บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

คะน้าจีน (Chinese kale) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica oleracea* var. *alboglabra* อยู่ในตระกูล Cruciferae ที่มีถิ่นกำเนิดแถบทางตอนใต้ของประเทศจีน จัดเป็นพืชเมืองร้อนและผสมข้ามโดยธรรมชาติ ส่วนที่นิยมใช้บริโภคคือ ใบ และลำต้น คะน้าจีนเป็นผักที่ปลูกได้ตลอดปี แต่จะให้ผลผลิตดีที่สุดในเดือนตุลาคมถึงเมษายน สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีค่า pH ประมาณ 5.5-5.8 ความชื้นในดินสม่ำเสมอ ต้องการแสงมาก อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20-25 ^{0}ซ (เมืองทองและสุรีรัตน์, 2532) ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้ดี และให้ผลผลิตสูงในสภาพอุณหภูมิประมาณ 25 ^{0}ซ (เกษม, 2513) สำหรับพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย มีลักษณะเป็นพันธุ์ดอกขาว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (เมืองทองและสุรีรัตน์, 2532) คือ

1) พันธุ์ใบกลม ลักษณะใบกว้าง ปล้องสั้น ปลายใบมน ผิวใบเป็นคลื่นเล็กน้อย เช่น พันธุ์ฝางเบอร์ 1
2) พันธุ์ใบแหลม ลักษณะใบแคบกว่า ปลายใบแหลม ข้อห่าง ใบผิวเรียบ เช่น พันธุ์ พีแอล 20 169.
3) พันธุ์ก้าน ลักษณะใบเหมือนคะน้าใบแหลม จำนวนใบต่อต้นน้อยกว่า ปล้องยาว เช่น พันธุ์แม่โจ้1

บร็อคโคลี่ หรือกะหล่ำดอกอิตาเลี่ยน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica oleracea* var. *italica* มีชื่อสามัญทั่วไปว่า Italian broccoli, Sprouting broccoli, Broccoli เป็นพืชเมืองหนาวและเป็นพืชผสมข้ามโดยธรรมชาติ มีประวัติและถิ่นกำเนิดที่พัฒนาพันธุ์มาจากกะหล่ำปลีชนิดใบ (wild cabbage) ทางตอนใต้ของยุโรปหรือแถวประเทศอิตาลี ลักษณะของบร็อคโคลี่จะมีลำต้นใหญ่ อวบและสูงประมาณ 40-75 ซม. ใบกว้างมีสีเขียวเข้มออกเทา ขอบใบหยัก ทรงพุ่มใหญ่ (กองบรรณาธิการฐานเกษตรกรรม, 2534) นิยมบริโภคส่วนของดอกอ่อนและก้านดอก เช่นเดียวกับกะหล่ำดอก แต่ส่วนของดอกสีเขียวหรือเรียกว่าเฮด (head) นั้นประกอบด้วยดอกอ่อนสีเขียวขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ที่รวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่แต่เกาะตัวกันหลวมกว่า แยกกันได้ค่อนข้างเด่นชัด ไม่อัดตัวกันแน่นเหมือนเคิร์ด (curd) ของดอกกะหล่ำ ดอกแรกหรือดอกประธานมีขนาดใหญ่ ส่วน

ดอกแขนงเกิดขึ้นเมื่อเก็บดอกประธานไปแล้ว และมักมีขนาดเล็ก (เกษม, 2513) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ (สราวุฒิ, 2530)

1) Heading form ประกอบด้วยดอกเดี่ยวที่มีขนาดใหญ่อยู่บริเวณตรงกลางของปลายยอด ขนาดความกว้างของดอกมีความกว้างตั้งแต่ 9 นิ้วขึ้นไป สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะสีของดอกได้แก่ dark green type หรือ blue green type, light pale green type และ purple type

2) Sprouting form ประกอบด้วยดอกขนาดเล็กจำนวนมากที่เจริญจากทางตาข้างคล้ายกับกะหล่ำดาว ดอกมีหลายสี เช่น เขียว ม่วง และขาว ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

การปลูกบร็อคโคลี่ในประเทศไทยนิยมปลูกในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคม แต่ปลูกได้ผลดีที่สุดในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการปลูกอยู่ในช่วง 18-27 ^{0}ซ แต่เจริญเติบโตให้ผลผลิตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 ^{0}ซ (เมืองทองและสุรีรัตน์, 2532) สภาพแวดล้อมในการผลิตผักชนิดนี้ให้มีคุณภาพสูง (ก้านดอกและขนาดดอกใหญ่) นั้น จำเป็นต้องมีสภาพดินอุดมสมบูรณ์สูง ความชื้นในดินสูง ดังนั้นการให้น้ำต้องสม่ำเสมอและพอเพียง ถ้าสภาพแห้งความชื้นในดินไม่เพียงพอจะทำให้ผักเป็นเสี้ยนมีคุณภาพต่ำ สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน ที่เหมาะสม คือ 6-8 (เกษม, 2513)

<u>การเพาะเลี้ยงละอองเรณู</u>

การเพาะเลี้ยงละอองเรณู (anther culture) เป็นอีกวิธีการหนึ่งของการสร้างพืชที่มีพันธุกรรมอยู่ในลักษณะที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametic cell) และมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n) ซึ่งเรียกว่า พืชแฮพพลอยด์ (haploid plant) (Guo and Pulli, 1996) ในทางการปรับปรุงพันธุ์พืชถือว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถเปิดโอกาสให้ทุก ๆ ยีน รวมทั้งยีนด้อยสามารถแสดงออกมาได้โดยตรง ขณะเดียวกันสามารถสร้างพืชให้เป็นโฮโมไซกัสดิพลอยด์ได้อย่างสมบูรณ์จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็นเท่าตัว (doubling chromosome) ด้วยสารโคลชิซิน (cochicine) ทำให้สามารถผลิตพืชสายพันธุ์แท้ (pure line) ได้ในระยะเวลารวดเร็ว (Dunwell, 1985) เทคนิคการเพาะเลี้ยงละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตพืชแฮพพลอยด์ประสบผลสำเร็จเป็นจำนวนมากในพืชหลายชนิด (Bajaj, 1983) โดยเฉพาะในกลุ่มพืช 3 ตระกูล ได้แก่ Poaceae Solanaceae และ Compositae (รังสฤษดิ์, 2540)

การพัฒนาของละอองเรณูเกิดเป็นพืชแฮพพลอยด์มี 2 วิธีการ คือ (Bajaj, 1990 ; Keller, 1984)

1) Direct androgenesis หรือ Embryogenesis เป็นการพัฒนาของละอองเรณูผ่านระยะต่าง ๆ จนกระทั่งเกิดเป็นเอมบริโอ โดยเฉพาะเอมบริโอที่อยู่ในระยะ globular stage จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจนเป็นต้นสมบูรณ์ หลังจากเลี้ยงประมาณ 4-8 สัปดาห์

2) Indirect androgenesis เป็นขบวนการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส (callus) ซึ่งจะดันผนังของละอองเรณูให้แตกออกมา หลังจากนั้นต้องย้ายแคลลัสดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อชักนำให้เกิดยอดบนแคลลัสอีกครั้ง

นอกจากนั้น Nitsch and Nitsch (1969) พบว่าการพัฒนาของส่วนที่จะเจริญเป็นแฮพพลอยด์ของละอองเรณูอยู่ภายใต้การควบคุมของพันธุกรรมซึ่งแตกต่างกันในแต่ละพืช ดังนั้นจึงมีผลให้การพัฒนาของละอองเรณูของพืชแตกต่างกัน บางชนิดอาจเจริญไปเป็นแคลลัส หรือบางชนิดเจริญเป็นเอมบริโอได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม Keller (1984) พบว่าความสำเร็จของการสร้างพืชแฮพพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญหลายประการ ดังนี้คือ

1) ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช (genotype)

ลักษณะทางพันธุกรรมของพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงละอองเรณูของพืชในอาหารสังเคราะห์ และมีผลทำให้การตอบสนองของละอองเรณูแตกต่างกันไป (Guo and Pulli, 1996 ; Ferrie *et al.*, 1995 ; Ockendon and Clenagham, 1993 ; Collins and Genovesi, 1982) การเพาะเลี้ยงละอองเรณูไม่สามารถประสบผลสำเร็จได้ หากพืชไม่ตอบสนองต่อการเลี้ยง (Arnison and Keller, 1990) พืชบางชนิดชักนำให้เป็นต้น haploid ได้ง่าย แต่บางชนิดชักนำยาก ถึงแม้ว่าจะได้รับสภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม (รังสฤษดิ์, 2540) ดังนั้นสามารถแบ่งการตอบสนองของพืชต่อการเพาะเลี้ยงออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ตอบสนองได้ดีที่สุด กลุ่มที่ตอบสนองได้ดีปานกลาง และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองเลย (Ockendon, 1985) ดังการทดลองของ Arnison *et al.* (1990) พบว่าละอองเรณูของบร็อคโคลี่แต่ละสายพันธุ์ตอบสนองต่อ cytokinin แตกต่างกัน บางพันธุ์ตอบสนองต่อ cytokinin ทำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดียิ่งขึ้น บางพันธุ์ไม่ตอบสนอง และถูกยับยั้งการพัฒนาของละอองเรณูอีกด้วย Dias and Martin (1999) ศึกษาพบว่าพืชในกลุ่ม *B. oleracea* แต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อ $AgNO_3$ ในระดับที่เหมาะสมต่างกันและเปอร์เซนต์ของการเกิดเอมบริโอยังแตกต่างกันด้วย Thurling and Chay (1984) พบว่าลักษณะพันธุกรรมของ *B. napus* ssp.

oleifera ที่ต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ มีผลต่อความสามารถของการพัฒนาของละอองเรณูในระยะ uninucleate ไปเป็นกลุ่มเซลล์ (multicellular) และเจริญเป็นเอมบริโอได้แตกต่างกัน Yang *et al.* (1992) รายงานว่าระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมของกะหล่ำดอกขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรม ส่วน Ockendon (1988) พบว่าละอองเรณูของกะหล่ำดอกแต่ละพันธุ์สามารถเจริญและพัฒนาเป็นเอมบริโอได้แตกต่างกัน บางพันธุ์เกิดเอมบริโอเป็นจำนวนมาก แต่บางพันธุ์ไม่สามารถเจริญเป็นเอมบริโอได้เลย และยังพบว่าแต่ละเอมบริโอพัฒนาให้จำนวนต้นแฮพพลอยด์แตกต่างกัน

2) สภาพแวดล้อมขณะปลูก และอายุพืชทดลอง (condition and age of donor plant)

Guo and Pulli (1996) ; Bajaj (1990) กล่าวว่าสภาพแวดล้อมระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความเข้มแสง ธาตุอาหาร ปริมาณกาซคาร์บอนไดออกไซด์ และอายุของต้นพืชทดลองมีอิทธิพลต่อการออกดอกและคุณภาพของละอองเรณู ซึ่งมีผลอย่างมากต่อการพัฒนาของละอองเรณู Dunwell (1985) กล่าวว่าหากควบคุมไม่ดีพออาจมีผลให้การตอบสนองของละอองเรณูมีความแปรปรวนมาก จากการศึกษาของ Wenzel and Foroughi-Wehr (1984) พบว่าละอองเรณูที่ได้จากต้นพืชทดลองที่เจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงต่างกัน Keller (1984) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการปลูกพืชสกุล *Brassica* ควรอยู่ระหว่าง 15–20 ^{0}ซ ซึ่งจะส่งผลให้ละอองเรณูพัฒนาได้ดียิ่งขึ้น Thurling and Chay (1984) พบว่าละอองเรณูของ *B. napus* ssp. *oleifera* ที่ปลูกภายใต้ร่มเงาและมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 15-20 ^{0}ซ สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ได้ดีกว่าการปลูกในสภาพกลางแจ้ง ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 25-30 ^{0}ซ ในขณะที่ Yang *et al.* (1992) ศึกษาพบว่าช่วงระยะเวลาการปลูกกะหล่ำดอกที่เหมาะสมที่สุด คือ ช่วงฤดูใบไม้ผลิ และมีอุณหภูมิระหว่างการเจริญเติบโต 10-20 ^{0}ซ Ockendon (1984) พบว่าการพัฒนาของละอองเรณูกะหล่ำดาวที่ได้จากต้นที่ปลูกในโรงเรือนภายใต้สภาพควบคุมให้มีอุณหภูมิกลางวัน 15 ^{0}ซ และกลางคืน 9 ^{0}ซ สามารถพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดีที่สุด และมีความแปรปรวนน้อยกว่าละอองเรณูที่ได้จากต้นที่ปลูกภายนอกโรงเรือน ทั้งนี้มีสาเหตุจากอุณหภูมิระหว่างการปลูกที่ไม่สม่ำเสมอมีผลทำให้คุณภาพของละอองเรณูต่ำ อย่างไรก็ตาม Bajaj (1990) รายงานว่าพืชหลายชนิดในสกุล *Brassica* ที่ปลูกภายใต้สภาพโรงเรือนที่ควบคุมสภาพแวดล้อมมีการพัฒนาของละอองเรณูเจริญเป็นเอบริโอต่ำ ดังนั้นการปลูกพืชภายใต้สภาพควบคุมควรให้ได้รับความเข้มแสงสูงขึ้น (190 E/m^{2}/S จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน) จะช่วยทำให้ละอองเรณูพัฒนาได้ดียิ่งขึ้น Keller (1984) พบว่าละอองเรณูของ *B. napus* ตอบสนองต่อการเลี้ยงในอาหารได้ดีขึ้นถ้าให้

แสงระหว่างการเจริญเติบโตของต้นพืช 16 ชั่วโมงต่อวัน ในขณะที่ *B. campestris* ควรได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง

นอกจากนั้นอายุของพืชในช่วงเก็บดอกเป็นสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งที่ควรคำนึงถึง โดยทั่วไปดอกที่นำมาเพาะเลี้ยงควรเก็บจากต้นพืชที่อยู่ในระยะเริ่มออกดอก ซึ่งจะตอบสนองต่อการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มากที่สุด (Marinkovic and Radojevic, 1992) จากการศึกษาของ Burnett *et al.* (1992) พบว่าดอกของ *B. rapa* L. ssp. *oleifera* ที่เก็บจากต้นที่มีอายุหลังจากย้ายปลูก 2 เดือน จะให้ละอองเรณูที่อยู่ในระยะ mid-uninucleate มากที่สุด และสามารถพัฒนาให้เอมบริโอได้สูงสุด Ockendon (1984) ศึกษาพบว่าใน *B. napus* ควรเก็บเกี่ยวช่อดอกอ่อนในขณะที่ดอกแรกยังไม่บาน ซึ่งละอองเรณูในช่วงนี้สามารถเจริญเป็นเอมบริโอได้ดีว่าละอองเรณูที่ได้จากช่อดอกแรกบานแล้ว รังสฤษดิ์ (2540) รายงานว่าหากจำเป็นต้องยืดระยะเวลาเก็บออกไปควรเด็ดตาดอกที่ไม่ใช้ทิ้งเพื่อกระตุ้นให้พืชแก่ช้าลง

3) ระยะการพัฒนาของละอองเรณู

การเลือกดอกที่มีระยะการพัฒนาละอองเรณูที่เหมาะสมและถูกต้องมาเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมาก พืชต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์อาจมีระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมแตกต่างกัน ดังนั้นการเลี้ยงละอองเรณูที่อยู่ในระยะที่ไม่เหมาะสมมีผลทำให้โอกาสการเจริญเป็นเอมบริโอหรือการพัฒนาเป็นต้นแฮพพลอยด์ลดลง (Dunwell, 1985) ระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมของพืชสกุล *Brassica* คือ ระยะ uninucleate ซึ่งง่ายต่อการชักนำให้เจริญเป็นเอมบริโอ (Keller, 1984) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Duijs *et al.* (1992) ชี้ให้เห็นว่าระยะ binucleate ของพืชหลายชนิดในกลุ่ม *B. oleracea* เช่น บร็อคโคลี่ กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีซาวอย กะหล่ำดาว และคะน้าใบหยิก เป็นระยะที่เหมาะสมเช่นกัน Kieffer *et al.* (1993) สามารถกระตุ้นให้ละอองเรณูของคะน้าเกิดเอมบริโอได้โดยที่ละอองเรณูอยู่ในระยะ uninucleate และ binucleate แต่เปอร์เซนต์การเกิดจากระยะ uninucleate จะสูงกว่า ส่วนในกะหล่ำดอก Yang *et al.* (1992) ศึกษาพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมแตกต่างกัน ในพันธุ์ลูกผสม 702 ละอองเรณูในระยะ uninucleate สามารถเจริญให้เอมบริโอได้สูงสุด ในขณะที่พันธุ์ V23.2 และพันธุ์ลูกผสม 703 ระยะที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงแบ่งตัวแบบ mitosis ในระยะที่ 1

Bajaj (1990) รายงานว่าการตรวจสอบขนาดของดอกที่เหมาะสมต่อการนำละอองเรณูมาเพาะเลี้ยงนั้น สามารถศึกษาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดอกกับระยะการพัฒนาของละอองเรณู ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวจะแปรผันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อมระหว่างการเจริญเติบโตของพืช การทดลองของ Thurling and Chay (1984) ชี้ให้เห็นว่าระยะการพัฒนาของละอองเรณูของ *B. napus* ssp. *oleifera* มีส่วนสัมพันธ์กับขนาดของดอก จากการตรวจสอบดอกที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 2.0-2.5 มม. มีละอองเรณูอยู่ในระยะ uninucleate มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเจริญเป็นเอมบริโอได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับดอกที่มีขนาดต่ำกว่า 1.5 มม. และมากกว่า 3.0 มม. ซึ่งไม่พบว่ามีละอองเรณูระยะ uninucleate เลย Dunwell *et al.* (1985) พบว่าขนาดดอกของ *B. napus* ssp. *oleifera* ที่มีขนาด 2.0-3.0 มม. มีละอองเรณูในระยะ uninucleate มากที่สุด นอกจากนี้ Burnett *et al.* (1992) ได้รายงานว่าดอกของ *B. rapa* L.ssp. o*leifera* ที่มีขนาดระหว่าง 2.0-3.0 มม. มีละอองเรณูในระยะ mid uninucleate มากที่สุด ส่วนใน *B. campestris* Guo and Pulli (1996) ศึกษาพบว่าขนาดดอกของที่เหมาะสมต่อการนำอับละอองเรณูมาเพาะเลี้ยงควรมีขนาดอยู่ระหว่าง 2.0-3.0 มม. ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเอมบริโอได้มากที่สุด Telmer *et al.* (1992) พบว่าดอกของ *B. napus* cv. Topus ที่มีละอองเรณูอยู่ในระยะ binucleate สามารถพัฒนาเกิดเป็นเอมบริโอได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับละอองเรณูที่อยู่ในระยะ mid-uninucleate และ late-uninucleate ส่วนในกะหล่ำดาว Ockendon (1988) พบว่าดอกตูมที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 4.0-5.0 มม. และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวของกลีบเลี้ยงและความยาวของอับละอองเรณูในช่วง 0.8-1.3 มม. ให้ละอองเรณูที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงมากที่สุด Marinkovic and Radojevic (1992) พบว่าดอกของ *Aesculus carnea* Hayne ที่มีขนาด 4.0 มม. มีละอองเรณูในระยะ uninucleate มากที่สุดและสามารถพัฒนาเจริญเป็นเอมบริโอได้สูงสุด Fan *et al.* (1988) รายงานว่าละอองเรณูของ *B. napus* L.ที่อยู่ในระยะ uninucleate มีการพัฒนา 2 แบบ คือ ละอองเรณูแบ่งเซลล์ในระยะแรกเพื่อให้ได้ 2 นิวเคลียส ต่อจากนั้นมีการแบ่งอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งเกิดเป็น multinucleate embryoid ส่วนแบบที่ 2 ละอองเรณูพัฒนาเป็นแคลลัส

4) การ pretreatment

Dunwell (1985) กล่าวว่าการกระตุ้นดอกในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำอับละอองเรณูมาเลี้ยงจะช่วยทำให้ละอองเรณูพัฒนาดียิ่งขึ้น ทั้งนี้ลักษณะและวิธีการกระตุ้นแตกต่างกันไปในแต่ละพืช พืชบางชนิดต้องเก็บดอกที่อุณหภูมิต่ำ แต่บางชนิดต้องเก็บที่อุณหภูมิสูง พืชแต่ละชนิดในสกุล *Brassica* ต้องการการกระตุ้นดอกแตกต่างกันไป ใน *B. oleracea* var. *italica*

พันธุ์ Green Mountain Keller and Armstrong. (1983) พบว่าการเก็บดอกในสภาพอุณหภูมิสูงโดยการแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 ^{0}ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย 40 ^{0}ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำละอองเรณูมาเลี้ยงจะช่วยส่งเสริมให้เกิดเอมบริโอมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอใน *B. hirta* Shen and Veilleux (1995) พบว่าการเก็บดอกมันฝรั่งในสภาพอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมการพัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มขึ้น Bajaj (1990) รายงานว่าการใช้อุณหภูมิต่ำเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้ละอองเรณูของพืชหลายชนิดพัฒนาได้ดียิ่งขึ้นโดยเฉพาะพืชในกลุ่ม mustard และ spring rape George and Rao (1982) พบว่าการเก็บดอก *B. juncea* var. TM-4 ไว้ที่อุณหภูมิต่ำที่ 10 ^{0}ซ ประมาณ 2-15 วัน ก่อนนำอับละอองเรณูไปเลี้ยงจะช่วยกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มขึ้น Osalnik *et al.* (1993) ศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นดอก *B. oleracea* var. *capitata* ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิต่ำในระยะเวลาต่าง ๆ กับการเก็บที่อุณหภูมิสูง พบว่า การเก็บดอกในอุณหภูมิต่ำที่ 4 ^{0}ซ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงจะเกิดจำนวนเอมบริโอมากที่สุด ในขณะที่การเก็บในสภาพอุณหภูมิสูงละอองเรณูไม่สามารถพัฒนาเป็นเอมบริโอได้เลย

นอกจากนี้ยังมีรายงานความสำเร็จของการชักนำให้เกิดการพัฒนาของละอองเรณูจากการกระตุ้นดอกในสภาพอุณหภูมิต่ำในพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น ใน *Datura* spp. (Nitsch and Norreel, 1973) ข้าวโพด (*Zea may*) พันธุ์ CH-13 ซึ่งพบว่าการเก็บช่อดอกที่อุณหภูมิ 9 ^{0}ซ เป็นระยะเวลา 6-9 วัน จะช่วยส่งเสริมให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดียิ่งขึ้น (Tsay *et. al.*, 1986) หรือการเก็บช่อดอกของ Spring wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) ในที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ในที่มืด ซึ่งพบว่าจะช่วยกระตุ้นให้เกิดแคลลัสเพิ่มมากขึ้น 14 เปอร์เซ็นต์ และการพัฒนาไปเป็นต้นเพิ่มขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์ (Lazar *et al.*, 1985)

5) อาหาร

Keller and Armstrong (1977) รายงานอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงละอองเรณูเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากต่อความสำเร็จของการผลิตพืชแฮพพลอย์ นอกจากนั้น Dunwell (1985) พบว่าความแตกต่างของชนิดพืช และสายพันธุ์ รวมถึงความแตกต่างของระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความต้องการองค์ประกอบของอาหารแตกต่างกัน Bajaj (1990) แนะนำว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณูส่วนใหญ่สามารถดัดแปลงมาจากสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น อาหารสูตร White (1943), Murashige and Skoog (1962) และ Nitsch and Nitsch (1969) ในขณะที่ละอองเรณูของพืชหลายชนิดในสกุล *Brassica* สามารถพัฒนาได้ดีใน

อาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller *et al.* (1977) แต่ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารบางชนิด ซึ่งได้แก่ ธาตุอาหาร วิตามิน กรดอะมิโน น้ำตาล และฮอร์โมน จะถูกดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับแต่ละพืช Burnett *et al.* (1992) รายงานการแยกละอองเรณูของ *B. rapa* L. ssp. *oleifera* ในอาหาร B_5 ที่ไม่เติมธาตุเหล็ก แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร NLN แต่ลดปริมาณของเหล็กลงครึ่งหนึ่งพบว่าสามารถชักนำให้ละอองเรณูเกิดเอมบริโอได้ดีที่สุด

รังสฤษดิ์ (2540) พบว่าฮอร์โมนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร และมีผลต่อความถี่ของการชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอหรือแคลลัส ฮอร์โมนพืชที่สำคัญและนิยมเติมลงในอาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงละอองเรณูพืชได้แก่ auxin และ cytokinin พืชบางชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม Poaceae และ Cruciferae มีความต้องการฮอร์โมนมาก แต่พืชบางชนิดเช่น กลุ่ม Solanaceae กลับไม่ต้องการฮอร์โมนชนิดใด แต่สามารถเจริญเป็นเอมบริได้ อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์ตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนแตกต่างกัน Dunwell (1985) รายงานว่าออกซิน และไซโตไคนิน จัดเป็นฮอร์โมนหลักที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในอาหารที่นำมาใช้เลี้ยงละอองเรณูของพืชทั่วไป เนื่องจากมีบทบาทต่อการพัฒนาเป็นต้น ราก และอวัยวะของพืช Reinert and Bajaj (1977) กล่าวว่าปริมาณการใช้ฮอร์โมน auxin และ cytokinin ต้องมีความสมดุลย์กัน หากใส่มากเกินไปจะช่วยส่งเสริมให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ เช่น ผนังอับละอองเกสร หรือรอยตัดบริเวณ filament มากกว่าทำให้เกิดการพัฒนาของละอองเรณู Bajaj (1990) รายงานว่าการใช้ auxin ในระดับความเข้มข้นต่ำจะช่วยส่งเสริมให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้โดยตรง Keller (1984) พบว่าอาหารเลี้ยงละอองเรณูของพืชสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่นิยมเติมฮอร์โมนกลุ่ม auxin ซึ่งได้แก่ 2,4-D และ NAA ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.1 มก. ต่อล. แต่ในบร็อคโคลี่ *B. oleracea* var. *italica* Keller and Armstrong (1983) พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ NAA เป็น 10 เท่า ช่วยส่งเสริมให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มมากขึ้น Ockendon (1984) ; Ocken and Clenaghan (1993) พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ในอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณูของกะหล่ำดาวให้สูงขึ้นมีผลทำให้จำนวนเอมบริโอเพิ่มมากขึ้น แต่การเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ในระดับต่างๆ ในอาหารกลับพบว่าไม่มีผลทำให้จำนวนเอมบริโอเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

Bajaj (1990) รายงานว่าการเติมฮอร์โมน cytokinin ร่วมกับ auxin ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณูของพืชกลุ่มธัญพืชจะช่วยกระตุ้นให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดียิ่งขึ้น เช่น การเลี้ยงละอองเรณูของข้าวโพดในอาหารสูตร N_6 ที่เติมฮอร์โมนไซโตไคนินหรือไคเนตินร่วมกับ

auxin พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการเลี้ยงและเพิ่มความถี่ของการชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอและแคลลัสเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ฮอร์โมน auxin เพียงอย่างเดียว Lichter (1981) ศึกษาพบว่าการเลี้ยงอับละอองเรณู *B. napus* ในอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP เข้มข้น 0.05 มก./ล. จะเกิดการพัฒนาของอับละอองเรณูเป็นเอมบริโอได้ดีที่สุดเช่นกัน แต่จากการทดลองของ Paul *et al.* (1990) พบว่าการเติมฮอร์โมนไซโตไคนินลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงอับละอองเรณูของ *B. oleracea* var. *italica* กลับมีผลยับยั้งการพัฒนาให้เกิดเอมบริโอน้อยลง Bajaj (1990) รายงานว่าการใช้ฮอร์โมนในระดับที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดียิ่งขึ้น โดยฮอร์โมนจะมีบทบาทและจำเป็นเฉพาะในช่วงเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์ แต่ในขบวนการพัฒนาของเอมบริโอหรือแคลลัสไปเป็นต้นอ่อนนั้น ส่วนใหญ่พัฒนาได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนใด ๆ (Free medium)

Ferrie *et al.* (1995) ; Dunwell (1985) รายงานว่าน้ำตาลจัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในอาหาร เนื่องจากช่วยส่งเสริมให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดียิ่งขึ้นแต่ทั้งนี้ต้องปรับใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม Ilic *et al.* (1998) ; Bajaj (1990) นอกจากน้ำตาลในอาหารถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนแล้ว น้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ช่วยรักษาสภาพแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง Roulund *et al.* (1991) รายงานว่าระดับน้ำตาลที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป Keller (1984) พบว่าพืชสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่ใช้น้ำตาลซูโครสตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 4% จนถึงระดับที่เหมาะสมซึ่งนิยมใช้กันมากที่สุดคือ 10% ในข้าวโพด (*Zea may*) Dunwell (1985) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 9-15% แต่ Tsay *et al.* (1980) พบว่าน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 9 และ 12% เป็นปริมาณที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับข้าวโพดพันธุ์ CH-13 และข้าวบาร์เล่ย์ ตามลำดับ Keller *et al.* (1975) กล่าวว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงละอองเรณูของพืชหลายชนิดมีผลไปกระตุ้นให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอหรือสร้างแคลลัสเพิ่มมากขึ้น Dunwell *et al.* (1985) ศึกษาการเลี้ยงอับละอองเรณูของ *B. napus* ssp. *oleifera* พันธุ์ Fiona ในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสในระดับต่าง ๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 20% สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 8, 12 และ 16% นอกจากนี้จากการศึกษาของ Roulund *et al.* (1991) พบว่าการเลี้ยงละอองเรณูของ *B. oleracea* L. convar. *capitata* (L.) Alef. ในอาหารที่เพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้นอยู่ในระดับ 14.2 $\pm$ 0.1% มีความเหมาะสมมากที่สุดและสามารถชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มมากขึ้น 1.7 เท่า ขณะเดียวกันน้ำตาลที่ความเข้มข้น 14.0 $\pm$ 0.1%

สามารถชักนำให้เอมบริโอพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับระดับน้ำตาลที่ 10% แต่ Keller (1977) พบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้นในพืชบางชนิด เช่น ยาสูบ มีผลทำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอได้น้อยลง และเกิดความผิดปกติจนไม่สามารถพัฒนาให้เกิดยอดได้ เช่นเดียวกับความผิดปกติของเอมบริโอของ *B. campestris* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูง จะไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้เช่นกัน Matusbayashi and Kuranuki (1975) รายงานว่าในระยะเริ่มต้นของการเลี้ยงหรือระยะเริ่มแรกของการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูเพื่อชักนำให้เกิด embryogenesis มีความต้องการน้ำตาลในปริมาณสูง แต่หลังพ้นระยะนี้แล้วความต้องการน้ำตาลซูโครสลดลง เนื่องจากน้ำตาลไม่มีผลต่อขบวนการพัฒนาของเอมบริโอให้เจริญเป็นต้น

อาหารสังเคราะห์ที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงละอองเรณูของพืชสกุล *Brassica* มี 2 ประเภท คือ อาหารแข็ง (solid medium) และอาหารเหลว (liquid medium) แต่ที่นิยมใช้กันมากคือ อาหารเหลว เนื่องจากประสิทธิภาพการพัฒนาของละอองเรณูเจริญเป็นเอมบริโอในอาหารเหลวดีกว่าอาหารแข็ง (Keller, 1984) แต่ Dunwell (1985) รายงานว่าละอองเรณูที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีกว่า แต่มีข้อเสีย คือ พัฒนาไปเป็นต้นได้น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว ละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสแล้วไม่ควรทิ้งไว้ในอาหารเหลวนานเกินไปเพราะทำให้แคลลัสมีโอกาสขาดออกซิเจนสูง Keller (1984) รายงานว่าค่า pH ของอาหารที่ใช้เลี้ยงอับละอองเรณูของพืชสกุล *Brassica* ที่นิยมปรับใช้คือ 5.8 แต่โดยทั่วไปอาจปรับให้อยู่ระหว่าง 5-6 โดยการใช้ KOH 1 N Arnison *et al.* (1990) พบว่าค่า pH ของอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 5-6.5 ซึ่งจะทำให้ละอองเรณูพัฒนาได้มากที่สุด และยังพบว่าความหนาแน่นของอับละอองเรณูบร็อคโคลี่ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงควรมีจำนวนอยู่ระหว่าง 12-24 อับต่อปริมาตรอาหาร 4 มล.

6) สภาพแวดล้อมของการเลี้ยง

Duijs *et al.* (1992) ; Bajaj (1990); Keller (1984); Keller and Armstrong (1981) รายงานว่าพืชสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูง (thermal shock) ในช่วงเริ่มต้นเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนย้ายมาเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิปกติที่ 25 ^{0}ซ จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเป็นเอมบริโอได้ดียิ่งขึ้น แต่อุณหภูมิและระยะเวลาของการกระตุ้นที่เหมาะสมของแต่ละพืชแตกต่างกันไป Bajaj (1990) กล่าวว่าการเลี้ยงละอองเรณูในระยะเริ่มต้นในสภาพอุณหภูมิสูงจะมีผลไปกระตุ้นตำแหน่งที่เกิดการแบ่งเซลล์ในนิวเคลียสของละอองเรณูให้ทำงานเร็วขึ้น Keller and

Armstrong (1983) ศึกษาพบว่าการกระตุ้นละอองเรณู *Brassica oleracea* var. *italica* โดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 35 °ซ ในช่วงเริ่มต้นเป็นระยะเวลา 2 วันก่อนย้ายมาเลี้ยงที่ 25 °ซ จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเอมบริโอเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Keller and Armstong (1978) รายงานว่าละอองเรณูของ *B. napus* สามารถพัฒนาเป็นเอมบริโอได้สูงสุดหากเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 14 วัน ก่อนย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ และในการเลี้ยงอับละอองเรณูกะหล่ำดาวที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นระยะเวลา 1-3 วัน สามารถชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน Ockendon (1984) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของกะหล่ำดอกที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตามด้วย 30 °ซ เป็นระยะเวลา 1 วัน ก่อนย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติมีความเหมาะสมมากที่สุด ในขณะที่การเลี้ยงที่ 35 °ซ เป็นเวลา 2 วัน ไม่พบการพัฒนาของเอมบริโอเกิดขึ้นเลย Calleberg and Johansson (1993) กล่าวว่าการเลี้ยงละอองเรณูระยะแรกในสภาพอุณหภูมิสูงที่เหมาะสมจะมีบทบาทไปกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอเพิ่มขึ้นแล้วยังพบว่าในมันฝรั่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ของละอองเรณูพัฒนาไปเป็นต้นโดยตรง และอัตราการชักนำให้เป็นต้นสมบูรณ์เพิ่มสูงขึ้น Chuong and Beversdorf (1985) เลี้ยงละอองเรณูของ *B. carinata* Brun ที่อุณหภูมิ 32 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ก่อนย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ พบว่าเอมบริโอที่ได้คุณภาพดีและเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ในขณะเดียวกันเปอร์เซนต์ของการพัฒนาเป็นต้นปกติยังเพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามสภาพการเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำพบว่ามีผลทำให้ละอองเรณูของพืชบางชนิดในสกุล *Brassica* สามารถพัฒนาให้เอมบริโอได้เช่นกัน Swanson *et al.* (1987) พบว่าการปั่นแยกละอองเรณูของ *B. napus* ในสภาพอุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำระยะหนึ่งจะส่งเสริมการพัฒนาของเอมบริโอให้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูง นอกจากนั้นการเลี้ยงอับละอองเรณูของพืชสกุล *Brassica* บางชนิดไว้ในที่มืดก่อนจนกระทั่งอับละอองเรณูพัฒนาเป็นเอมบริโอแล้วจึงย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่มีแสง สามารถกระตุ้นให้เอมบริโอพัฒนาเป็นเอมบริโอได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Keller, 1984)

การชักนำให้เจริญเป็นต้น

Bajaj (1990) กล่าวว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณูพืชสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่ไม่สามารถชักนำให้เอมบริโอพัฒนาไปเป็นต้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาสูตรอาหารใหม่เพื่อให้เหมาะสมต่อการชักนำให้เอมบริโอเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ โดยทั่วไปนิยมดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงละอองเรณู แต่ปรับปริมาณน้ำตาลให้ลดลง หรือยกเว้นเติมสารเร่งการเจริญเติบโตหรือกรดอะมิโนบางชนิด Keller (1984) กล่าวว่าเอมบริโอที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อชักนำให้พัฒนาเป็นต้นนั้น

ควรเป็นเอมบริโอที่เกิดขึ้นใหม่ ไม่อยู่ในอาหารเหลวนานเกินไป การย้ายเอมบริโอไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ต้องระวังไม่ให้แน่นเกินไป สำหรับสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงควรมีอุณหภูมิ 25 ^{0}ซ และให้ได้รับแสงอย่างต่อเนื่องจะสามารถชักนำให้เอมบริโอพัฒนาเป็นต้นได้มากที่สุด

Quazi (1978) รายงานความสำเร็จของการชักนำแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ให้เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรเดิมแต่เปลี่ยนการเติม 2,4-D และ BAP เป็น IBA ที่ระดับ 1.016 มก./ล. และเพิ่ม GA_3 0.3 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 10% หลังจากย้ายมาเลี้ยงบนอาหารดังกล่าว 18 วัน บางแคลลัสพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ ในขณะที่บางแคลลัสเกิดเฉพาะราก Keller (1984) รายงานว่าเอมบริโอของพืชสกุล *Brassica* สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้เพียง 1-10 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใหญ่มีลักษณะผิดปกติ เช่น hypocotyl มีลักษณะบวมและยืด หรือเกิด cotyledon เป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการย้ายเอมบริโอดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติมวิตามินของอาหารสูตร B_5 (Gamborg *et al.*, 1968) แทนวิตามินของอาหารสูตร MS ใช้ $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA แทนการใช้ Fe-EDTA อัตรา 40 มก.ต่อล. ลดปริมาณน้ำตาลให้เหลือเพียง 2% เติมฮอร์โมน BAP, NAA และ IAA ที่ความเข้มข้น $5x10^{-6}$,10^{-7} และ10^{-6} มก./ล. ตามลำดับ และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดปกติได้หลังจากเลี้ยงประมาณ 3 สัปดาห์ ส่วน George and Rao (1982) รายงานว่าสามารถชักนำให้เอมบริโอที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของ *B. juncea* var. TM-4 ที่มีลักษณะผิดปกติ พัฒนาเกิดตายอดเป็นจำนวนมากเมื่อย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 ที่เติม NAA เข้มข้น 2.0 มก./ล. และ BA เข้มข้น 2.0 มก./ล. และสามารถชักนำตายอดดังกล่าวให้เจริญเป็นต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA เข้มข้น 0.2 มก./ล., BA เข้มข้น 2.0 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 2% หลังจากนั้นตัดยอดดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก

การตรวจสอบระดับชุดโครโมโซม (ploidy level)

Kamo and Griesbach (1989) รายงานวิธีการศึกษาความแตกต่างของระดับชุดโครโมโซมของพืช ได้แก่ การตรวจนับจำนวนแท่งโครโมโซมบริเวณปลายราก การนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณเซลล์ปากใบ และการวัดปริมาณของ DNA ที่ย้อมด้วยสี Hoeshse 33258 แล้วตรวจภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ แต่พบว่าการนับจำนวนโครโมโซมเป็นวิธีที่ค่อนข้างแม่นยำ Keller (1984) รายงานวิธีการตรวจสอบต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของพืชในสกุล

Brassica มีหลายวิธี เช่น การนับจำนวนแท่งโครโมโซมของละอองเรณูที่อยู่ในระยะ anaphase I หรือ metaphase II การวัดขนาดดอก หรือการตรวจสอบความเป็นหมัน

Borrino and Powell (1987) รายงานว่าการนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณปากใบ การวัดขนาดความกว้าง ความยาวของเซลล์ปากใบเป็นวิธีการที่ค่อนข้างสะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้ สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างพืช ที่เป็น hapliod diploid และ tetraploid ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของข้าวบาร์เล่ย์ได้เป็นอย่างดี Qin and Rotino (1995) พบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ความกว้าง และยาวของเซลล์ปากใบของต้นพริกที่เป็น haploid มีความแตกต่างจากต้น diploid อย่างชัดเจน Tenkonano *et al.* (1998) การวัดความยาวของอับละอองเรณู และขนาดของละอองเรณูสามารถบ่งบอกความแตกต่างของระดับชุดโครโมโซมของ *Musa* ได้ และยังพบว่าจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ ขนาดและความยาวของอับละอองเรณูมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับชุดโครโมโซม กล่าวคือ ปริมาณและขนาดจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนระดับชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น Chaudhari and Barrow (1975) ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ของฝ้ายที่เป็น haploid มีค่า 10.46± 2.81 เม็ด ส่วนต้นฝ้ายที่เป็น tetraploid มีค่าเฉลี่ย 21.0±3.31 เม็ด อย่างไรก็ตาม Kamo and Griesbach (1984) แนะนำว่าในการตรวจสอบระดับชุดโครโมโซมของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะพืช haploid นั้นมีโอกาสที่จะเกิดความผันแปรของเนื้อเยื่อให้ผิดปกติไป (chimera) ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างต้น haploid กับต้น haploid ที่เกิด chimera โดยวิธีการนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ได้ ดังนั้นการนับจำนวนแท่งโครโมโซมจึงเป็นวิธีการที่ดีกว่า

การสร้างลูกผสมโดยการรวมโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาต์หมายถึงเซลล์พืชที่ผ่านกระบวนการแยกเอาผนังเซลล์ออกและเหลือเฉพาะเซลล์เมมเบรนห่อหุ้มอวัยวะภายในเซลล์ (สมปอง, 2539) จากการที่โปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ห่อหุ้มจึงได้ถูกนำเอามาใช้เป็นเครื่องมือปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง เพื่อให้ได้พืชตามลักษณะที่ต้องการด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น ชักนำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมจากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (somaclonal variation) การสร้างพืชลูกผสม (somatic hybridization) โดยการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) หรือการถ่ายทอดยีนหรือข้อมูลพันธุกรรมอื่น ๆ ผ่านทางโปรโตพลาสต์ (genetic tranformation) (Power and Chapman, 1985)

Vamling and Glimelius (1990) รายงานการใช้เทคนิคการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* เพื่อประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การสร้างพันธุกรรมพืชให้มีความหลากหลาย การสร้างพืชต้านทานต่อโรค แมลง หรือสภาพแวดล้อมต่าง ๆ และการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม เป็นต้น ฯลฯ ดังตัวอย่างของความสำเร็จ เช่น การสร้าง *B. napus* พันธุกรรมใหม่จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *B. campestris* และ *B. oleracea* การคัดเลือกโปรโตพลาสต์ของ *B. napus* ที่ต้านทานต่อสาร atrazine (Chuong *et. al.*, 1988) หรือการผลิต *B. napus* ที่ต้านทานต่อ herbicide (Chorsulfuron) จากการแยกโปรโตพลาสต์ของพืชที่เป็นแฮพพลอยด์ (Swanson *et al.*, 1988)

Wenzel (1973) รายงานความสำเร็จของการแยกโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* เป็นครั้งแรก ต่อมา Kartha *et al.* (1974) สามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากส่วนของ mesophyll ของ *B. napus* จนกระทั่งพัฒนาเป็นแคลลัส และมีแนวโน้มว่าจะสามารถชักนำแคลลัสดังกล่าวให้เกิดเป็นต้นได้ สำหรับเทคนิคที่นำมาใช้ในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* ในระยะแรกส่วนใหญ่นิยมใช้ตามวิธีการของ Quazi (1975) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวไม่สามารถชักนำให้เซลล์พืชชนิดใด ๆ สามารถเจริญเติบโต หรือพัฒนาเป็นแคลลัสได้เลย ในขณะที่ Kik and Zaal (1993) พบว่าวิธีการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Pelletier *et al.* (1983) เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้จากส่วนของ mesophyll สามารถชักนำให้ให้พัฒนาเป็นต้นได้มากที่สุด

ความสำเร็จของการแยกโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สภาพแวดล้อมของพืช อายุ ชนิดของเอ็นไซม์และระยะเวลาการย่อย ปัจจัยดังกล่าวมีผลอย่างมากต่อปริมาณและคุณภาพโปรโตพลาสต์ ซึ่งรวมถึงอัตราความมีชีวิตและการชักนำให้เจริญเป็นต้นภายหลัง พืชต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ (genotype) จะให้ปริมาณและคุณภาพโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน (Power and Chapman, 1985) ส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์มาจากหลายส่วน เช่น ใบ ราก ลำต้น ปลายยอด แคลลัส และเซลล์แขวนลอย แต่ละส่วนมีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ (สมปอง, 2539) แต่ ชิ้นส่วนของพืชสกุล *Brassica* ที่นิยมนำมาแยกโปรโตพลาสต์กันมาก ได้แก่ ใบ (mesophyll cell) ลำต้นอ่อนใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ใบเลี้ยงอ่อน (cotyledon) , stem cortex และเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ตามลำดับ (Earle *et al.*, 1990) ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากส่วนของใบ Vamling and Glimelius (1990) รายงานว่ามีโอกาสพัฒนาเจริญไปเป็นต้นได้มากที่สุด รองลงมาคือ โปรโตพลาสต์ที่แยกจากลำต้น

อ่อนใต้ใบเลี้ยงซึ่งมีโอกาสพัฒนาไปเป็นต้นสูงได้เช่นกันหากต้นพืชที่นำมาแยกปลูกเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และควบคุมสภาพแวดล้อม Jourdan and Earle (1985) รายงานการเกิด embrogenesis จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *B. oleracea* ที่แยกจากส่วนของ mesophyll ในขณะที่ Thomas *et al.* (1976) สามารถชักนำโปรโตพลาสต์ของ *B. napus* ที่แยกจากส่วนของลำต้นอ่อนใต้ใบเลี้ยงพัฒนาจนกระทั่งเป็นต้นสมบูรณ์ นอกจากนั้น Simmonds *et al.* (1991) สามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *B. napus* ที่แยกจาก cell suspension ให้พัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ได้เช่นเดียวกัน

สภาพแวดล้อมการเจริญเติบโตของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อความสามารถในการพัฒนาให้เจริญไปเป็นต้นสมบูรณ์ ต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพควบคุมอุณหภูมิ และแสง จะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่มีความสมบูรณ์ และมีโอกาสพัฒนาไปเป็นต้นมากกว่าต้นพืชที่ปลูกในสภาพแปลงภายนอกหรือภายในโรงเรือน (Chuong *et al.*, 1985) นอกจากนั้นอายุของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลอย่างมากโดยเฉพาะในแง่ของปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้ พืชที่มีอายุน้อยหรือกำลังอยู่ระหว่างการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ดีมากกว่าพืชที่มีอายุมาก (ประสาทพร, 2541) โดยช่วงการเจริญของพืชสกุล *Brassica* ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากส่วนใบนั้น ควรมีอายุหลังจากย้ายมาเลี้ยงในอาหาร 1 เดือน ในกรณีแยกโปรโตพลาสต์จากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ต้นกล้าควรมีอายุ 8-12 วัน จะเกิดการพัฒนาได้ดีที่สุด (Parihar *et al.*, 1995)

ประศาสตร์ (2536) กล่าวว่าการแยกโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การย่อย middle lamella ซึ่งเป็นสารจำพวก pectin ทำหน้าที่เชื่อมแต่ละเซลล์ให้ติดกันโดยการใช้เอ็นไซม์ pectinase หลังจากนั้นจะย่อยผนังเซลล์ซึ่งเป็นสารจำพวก cellulose และ hemicellulose ด้วยเอ็นไซม์ cellulase และ hemicellulase อีกครั้ง อารีย์ (2541) รายงานว่ากลุ่มของเอ็นไซม์ pectinase ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ pectolyase Y-23, macerase และ macerozyme R-10 ส่วนกลุ่มเอ็นไซม์ cellulase ที่นิยมใช้ เช่น cellulase omozuka RS และ R10, cellulysin, driselase และ meicelase นอกจากนี้ยังมีเอ็นไซม์อีกกลุ่มหนึ่งคือ hemicellulase เช่น rhozyme HP 150 ชนิดของเอ็นไซม์ ความเข้มข้น และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ รวมถึงการชักนำให้เกิดเป็นต้นปกติ การแยกโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Brassica* มีรายงานการใช้ชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์แตกต่างกันไป Kik *et al.* (1993) ทดลองแยกโปรโตพลาสต์ของ *B. oleracea* var. *botrytis* และ *B. oleracea* var. *gemmifera* จากใบอ่อนโดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ซึ่งประกอบด้วย cellualse R-10 1.0%, pectolyase Y-23 0.1%, mannitol 10%

$CaCl_2.2H_2O$ 6 mM และ $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.7 mM นอกจากนั้น Pua (1993) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนจากใบเลี้ยง ลำต้นอ่อนใต้ใบเลี้ยง ใบ และลำต้นโดยการใช้สารละลายเอ็นไซม์ cellualse R-10 0.5%, macerozyme R-10 0.2%, $CaCl_2.2H_2O$ 1,500 mg/l และ mannitol 0.5 M ในขณะที่ Zhao *et al.*, (1995) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากส่วนลำต้นอ่อนใต้ใบเลี้ยงของ *B. napus, B. campestris* และ *B. oleracea* โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka RS 1%(Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltd. Tokyo, Japan), pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co.,Ltd., Tokyo, Japan), hemicellulase 0.01% (Sigma Chemical Co., USA) และ macerozyme R-10 0.05% ในอาหารสูตร K_3 pH 5.7 ส่วน ศิริวรรณ และคณะ (2537) ได้ทำการแยกโปรโตพลาสต์ของผักกาดขาวปลีและคะน้าได้โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ซึ่งประกอบด้วย cellulase onozuka RS 1%, macerozyme R-10 0.2%, pectolylase Y-23 0.1%, $CaCl_2.H_2O$ 20 Mm., mannitol 0.5 mol pH 5.7 หลังจากเลี้ยง 2 เดือน พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนีขนาดเล็ก ส่วน Yang *et al.* (1994) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์ของกะหล่ำดอก (*B. oleracea* var. *botrytis*) โดยใช้สารละลายเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka R-10 2 %, cellulase RS 1% และ macerozyme R-10 ในอาหาร CPW18S โดยพบว่าความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ได้มีจำนวน 2-4 x 10^6 ต่อมล.

การรวมโปรโตพลาสต์เป็นการผสมพันธุ์พืชวิธีหนึ่งซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งในกรณีที่การผสมพันธุ์โดยใช้เพศไม่อาจกระทำได้ หรือเกิด sexual incompatibility การรวมโปรโตพลาสต์สามารถทำได้โดยตรงไม่มีสิ่งขวางกั้น ดังนั้นจึงเปิดโอกาสให้สามารถผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุล (Interspecific hybrid) ซึ่งไม่สามารถกระทำได้ง่ายในวิธีผสมพันธุ์แบบปกติ (รังสฤษดิ์, 2540) การรวมโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ การแยกโปรโตพลาสต์ การรวมโปรโตพลาสต์ การคัดเลือกโปรโตพลาสต์ลูกผสมและการชักนำให้เป็นต้นสมบูรณ์ และการตรวจสอบต้นใหม่ การรวมโปรโตพลาสต์มีหลายวิธีการ เช่น การรวมโปรโตพลาสต์โดยวิธีปกติ ใช้สาร Polyethylene Glycol (PEG) การใช้ high pH/Ca^{+2} การใช้ PEG ร่วมกับ pH/Ca^{+2} และการใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น (Power and Chapman, 1985) สำหรับพืชสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่รวมโปรโตพลาสต์โดยการใช้สาร Polyethylene Glycol (PEG) ตามวิธีการของ Sundberg and Glimelius (1986) อย่างไรก็ตามการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้าเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดเวลา ลดปัญหาการปนเปื้อนและความเป็นพิษของสารเคมี และโปรโตพลาสต์รวมกันได้ค่อนข้างมีประสิทธิภาพทำให้เกิดการสูญเสียน้อยกว่าการใช้สารเคมี (ประสาทพร, 2541)

รังสฤษดิ์ (2541) ; อรดี (2541) และ Zimmermann (1981) กล่าวว่าการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrofusion) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. การใช้สนามไฟฟ้าในความต่างศักย์ที่ต่ำ และให้กระแสไฟฟ้าสลับ(AC) กระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวชิดในแนวเดียวกันในลักษณะเส้นตรงคล้าย pearl chain หลังจากใส่โปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิดลงใน fusion chamber ความต่างศักย์ของสนามไฟฟ้าที่สามารถกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวในแนวเดียวกันและอยู่ชิดกันมีค่าอยู่ระหว่าง 1-10 KV/cm และความถี่ของไฟฟ้ากระแสสลับที่ใช้อยู่ในช่วง 0.5-1.5 MHz แต่ทั้งนี้จะขึ้นกับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้และความสามารถการนำไฟฟ้าของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง Bates (1989) กล่าวว่าความถี่ของไฟฟ้ากระแสสลับ ที่ทำให้เกิดการเรียงตัวกันเป็นเส้นตรงของโปรโตพลาสต์อยู่ในช่วง 0.5-1.0 MHz ส่วนความต่างศักย์ที่ใช้ขึ้นอยู่กับระยะห่างของ electrode สำหรับค่าความต่างศักย์ของสนามไฟฟ้าที่มีผลกระตุ้นให้เกิดการเรียงตัวกันควรมีค่าอยู่ระหว่าง 100-200 V/cm นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ไฟฟ้ากระแสสลับในปริมาณ 150 V/cm แก่โปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 5×10^5-10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมล. จะทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการรวมกันได้มากที่สุด

2. การยิงอนุภาคอิเล็กตรอนทะลุผ่านโปรโตพลาสต์ที่เรียงชิดกันโดยการให้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ในความต่างศักย์ที่สูงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ (10-100 ไมโครวินาที) ซึ่งจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรนที่ติดกันฉีกขาดชั่วขณะ โปรโตพลาสต์ไหลเข้าไปรวมกัน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เชื่อมติดกันอีกครั้งเกิดเป็นเซลล์ใหม่

Matsumoto (1994) ทดลองรวมโปรโตพลาสต์จากใบผักกาดหอม *Lettuca sativa* และ *Lettuca virosa* ใช้ความหนาแน่น 5×10^5 ต่อมล. โดยใช้เครื่องรวมโปรโตพลาสต์รุ่น SSH-1 พบว่าการให้ไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 1 MHz และค่าความต่างศักย์ของไฟฟ้า 100 V/cm เป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นให้ไฟฟ้ากระแสตรง 1.5-2 kV/cm สามารถชักนำให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด Jarl *et al.* (1995) รายงานการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างแตงกวาและแตงเมลอนโดยใช้ fusion medium ซึ่งประกอบด้วย mannitol 0.5 M, $CaCl_2.2H_2O$ 1 mM และใช้ปริมาณโปรโตพลาสต์ 8×10^5 ต่อมล. ใช้ความถี่ของกระแสไฟ 1 MHz. เพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวในแนวเดียวกันและให้ความต่างศักย์ 60-100 V/cm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงที่ความต่างศักย์ 750 V/cm เป็นเวลา 500 μs เพื่อให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์

นอกจากนี้ Phansiri *et al.* (1994) รายงานการรวมโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองกับผักกาดหอมโดยใช้ปริมาณโปรโตพลาสต์ 4 x 10^5 ต่อมล. และให้กระแสไฟสลับที่ความถี่ 1 MHz และค่าความต่างศักย์ของสนาม 200 V/cm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงให้ไฟฟ้ากระแสตรง 1,600 V/cm เป็นเวลา 50 μs โดยมีระยะห่างระหว่าง electrode 0.2 ซม.

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ สภาพแวดล้อมระหว่างการเพาะเลี้ยง และอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด (Simmon *et al.*, 1991) โดยทั่วไปปริมาณโปรโตพลาสต์ที่นิยมเลี้ยงในอาหารควรอยู่ระหว่าง 5 x 10^2-1 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมล. (Blackhall *et al.*, 1994) แต่สำหรับพืชสกุล *Brassica* Vamling and Glimelius (1990) กล่าวว่าควรอยู่ระหว่าง 2.5-5.0 x 10^4 ต่อมล. หรือมากกว่านี้หากโปรโตพลาสต์นั้นแยกจากส่วนของ mesophyll Kik and Zaal (1993) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *B. oleracea* โดยใช้ความหนาแน่น 5 x 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมล. ในขณะที่ Jarl *et al.* (1995) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาตส์ลูกผสมระหว่างแตงกวาญี่ปุ่นและแตงเมลอนโดยใช้ความหนาแน่น 8 x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมล. Takebe and Nagata (1984) กล่าวว่าความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ หากหนาแน่นมากเกินไปมีผลทำให้การพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ต่ำ

อาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์สามารถเลี้ยงได้ทั้งบนอาหารแข็งและอาหารเหลว แต่ที่นิยมมากที่สุดคือการเลี้ยงในอาหารเหลว เพราะสามารถปรับเปลี่ยนอาหารให้เหมาะสมกับระยะการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าอาหารแข็ง (อารีย์, 2541) นอกจากนี้ยังพบว่าระบบการแลกเปลี่ยนสารประกอบระหว่างภายนอกและภายในโปรโตพลาสต์ในช่วงที่ผนังเซลล์ยังไม่สมบูรณ์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง (ประสาทพร, 2541) ในการเปรียบเทียบการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกะหล่ำดอกในอาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร K8P ที่เติม NAA เข้มข้น 1.0 มก./ล., 2,4-D เข้มข้น 0.2 มก./ล. และ BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ในความหนาแน่น 3-50 X 10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมล. พบว่าโปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเลี้ยง 2-3 วัน แต่เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นสูงสุดหลังจากเพาะเลี้ยง 5 วัน และพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เป็นสีน้ำตาล และเกาะติดกัน ส่วนการเลี้ยงบนอาหารแข็งพบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยง 3-4 วัน ซึ่งช้ากว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว 1-2 วัน โดยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นสูงสุดในวันที่ 6-8 แต่พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่แบ่งตัวและพัฒนาอย่างต่อเนื่องดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว (Yang *et al.*, 1994)

ประสาทพร (2541) รายงานว่าอาหารที่เลี้ยงโปรโตพลาสต์จำเป็นต้องใส่สารเพื่อช่วยปรับสภาพแรงดันออสโมติก และที่นิยมใช้ ได้แก่ น้ำตาล mannitol หรือ sorbitol ซึ่งมีข้อดีคือ ช่วยทำให้ให้โปรโตพลาสต์เกิดความสมดุลย์ และไม่ชะงักการเจริญเติบโตในช่วงของการเปลี่ยนอาหาร โดยเฉพาะเริ่มแรกของการเลี้ยง แต่หลังจากสร้างผนังเซลล์สามารถลดแรงดันออสโมติกของอาหารลงได้โดยการเจือจางอาหารเก่าด้วยอาหารใหม่ในอัตราส่วนที่พอเหมาะในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ Jarl *et al.* (1995) ทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างแตงกวากับแตงเมลอนในอาหารที่เติม mannitol 0.5 M ในช่วง 3 วันแรก แต่เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์แล้ว จึงค่อยๆ ลดระดับความเข้มข้นของ mannitol ในอาหารลงเหลือ 0.25 M ซึ่งพบว่าเซลล์ยังคงแบ่งตัวอย่างต่อเนื่อง

อาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* มีหลายชนิด ทั้งนี้อาหารแต่ละชนิดจะถูกดัดแปลงองค์ประกอบเพื่อให้เหมาะสมกับแต่ละพืช ซึ่ง Vamling and Glimelius (1990) กล่าวว่าสูตรอาหารที่นิยมนำมาดัดแปลงกันอย่างแพร่หลายสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชสกุล *Brassica* คือ อาหารสูตร KM8P (Glimelius *et al.*, 1986) ส่วน Zhao *et al.* (1995) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ของ *B. napus*, *B. campestris* และ *B. oleracea* ส่วนใหญ่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร K8P (Kao and Michayluk,1975), MS (Murashige and Skoog, 1962), B (Pellitier *et al.*, 1983) และ NN (Nitsch and Nitsch, 1969) เช่นเดียวกันกับ Parihar *et al.* (1995) พบว่าอาหารสูตร KM (Kao and Michayluk, 1980) มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *B. napus* โดยพบว่ามีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น 30-35 % เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร B_5 (Gamborg *et al.*, 1968) และ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลกลูโครส 0.4 M, 2,4-D เข้มข้น 0.5 มก./ล., BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 1.0 มก./ล. pH 5.8

ฮอร์โมนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารซึ่งมีผลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ (Zhao *et al.*, 1995) กลุ่มของฮอร์โมนที่สำคัญต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ได้แก่ auxin และ cytokinin โดยเฉพาะอย่างยิ่ง auxin ซึ่งมีความจำเป็นต้องใช้ในปริมาณสูงในช่วง 2-3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นความต้องการ auxin เริ่มลดลงแต่ต้องการ cytokinin เพิ่มขึ้น (Vamling and Glimelius, 1990) ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *B. nigra* ในช่วงแรก 7-10 วัน ในอาหารสูตร Kao ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก./ล., NAA เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ zeatin riboside เข้มข้น 0.5 มก./ล. ก่อนย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ BAP

เข้มข้น 1 มก./ล. และอีก 1 สัปดาห์ต่อมาพบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 62% โดยเป็นกลุ่มแคลลัสขนาดเล็กที่ประกอบด้วยเซลล์ขนาด 8-16 เซลล์ 46% (Narasimhulu *et al.*,1993) ในขณะที่โปรโตพลาสต์ของ *B. napus*, *B. campestris* และ *B. oleracea* Zhao *et al.* (1995) รายงานว่ามีการสร้างผนังเซลล์และเริ่มแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 24-72 ชั่วโมง แต่เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เกิดสูงสุดหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน สามารถมองเห็นกลุ่มแคลลัสขนาดเล็กประมาณ 1 มม. หลังจากเพาะเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ ต่อมาสามารถชักนำให้แคลลัสดังกล่าวพัฒนาไปเป็นยอดเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ Zeatin เข้มข้น 2.0 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}ซ และได้รับแสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้ม 30 mol $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชม. สลับกับไม่ได้รับแสง 8 ชม.ต่อวัน ซึ่งการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ดังกล่าวตั้งแต่แยกจนกระทั่งเป็นต้นสมบูรณ์พร้อมย้ายสู่แปลงปลูกใช้ระยะเวลา 2-3 เดือน ส่วน Vamling and Glimelius (1990) รายงานว่าสามารถชักนำให้แคลลัสของพืชสกุล *Brassica* หลายชนิด เช่น *B. napus*, *B. campestris*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. carinata* และ *B. juncea* ที่มีขนาด 2-5 มม. พัฒนาเกิดยอดเมื่อย้ายมาเลี้ยงบนอาหารที่เพิ่มระดับความเข้มข้นของ cytokinin ให้สูงขึ้น ในขณะเดียวกันค่อย ๆ ปรับความเข้มข้นของ auxin ให้ลดลง หลังจากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดรากต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นยอดได้แตกต่างกัน Pua (1993) รายงานการชักนำกลุ่มแคลลัสที่พัฒนามาจากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนที่มีขนาด 1 มม. พัฒนาไปเป็นยอดบนอาหารสูตร SR ที่ประกอบด้วย NAA เข้มข้น 1.0 มก./ล. และเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA เป็น 2.0 มก./ล. จากนั้นย้ายยอดดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตร R ที่เติม IBA เข้มข้น 0.1 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากหลังจากเลี้ยงประมาณ 10 วัน

Vamling and Glimelius (1990) รายงานว่าขั้นตอนการคัดเลือกลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างพืชสองชนิดค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากหลังการรวมโปรโตพลาสต์ประชากรที่ได้จะประกอบด้วยลูกผสม (fusant) ที่เป็น heterokaryons, homokaryons และโปรโตพลาสต์พ่อและแม่ (non-fusant) Blackhall *et al.* (1994) กล่าวว่าโปรโตพลาสต์ที่เป็นลูกผสมหรือ heterokaryons จะต้องประกอบไปด้วยนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมที่ได้จากพ่อและแม่มารวมกัน Bhojavani and Razdan (1983) กล่าวว่าโดยทั่วไปโปรโตพลาสต์ที่เป็นลูกผสม heterokayons ที่เกิดจากการรวมระหว่างพ่อและแม่มีปริมาณน้อยมากพบเพียง 0.5-1.0%

วิธีการคัดเลือกลูกผสมของโปรโตพลาสต์ 2 วิธีการ ได้แก่ การคัดเลือกด้วยตัวบุคคล (manual selection) และการคัดเลือกโดยการใช้เครื่อง Flow cytometer ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและค่อนข้างเร็ว การคัดเลือกด้วยตัวบุคคลนั้นสามารถใช้ความแตกต่างของโปรโตพลาสต์ (natural marker) ที่มีอยู่แล้วในพืช เช่น เซลล์ที่มาจาก mesophyll จะมีสีเขียว ในขณะที่เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจะมีสีอ่อนกว่า นอกจากนี้การใช้เทคนิคการย้อมสีโปรโตพลาสต์เพื่อทำให้เกิดความแตกต่างกัน หลังจากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดแยก fusant ออกมาเลี้ยง เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ค่อนข้างได้ผล แต่วิธีการดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยาก (Blackhall *et al.*, 1994 ; Vamling and Glimelius, 1990) อย่างไรก็ตาม Sidorov *et al.* (1981) รายงานการคัดแยกลูกผสมโดยการใช้ลักษณะ plastome chlorophyll และใช้โปรโตพลาสต์จาก *Nicotiana pumbaginifolia* เป็นพันธุ์ที่ให้ chloroplast

การเลี้ยงโปรโตพลาสต์รวมกันเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีของแต่ละ fusant จากนั้นสังเกตลักษณะที่แตกต่างไประหว่างการเจริญของแต่ละโคโลนี สามารถนำมาใช้คัดเลือกลูกผสมได้เช่นกันและอาจพบว่ากลุ่มโคโลนีที่เป็น heterokaryons มีโอกาสแสดงลักษณะเด่น (heterosis) ออกมา เช่น โคโลนีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งผิดไปจาก homokaryons หรือโปรโตพลาสต์พ่อหรือแม่ และหลังจากแต่ละ fusant เจริญเป็นต้นสมบูรณ์แล้ว สามารถตรวจสอบลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นพ่อแม่ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ค่อนข้างมีความแปรปรวนสูง (Blackhall *et al.*, 1994) นอกจากนั้นยังมีวิธีการคัดเลือกอื่นๆ เช่น Vamling and Glimelius (1990) รายงานการสร้าง selection marker เช่น การใส่ยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวินะให้แก่โปรโตพลาสต์พ่อแม่ หรือ Carlson *et al.* (1972) รายงานการคัดเลือกลูกผสมของยาสูบ 2 พันธุ์ โดยการทดสอบความต้องการ auxin ซึ่งพบว่าในอาหารที่ไม่เติม auxin โปรโตพลาสต์ลูกผสมสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ