การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้ช้างแดง

Protoplast Isolation and Culture of *Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik

วุฒิชัย ไข่มุกต์[1/] และ สมปอง เตชะโต[1/]
Wuttichai Kaimuk[1/] and Sompong Te-chato[1/]

Abstracts: In this experiment, isolation of protoplasts from leaves of in vitro-grown Chang Daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) was carried out using various types and concentrations of enzymes and osmoticum. The results showed that 2% (w/v) cellulase Onozuka R-10, 2% (w/v) macerozyme R-10 and 0.5% (w/v) driselase dissolved in 0.75 M mannitol, incubated under darkness for 6 hours gave the highest number of protoplasts (1.28 x 10^6/gram fresh weight) and viability (92-95%). Culture of the protoplasts at density of 5 x 10^5 protoplasts/ml in liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2, 4-D, 1 mg/l KN, 3% sucrose and 0.75 M mannitol promoted the highest survival rate. Only protoplasts anthocyanin containing underwent cell division and development. However, development of the protoplasts into callus and plantlet was not observed. Factors effecting protoplast regeneration will be further studied.

.

Keywords: *Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik, orchid, protoplast, anthocyanin, microcolony

---

[1/]ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

[1/]Department of plant science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

บทคัดย่อ: การศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดง (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) ในหลอดทดลอง โดยใช้เอนไซม์ต่างชนิดและต่างความเข้มข้น รวมถึง osmoticum ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่า เอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) เอนไซม์ Macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) และเอนไซม์ Driselase เข้มข้น0.5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) และปรับ osmoticum โดยใช้ Mannitol เข้มข้น 0.75 โมลาร์ โดยใช้ระยะเวลาในการแยก 6 ชั่วโมง ในที่มืดให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด ($1.28x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด) และความมีชีวิตสูงสุด (92-95 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดต่าง ๆ พบว่า 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ Mannitol 0.75 โมลาร์ ทำให้โปรโตพลาสต์มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุด โปรโตพลาสต์ที่มีแอนโธไซยานินเท่านั้นที่แบ่งเซลล์และพัฒนาได้ อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและพืชต้นใหม่ได้ จำเป็นต้องทำการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ: ช้างแดง *Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik โปรโตพลาสต์ แอนโธไซยานิน โคโลนีขนาดเล็ก

คำนำ

ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตกล้วยไม้ตามความต้องการของตลาด ปัญหาสำคัญของการผลิตกล้วยไม้คือขาดการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีความหลากหลายและสอดคล้องกับความต้องการของท้องตลาด การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตรงกับความต้องการของตลาดใช้วิธีการผสมข้ามพันธุ์ เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่จนเป็นที่ยอมรับ (อุทัย, 2548) แต่การสร้างพันธุ์ลูกผสมโดยการผสมข้ามนั้นมีข้อจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมาก นอกจากนี้ยังอาจประสบกับปัญหาที่ลูกผสมเป็นหมันทำให้ไม่สามารถพัฒนาสายพันธุ์ต่อไปได้ การนำเอาเทคโนโลยีโปรโตพลาสต์มาใช้ในการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ น่าจะเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เทคโนโลยีนี้สามารถแก้ปัญหาและข้อจำกัดของการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมข้ามได้ อย่างไรก็ตามรายงานความสำเร็จในการรวมโปรโตพลาสต์ยังมีน้อย (Kunasakdakul and Smitamana, 2003)

โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ผ่านการเอาผนังเซลล์ออกด้วยวิธีกลหรือการใช้เอนไซม์แต่ยังคงเหลือเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้มส่วนต่างๆ ของเซลล์ไว้ ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากการแยกโปรโตพลาสต์นั้นมีหลายปัจจัย การเลือกใช้เอนไซม์นั้นต้องคำนึงถึงชนิดของพืช และชิ้นส่วนของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วย (สมปอง, 2539; คำนูณ, 2540; Teo and Neumann, 1978; Hu *et al*.,1998) นอกจากนี้การใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ในกล้วยไม้ *Aranda* Noorah Alsagoff. ส่งผลให้แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมาก (Loh and Rao, 1985) ส่วนการปรับแรงดัน osmotic มีความสำคัญ เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง มีการส่งผ่านอาหาร และน้ำเข้าสู่เซลล์เพื่อเซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตผ่านเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์นี้ และมีการปรับแรงดัน osmotic ภายในเซลล์ให้เท่ากับภายนอกเซลล์ หากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีแรงดัน osmotic ที่ไม่เหมาะสม อาจทำให้เซลล์แตกหรือเหี่ยวได้ ซึ่งแรงดัน osmotic ที่เหมาะสมนั้นจะต้องมีแรงดัน osmotic ภายใน และภายนอกเซลล์ที่สมดุลกัน (Evan and Bravo, 1983) นอกจากการแยกโปรโตพลาสต์แล้ว การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็มีความสำคัญเช่นกัน มีรายงานเกี่ยวกับวิธีการที่เหมาะสมที่ทำให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาได้ เช่น ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้วิธีการที่

แตกต่างกัน 3 วิธี คือ การใช้ Thin layer, การใช้ Liquid over agarose และ การใช้ Agarose bead method พบว่าการเลี้ยงโดยวิธี Thin layer มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงมากที่สุด (จิตเกษม และ สุเม, 2547) ส่วนการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของปาล์มน้ำมันในอาหารกึ่งแข็งซึ่งเติม Phytagel 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกได้สูงสุด (Te-chato *et al*., 2005)

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงมีความสำคัญก่อนที่จะประยุกต์ใช้โปรโตพลาสต์ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

กล้วยไม้พันธุ์ช้างแดงอายุ 6 เดือน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสง นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 25 μmol/m^2/s อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส (มีการย้ายในอาหารใหม่ทุก 2 เดือน หรือ 8 สัปดาห์) และหลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเป็นเวลา 2 เดือน ตัดแยกใบอ่อนคู่ที่ 1 ถึง 2 จากปลายยอดมาใช้เป็นวัสดุพืชในการแยกโปรโตพลาสต์ต่อไป

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดง (อายุ 8 สัปดาห์หลังย้ายเลี้ยง) ด้วยเอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 1, 2 เปอร์เซ็นต์ Cellulase Onozuka RS เข้มข้น 1, 2 เปอร์เซ็นต์ Macerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Driselase เข้มข้น 0.5, 1 เปอร์เซ็นต์ และ Pectolyase Y-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับแรงดัน osmotic ของเอนไซม์ด้วย Mannitol 0.70 โมลาร์ โดยใช้เอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าแบบไปมาด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±5 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยกรองผ่าน nylon mesh ฆ่าเชื้อขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ผ่านไปยังหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 รอบ/นาที นาน 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์ และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้างตามวิธีการของสกุลรัตน์ (2549) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ค่อยๆ ดูดเป่าให้เข้ากัน แล้วลอยบนสารละลายซูโครส 21 เปอร์เซ็นต์ เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์ โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากตอนกลางของสารละลาย แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2-3 ครั้ง นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารละลายโปร- โตพลาสต์ 100 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสี FDA (fluorescein diacetate) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เท่ากัน ดูดเป่าให้เข้ากันในสไลด์หลุม ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ดูการเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงสีเขียว-เหลือง คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกัน

การศึกษาผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการศึกษาแรก ปรับแรงดัน Osmotic ของเอนไซม์ด้วย Mannitol 0.70 โมลาร์ แยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดงอายุ 4 และ 8 สัปดาห์ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±5 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 5 ชั่งโมง แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ มาทำการนับจำนวน และตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละอายุของใบ

การศึกษาผลของระยะเวลา Incubation ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

นำใบอายุ 8 สัปดาห์ ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ที่ดีที่สุดจากการศึกษาแรก ปรับแรงดัน osmotic ของเอนไซม์ด้วย Mannitol 0.70 โมลาร์ incubate บนเครื่องเขย่าแบบไปมาด้วยความเร็วรอบ 50

รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±5 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาทำการนับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การศึกษาผลของ Osmoticum ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ใบอายุ 8 สัปดาห์มาทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยเอนไซม์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการศึกษาแรก ทำการปรับแรงดัน osmotic ของเอนไซม์ด้วย Mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 0.65, 0.70, 0.75 และ 0.80 โมลาร์ incubate บนเครื่องเขย่าแบบไปมาด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26±5 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาทำการนับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบที่มีอายุ 8 สัปดาห์ โดยปรับความหนาแน่นเริ่มต้น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog), VW (Vacin & Went) และ ½ MS + ½ VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ Mannitol เข้มข้น 0.75 โมลาร์ และ 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA (6- benzyladenine) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เปรียบเทียบกันในแต่สูตรอาหาร

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอายุ 8 สัปดาห์ ใช้ความหนาแน่นเริ่มต้น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ Mannitol เข้มข้น 0.75 โมลาร์ เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) และ 2,4-D ร่วมกับ BA, KN (Kinetin) และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 1 ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์ การแบ่งเซลล์ และการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์

การศึกษาวิธีการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้แบ่งวิธีการเลี้ยงเป็น 2 วิธีการ คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบที่มีอายุ 8 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ Mannitol เข้มข้น 0.75 โมลาร์ และ 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับอาหารแข็งเติม Agarose, Type VII-A เข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์

ผลการทดลอง

ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดงด้วยเอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10, Cellulase Onozuka RS, Macerozyme R-10, Driselase และ Pectolyase Y-23 ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าการใช้เอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Macerozyme R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ Driselase 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนสูงสุด ($1.28x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด) โดยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เท่ากับ 92.19 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือเอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ร่วมกับเอนไซม์ Macerozyme R-10 ซึ่งให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.1128x10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ใช้เอนไซม์ชนิดอื่นร่วมด้วยส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ ลดลง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

ผลของอายุใบต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 4 และ 8 สัปดาห์ โดยการใช้เอนไซม์รวมทั้ง 3 ชนิดที่ให้ดีที่สุดจากผลการศึกษาข้างต้น พบว่าชิ้นส่วนใบอายุ 4 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด (1.35x10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด) และความมีชีวิต 75.27 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชิ้นส่วนใบอายุ 8 สัปดาห์ซึ่งให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.1 x10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตประมาณ 72.58 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) และเมื่อทำการศึกษาเบื้องต้นโดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอายุ 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอายุ 8 สัปดาห์เจริญเติบโตได้ดีกว่า ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้ใบที่มีอายุ 8 สัปดาห์

ผลของระยะเวลา Incubation ต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 8 สัปดาห์ โดยการใช้เอนไซม์รวมทั้ง 3 ชนิดที่ให้ดีที่สุดจากผลการศึกษาข้างต้น ในที่มืดเป็นเวลา 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง พบว่าการใช้เวลาที่ 6 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด (1.05 x10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะเวลาที่ 4, 5 และ 7 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อใช้ระยะเวลา 5 ชั่วโมง มีความมีชีวิต 91.53 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากระยะเวลาอื่น (ตารางที่ 2)

ผลของ Osmoticum ต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 8 สัปดาห์ ด้วยเอนไซม์ที่ดีที่สุดจากผลการศึกษาข้างต้น ในที่มืดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการปรับแรงดัน osmotic ของเอนไซม์ด้วย Mannitol 0.65, 0.70, 0.75 และ 0.80 โมลาร์ พบว่า Mannitol ที่ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 9.7 x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือความที่เข้มข้นของ Mannitol 0.7 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 9.1 x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อตรวจสอบความมีชีวิต พบว่า ที่ความเข้มข้น Mannitol 0.65 โมลาร์ ให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เท่ากับ 92.06 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่ความเข้มข้น Mannitol 0.65 โมลาร์ ให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เท่ากับ 87.83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยความหนาแน่น 5x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว 3 สูตร คือ MS, VW และ ½ VW + ½MS พบว่าอาหารสูตร MS ให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์ดีที่สุด 0.30% ในขณะที่อาหารสูตร VW และ ½VW + ½MS ให้การพัฒนาของเซลล์ 0.23 เปอร์เซ็นต์ และ 0.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์ที่มีแอนโธไซยานินมีการแบ่งเซลล์ในสัปดาห์แรกหลังจากเพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์ในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 5) จากการศึกษา พบว่า เซลล์มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงน้อยมากส่งผลให้มีการ

พัฒนาของโปรโตพลาสต์ต่ำมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่า โปรโตพลาสต์เหี่ยวและไม่มีการพัฒนาต่อไปอีกในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

ผลของวิธีการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว พบว่าเซลล์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา1 สัปดาห์ ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่มีแอนโธไซยานินเป็นองค์ประกอบเท่านั้นที่มีการพัฒนาได้ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีแอนโธไซยานิน คลอโรฟิลล์จะเป็นสีดำ และตายในที่สุด ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารแข็งโปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนา

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้ช้างแดงมี 2 แบบ คือ มีแอนโธไซยานินซึ่งจะเห็นเป็นสีแดงชัดเจนและไม่มีแอนโธไซยานิน (ภาพที่ 2A) โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอายุ 4 สัปดาห์ มีการพัฒนาที่ไม่ดีเซลล์ที่มีแอน โธไซยานินเท่านั้นที่มีชีวิตรอด (ภาพที่ 2B) โปรโต-พลาสต์แบ่งเซลล์ครั้งแรกเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ลักษณะการแบ่งเซลล์เป็นแบบไม่สมมาตร มีการแบ่งคลอโรฟิลล์ให้กับเซลล์ลูกไม่เท่ากัน (ภาพที่ 2C) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอายุ 8 สัปดาห์ มีพัฒนาการที่ดีกว่าเนื่องจากมีแอนโธไซยานินปริมาณมาก (ภาพที่ 2D) และเมื่อเลี้ยงใบอายุ 8 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2E)

Table 1 effect of various enzyme combinations on yield and viability of Chang Daeng orchid protoplasts after incubated in mannitol 0.7 M for 5 hours.

Enzyme (%)					Yield of protoplasts/ g fr wt	Viability
CR-10	MR-10	CRS	Dri	Pec	(x 10^5) [1/]	(%)
2	2	-	-	-	11.1±1.81a	72.58±24.29[ns]
1	2	1	-	-	5.2±0.34c	78.70±20.09
-	2	2	-	-	4.3±0.51c	73.52±7.21
2	2	-	0.5	-	12.8±2.28a	92.19±2.03
2	2	-	1	-	8.2±0.29b	80.00±5.00
2	2	-	0.5	0.5	4.2±0.75c	95.23±8.25

[1/] Means within the same column followed by different characters showed significantly different by DMRT at $P \leq 0.05$, ns = not significantly different

CR-10 = Cellulase Onozuka R-10, **MR-10** = Macerozyme R-10, **CRS** = Cellulase Onozuka RS **Pec** = Pectolyase Y-23, **Dri** = Driselase

Table 2 Effect of incubation period on yield and viability of Chang Daeng orchid protoplasts after incubated in 2% Cellulase Onozuka R-10, 2% Macerozyme R-10, and 0.5% Driselase, 0.7 M mannitol for 5 hours.

Time (h)	Yield of protoplasts/g fr wt ($x\ 10^5$) [1/]	Viability (%)
4	4.6±4.42b	80.00±8.66[ns]
5	5.3±1.41b	91.53±7.50
6	10.5±4.20a	84.32±0.87
7	4.0±7.07b	87.77±10.71

[1/] Means within the same column followed by different characters showed significantly different by DMRT at $P \leq 0.05$, ns = not significantly different

Table 3 Effect of concentration of mannitol on yield and viability of protoplasts after incubated in 2% Cellulase Onozuka R-10, 10% Macerozyme R-10, and 0.5% Driselase, 0.7 M mannitol for 5 hours.

Mannitol (M)	Yield of protoplasts/g fr wt ($x\ 10^5$) [1/]	Viability (%)[1/]
0.65	5.2±0.34c	92.06±0.68a
0.70	9.1±0.25a	78.43±9.22a
0.75	9.7±0.60a	87.83±2.84a
0.80	7.0±0.47b	61.77±6.71b

[1/] Means within the same column followed by different characters showed significantly different by DMRT at $P \leq 0.05$, ns = not significantly different

Table 4 Effect of culture medium on survival rate and cell division of protoplasta at 1 week after culture in darkness.

Medium	1 week
MS	++ 0.3±0.02
VW	+ 0.23±0.02
½ MS + ½ VW	+ 0.26±0.02

+ cell survive ++ cell division

Table 5 Effect of plant growth regulators containing in MS medium on survive and cell division of protoplasts at 1 and 2 weeks after culture in darkness.

Plant growth regulators (mg/l)					Response	
NAA	2,4-D	BA	KN	di	1 week	2 weeks
1	0	1	0	0	-	-
1	0	0	1	0	+	-
0	0	0	0	1	+	-
0	0	0	0	0	+	-
1	0	0	0	1	+	-
0	1	1	0	0	++	-
0	1	0	1	0	+	++

- cell death + cell survive ++ cell division

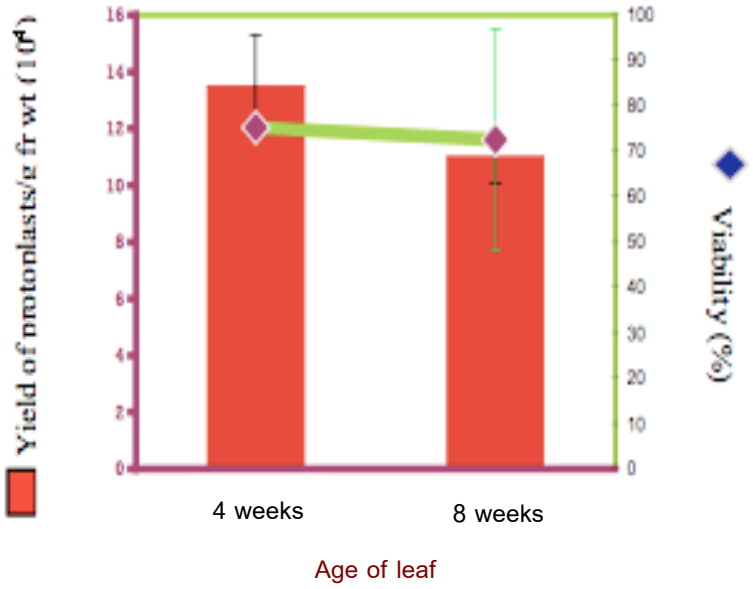

Figure 1 Effect of age of leaf on yield and viability of protoplasts after incubated in 2% Cellulase Onozuka R-10, 2% Macerozyme R-10, and 0.5% Driselase, 0.7 M mannitol for 5 hours.

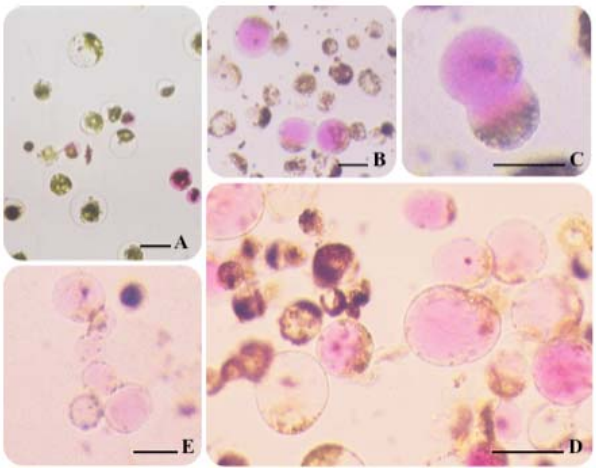

Figure 2 Development of protoplast in MS medium supplemented with 3% sucrose, 1.0 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BA and 0.7 M mannitol (culture of density of $5x10^5$ protoplasts/ml) (bar = 50 µm).

วิจารณ์

เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อปริมาณ และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ สกุลรัตน์ (2549) แยกโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร ด้วยเอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10 ร่วมกับ Macerozyme R-10 ในขณะที่ Teo and Neumann (1978) ใช้ Pectolyase ร่วมกับเอนไซม์ทั้งสองชนิดข้างต้นเพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนโปรโต-คอร์มของกล้วยไม้ Renantada Rosalind Cheok จึงสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี สำหรับการแยกโปรโต-พลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดงในการศึกษานี้ต้องใช้เอนไซม์ทั้งสองร่วมกับ Driselase จึงได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ในกล้วยไม้แต่ละชนิด และพันธุ์มีความแตกต่างกัน และมีความจำเพาะส่งผลต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกันด้วย จากการศึกษาอายุของชิ้นส่วนพืช พบว่า ชิ้นส่วนใบพืชที่มีอายุน้อยมีจำนวนโปรโตพลาสต์ และความมีชีวิตสูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนพืชที่มีอายุแก่กว่า อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนพืชที่มีอายุน้อยเซลล์มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมีการสร้างสารประกอบเชิงซ้อน (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ตลอดจน ลิกนิน และซูเบอร์ลิน) มาสะสมน้อยมาก ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้จึงสามารถย่อยได้ดีกว่า สอดคล้องกับ สกุลรัตน์ (2549) พบว่า ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลือง จันทบูรที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุดคือ นอกจากนี้ Theodoropoulos and Roubelakis-Angelakis (1990) พบว่า อายุของใบมีผลต่อปริมาณ และคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ แม้ว่าชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างแดงอายุ 4 สัปดาห์ ในการศึกษานี้ให้จำนวนโปรโต-พลาสต์สูงก็ตาม แต่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่มีอายุ 8สัปดาห์ สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า เนื่องมาจากมีเซลล์ที่มีแอนโธไซยานินจำนวนมาก แสดงว่าแอนโธไซยานินมีผลต่อการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ และพัฒนาของเซลล์โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้ช้างแดง (ภาพที่ 2C, 2D)

ระยะเวลา incubation ชิ้นส่วนพืชเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยสกุลรัตน์ (2549) รายงานว่าหากชิ้นส่วนพืชอยู่ในสารละลายเอนไซม์นานเกินไป ส่งผลให้

โปรโตพลาสต์เสียหายและความมีชีวิตลดลง Kunasakdakul and Smitamana (2003) ศึกษาระยะเวลา incubation ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Dendrobium* Prathum Red ในหลอดทดลองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่งผลให้จำนวน ความมีชีวิต และลักษณะของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด สกุลรัตน์ (2549) พบว่า ระยะเวลา incubation ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ส่งผลให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด สำหรับในกล้วยไม้ช้างแดงต้องใช้เวลานานถึง 6 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุด ซึ่งระยะเวลา incubation ใบของกล้วยไม้ช้างแดงนานกว่ากล้วยไม้ในสกุล *Dendrobium* ทั้งนี้เนื่องใบของกล้วยไม้ช้างแดงมีความหนาและแข็งกว่า

พืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งองค์ประกอบ และโครงสร้างใบของพืช ส่งผลให้ osmoticum ในใบต่างกัน ความเข้มข้นของ osmoticum สูงเกินไปนอกจากจะทำให้โปรโตพลาสต์เสียหายแล้ว ยังยับยั้งการแบ่งเซลล์อีกด้วย (Evans and Bravo, 1983; Wallin and Eriksson, 1973) จากการศึกษานี้เมื่อใช้ Mannitol ที่ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้ช้างแดงสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากใบของกล้วยไม้ช้างแดงมีความแข็ง และอวบน้ำเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ส่วนชนิดและความเข้มข้นของ osmoticum ของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้มีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีผนังเซลล์ ดังนั้นหาก osmoticum ที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ด้วย (บุญยืน, 2540) osmoticum ที่เหมาะสมจะช่วยให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดให้มากขึ้น ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่เหี่ยวหรือแตก อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็ต้องเติม osmoticum ด้วยเพื่อควบคุมแรงดัน osmoticจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ (สกุลรัตน์, 2549) Sajise and Sagawa (1991) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสกล้วยไม้ฟาแลนนอปซีส ในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลงร่วมกับธาตุอาหารรองสูตร MS ที่มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง และปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและสร้างโปรโตคอร์มได้ ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของกล้วยไม้ช้างแดงสามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร MS อาจเป็นไปได้ว่าโปรโตพลาสต์ของช้างแดงมีความต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญมากกว่ากล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส

สารควบคุมการเจริญเติบโต มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ Kunasakdakul and Smitamana (2003) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซีส ในอาหารเหลวสูตร PS ดัดแปลงเติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Zeatin เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำแคลลัสและพัฒนาเป็นแคลลัสที่จะพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ พืชต่างชนิดกันต้องการธาตุอาหารที่แตกต่างกันในการแบ่งเซลล์และพัฒนาการไปเป็นพืชต้นใหม่ การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ช้างแดง ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุดในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเลี้ยงต่อไป พบว่าในอาหารที่มี 2,4-D ร่วมกับ KN สามารถทำให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้ในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 5) วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีที่นิยมมากเนื่องจากสามารถปรับแรงดัน osmotic ได้ง่าย จิตเกษม และ สุเม (2547) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบว่า ในอาหารเหลวมีความเหมาะสมมากที่สุด อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงจึงอาจแตกต่างกันออกไป ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดงในกาศึกษานี้ไม่ได้ทดลองวิธีการเพาะเลี้ยง แต่การเลี้ยงในอาหารแข็งส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตนานขึ้น อย่างไรก็ตามไม่พบการแบ่งเซลล์ พัฐวดี (2536) รายงานว่าการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ของ *Aranda* ในอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้นานที่สุด

การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ถึงวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมจากใบกล้วยไม้ช้างแดง เพื่อให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มาก และมีความมีชีวิตสูง ดังนั้น ควรมีการศึกษาถึงวิธีการ

เพาะเลี้ยงเพิ่มเติม เนื่องจากความสามารถในการรอดชีวิตของโปรโตพลาสต์ การพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสจนกระทั่งเป็นพืชต้นใหม่นั้นต้องอาศัยหลายปัจจัย เช่น สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต แสง อุณหภูมิ เป็นต้น

สรุป

การแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ช้างแดงในหลอดทดลองต้องใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ Driselase เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และปรับแรงดัน osmotic โดยใช้ Mannitol เข้มข้น 0.75 โมลาร์ โดยใช้ระยะเวลา incubation 6 ชั่วโมง ในที่มืด ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดคือ 1.28×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 92-95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวางเลี้ยงในอาหาร MS ด้วยความหนาแน่น 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ที่มี 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร KN 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร Mannitol 0.75 M วางเลี้ยงในที่มืด 1-2 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ช้างแดงในใบที่มีอายุ 8 สัปดาห์มีการสร้างแอนโธไซยานินที่มากกว่าใบอายุ 4 สัปดาห์ เซลล์ที่มีแอนโธไซยานินเท่านั้นที่แบ่งเซลล์ และพัฒนาได้

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2540. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยเทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

จิตเกษม เที่ยงจิตต์ และ สุเม อรัญนารถ. 2547. การชักนำแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของบัวหลวง พันธุ์บุณฑริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35: 19-23.

พัฐวดี ทองสีดำ. 2536. การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 207 หน้า.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. 2549. เทคนิคการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ เหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 72 หน้า.

สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 135 หน้า.

อุทัย จารณศรี. 2548. กล้วยไม้ตัดดอก และกล้วยไม้กระถาง. ข่าวสารสมาคมพืชสวน. สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

Evans, D. A. and J. E. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture. pp. 124-176. *In*: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. Macmillan Publishing Company, New York.

Hu, W. -W., S. -M. Wong, C.-S. Loh and C.-J. Goh. 1998. Synergism in replication of *Cymbidium* mosaicpotexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) RNA in orchid protoplasts. Archives of Virology 143: 1265-1275.

Kunasakdakul, K. and P. Smitamana. 2003. *Dendrobium* Prathum Red protoplast culture. Thai J. Agric. Sci. 36: 1-8.

Loh, C.-S. and A.N. Rao. 1985. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Aranda* Noorah Alsagoff. Malayan Orchid Review 19: 34-37.

Sajise, J.U. and Y. Sagawa. 1991. Regeneration of plantlets from callus and protoplasts of *Phalaenopsis* sp. Malayan Orchid Bull. 5: 23-28.

Te-chato, S. A. Hilae and L. Moosikapala, 2005. Microcolony formation from embryogenic callus-derived protoplasts of oil palm. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27: 685-691.

Teo, C.K.H. and K.H. Neumann. 1978. The culture of protoplasts isolated from *Renantanda* Rosalind Cheok. The Orchid Review 86: 156-158.

Theodoropoulos, P. A. and K. A. Roubelakis-Angelakis. 1990. Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot culture of *Vitis vinifera* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 15-23.

Wallin, A. and T. Eriksson. 1973. Protoplast cultures from suspension of *Daucus carota*. Physiol. Plant. 28: 33-39.