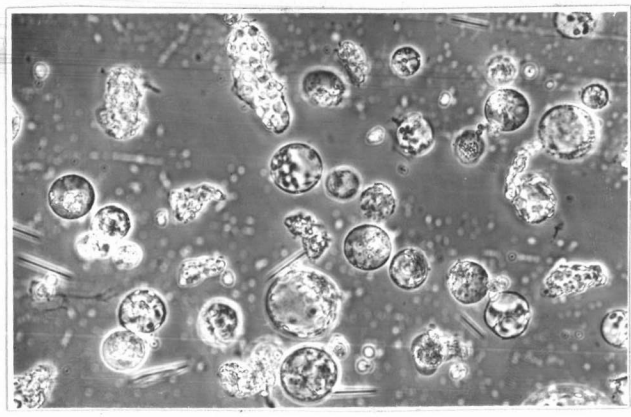
SH-10 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-9 ยกเว้นสารควบคุมการเจริญเปลี่ยนมาใช้ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งตัว พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมงโปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ และเมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ภาพที่ 41-42) แต่ส่วนใหญ่โปรโตพลาสต์ยังคงรูปร่างทรงกลมอยู่ สามารถเลี้ยงให้มีชีวิตได้นาน 1 เดือน อัตราการอยู่รอด 20%

SH-11 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-10 แต่เพิ่มสารอินทรีย์และวิตามินตาม B_5 (1985) สารควบคุมการเจริญใช้ NAA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และ 2,4-D 0:1 มิลลิกรัม/ลิตร และเพิ่มน้ำตาลกลูโคส 150 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อเสริมสารอาหารให้โปรโตพลาสต์ พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica สร้างผนังเซลล์ มีการ

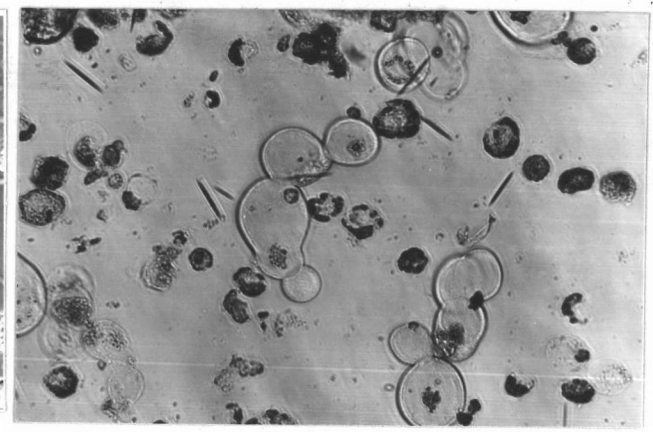
เปลี่ยนแปลงรูปร่าง สันนิษฐานว่ามีการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 เซลล์ (ภาพที่ 43) แต่การแบ่งเซลล์พบน้อยมากประมาณ 1.0% อัตราการอยู่รอด 30%

SH-12 ใช้องค์ประกอบของอาหารอื่นๆเหมือน SH-10 แต่ใช้น้ำมะพร้าว 10% แทนสารอินทรีย์และวิตามิน พบว่าหลังจากเลี้ยงประมาณ 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica และ Spathoglotis hybrid สร้างผนังเซลล์ เมื่อเลี้ยงได้ 3 วันเกิดการแบ่งเซลล์ (ภาพที่ 45-46) แต่การแบ่งเซลล์ยังพบน้อยมากประมาณ 1.0% หลังจากเลี้ยงต่อไปโปรโตพลาสต์ไม่แบ่งเซลล์เพิ่ม อัตราการอยู่รอดประมาณ 30% และระยะเวลาในการอยู่รอดประมาณ 3 สัปดาห์

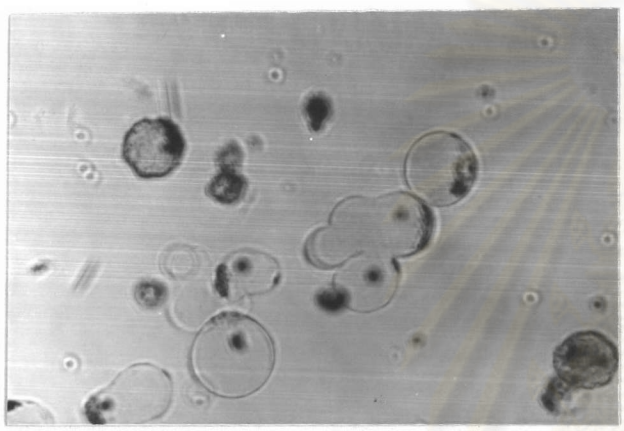
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



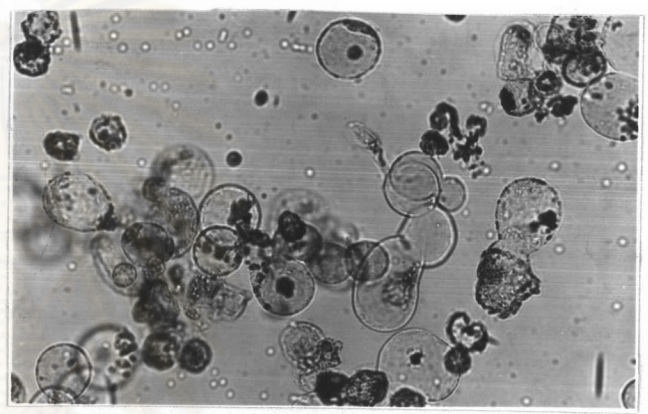
ภาพที่ 29 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร B_5-1 ประมาณ 2 วัน (กำลังขยาย x 150)



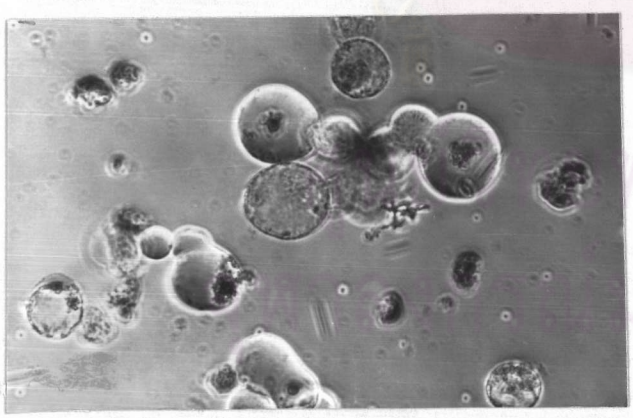
ภาพที่ 30 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร B_5-2 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)



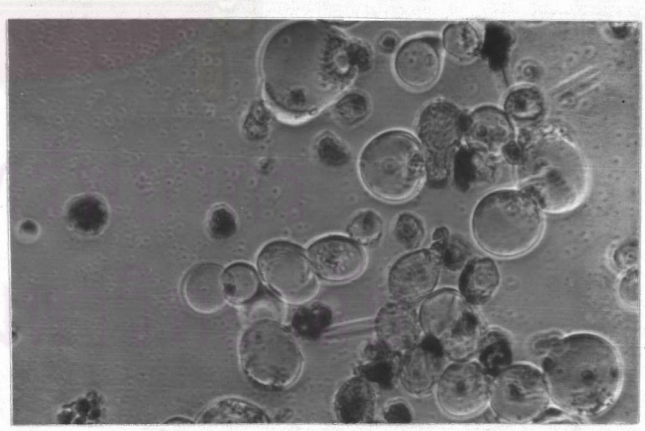
ภาพที่ 31 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงในอาหาร B_5-2 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 32 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร B_5-3 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)

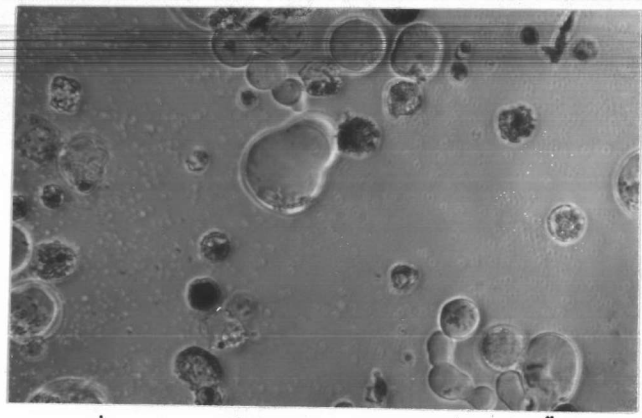


ภาพที่ 33 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงในอาหาร B_5-3 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)

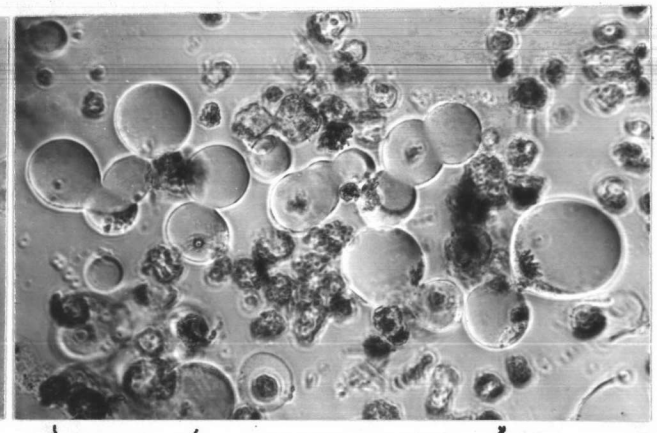


ภาพที่ 34 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร SH-3 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)

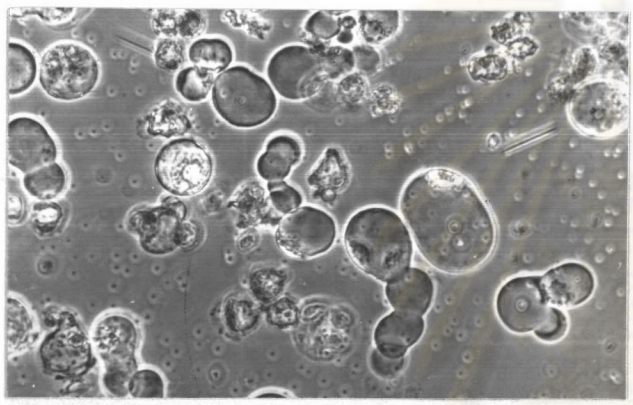
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



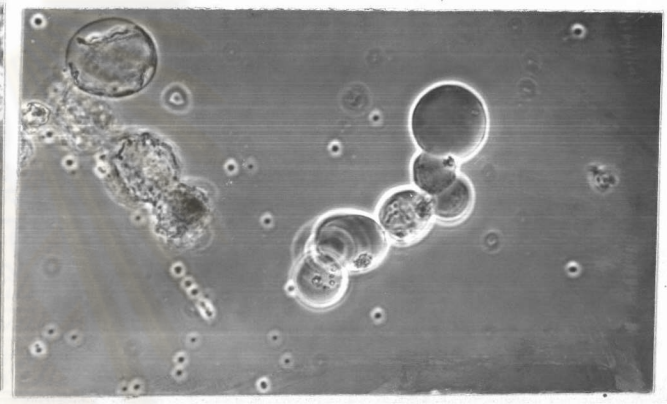
ภาพที่ 35 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน
อาหาร SH-3 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)



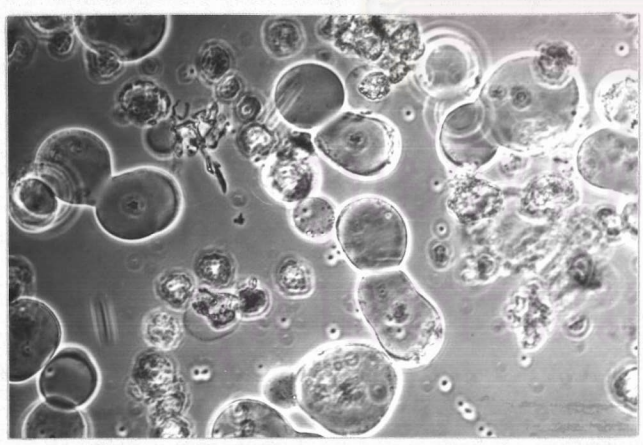
ภาพที่ 36 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน
อาหาร SH-4 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย X 150)



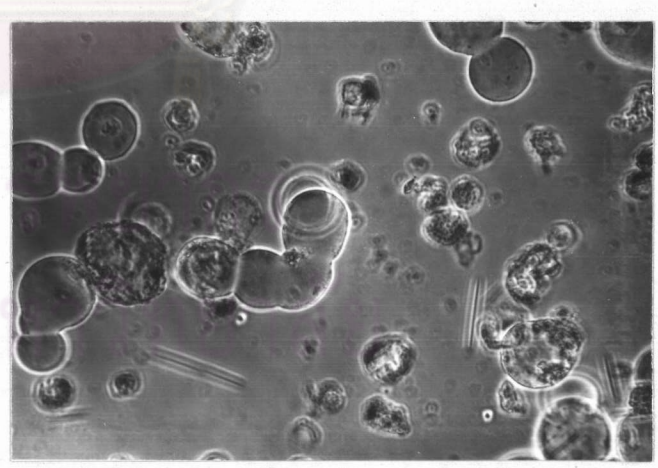
ภาพที่ 37ก โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน
อาหาร SH-5 ประมาณ 1 สัปดาห์ (กำลังขยาย x 150)



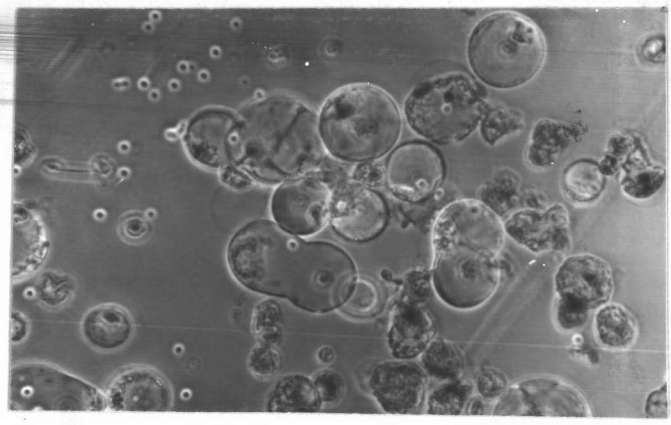
ภาพที่ 37ข โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน
อาหาร SH-5 ประมาณ 1 สัปดาห์ (กำลังขยาย X 150)



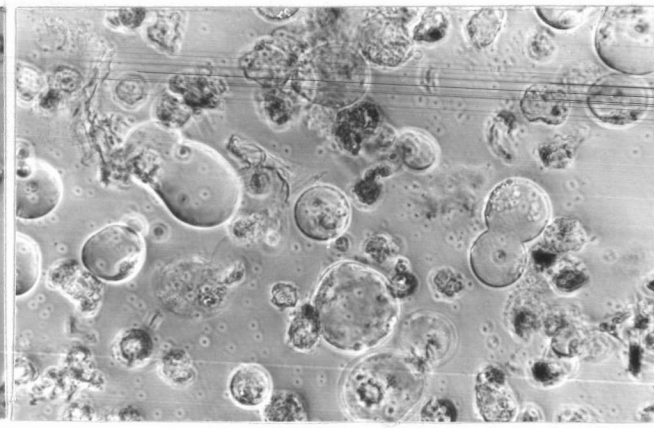
ภาพที่ 38ก โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน
อาหาร SH-6 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)



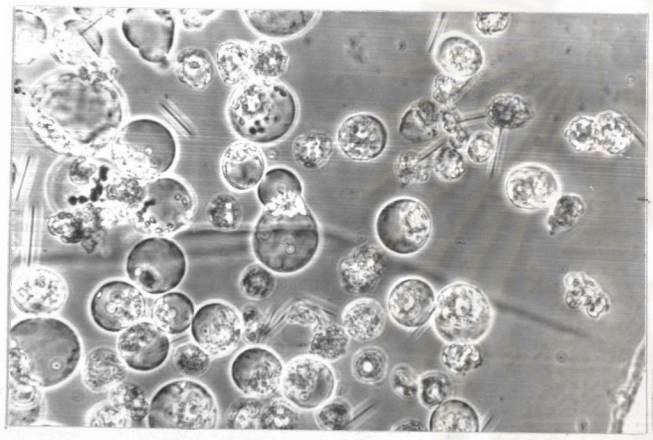
ภาพที่ 38ข โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน
อาหาร SH-6 ประมาณ 7 วัน (กำลังขยาย x 150)



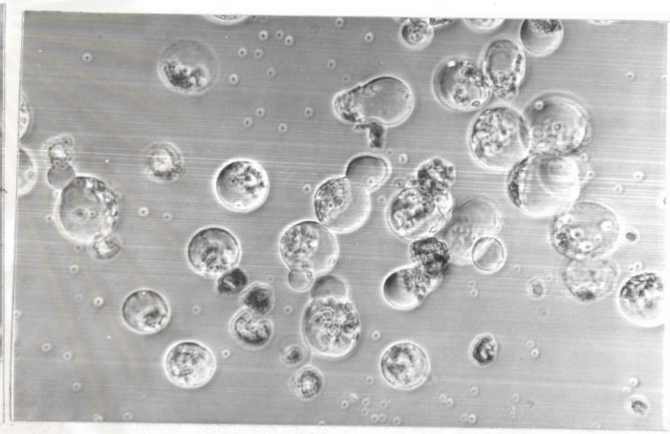
ภาพที่ 39ก โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน อาหาร SH-8 ประมาณ 10 วัน (กำลังขยาย x 150)



ภาพที่ 39ข โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน อาหาร SH-8 ประมาณ 10 วัน (กำลังขยาย X 150)

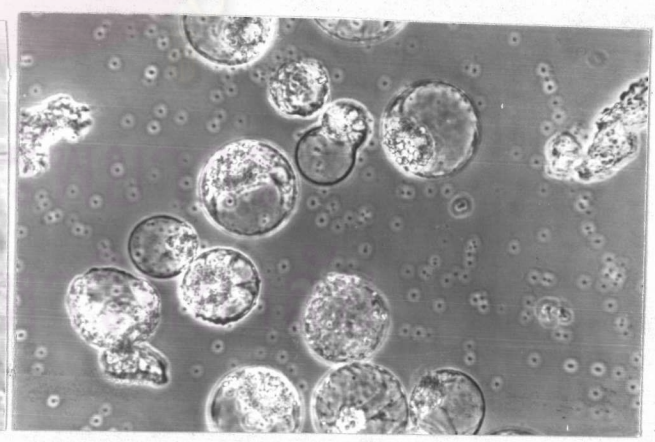


ภาพที่ 40 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร SH-9 ประมาณ 7 วัน (กำลังขยาย x 150)

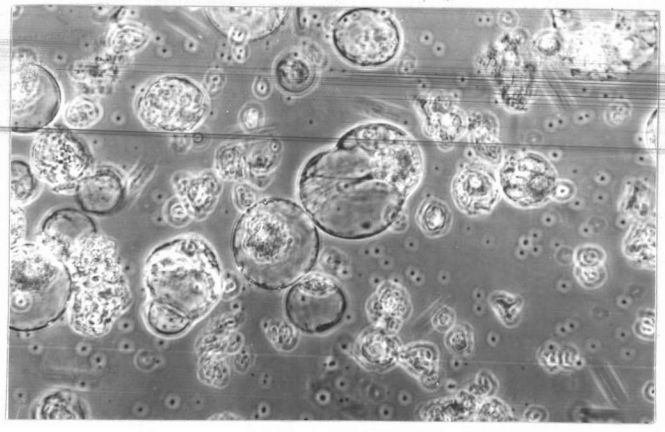


ภาพที่ 41 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน อาหาร SH-9 ประมาณ 7 วัน (กำลังขยาย X 150)

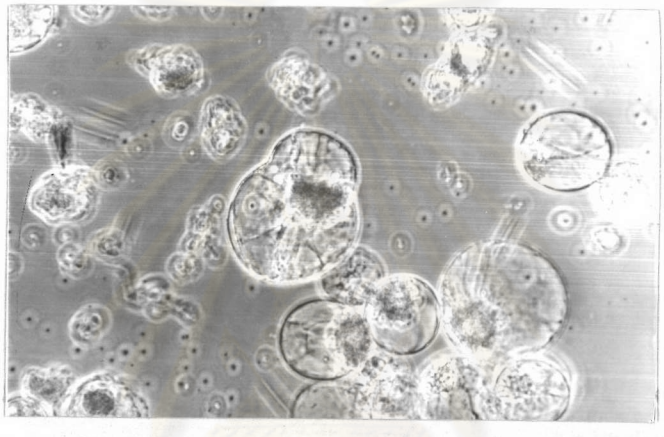
ภาพที่ 42 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร SH-10 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 300)



ภาพที่ 43 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงใน อาหาร SH-10 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย X 300)



ภาพที่ 44 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร SH-11 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 300)



ภาพที่ 45 โปรโตพลาสต์ของ Acriopsis indica หลังจากเลี้ยงในอาหาร SH-12 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 300)

ภาพที่ 46 โปรโตพลาสต์ของ Spathoglotis hybrid หลังจากเลี้ยงในอาหาร SH-12 ประมาณ 3 วัน (กำลังขยาย x 150)