183628

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Anubias nana* Engler ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มี BA และ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า BA 8 ไมโครโมลาร์ ให้ผลดีที่สุด เมื่อเลี้ยง 6 สัปดาห์ มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้น 6.80 ± 0.79 ยอด และเกิดราก 2.90 ± 1.37 ราก เมื่อนำออกปลูกในระบบไร้ดินเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดี มีน้ำหนัก 7.34 ± 1.29 กรัม ความสูง 7.91 ± 1.79 ซม. จำนวนใบเฉลี่ย 12.53±2.52 ใบ และมีอัตรารอด 86%

การนำต้นอ่อนปลอดเชื้อของ *A. nana* และ *A. congensis* N.E. Brawn ไปฉายรังสีแกมมา 0-120 เกรย์ พบว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้ *A. nana* และ *A. congensis* เกิดการกลายพันธุ์ (GR_{50}) เท่ากับ 34.56 เกรย์ และ 28.30 เกรย์ ตามลำดับ รังสี มีผลให้ความสูง จำนวนยอดและจำนวนรากลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เกิดการกลายได้ต้นที่มีลักษณะเตี้ยลง หรือต้นแคระ ขนาดของใบ รูปร่างใบ และสีใบเปลี่ยนแปลงได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแปลกใหม่ สวยงาม มีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อนำออกปลูกในเรือนเพาะชำ จำนวน 5 สายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์กลายออกจากพันธุ์ปกติได้โดยใช้ AFLP marker

การแยกโปรโตพลาสต์ของ *A. nana* และ *Cryptocoryne wendtii* De Wit โดยศึกษาเซนิดและปริมาณเอนไซม์ ระดับแมนนิทอล ระยะเวลาบ่ม อายุพืช และระดับน้ำตาลซูโครส พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ของ *A. nana* จากใบอ่อนอายุ 6 สัปดาห์ ด้วยเอ็นไซม์ Cellulase RS 2 % Pectolyase Y-23 0.2 % Mannitol 0.6 โมลาร์ $CaCl_2.2H_2O$ 2.5 มิลลิโมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ บ่ม 4 ชั่วโมง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยซูโครส 18% ได้จำนวน $4.79\pm0.48\times10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด มีชีวิต 82.90±4.31% และสามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ของ *C. wendtii* ด้วยเอนไซม์ Cellulase R-10 2 % Pectolyase Y-23 0.2 % Mannitol 0.5 โมลาร์ $CaCl_2.2H_2O$ 2.5 มิลลิโมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ บ่ม 4 ชั่วโมง ทำให้บริสุทธิ์ด้วยซูโครส 16% ได้จำนวน $1.04\pm0.06\times10^7$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด มีชีวิต 90.79±4.80 % เมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ *A. nana* และ *C. wendtii* ในอาหารกึ่งแข็งสูตร KM8P และ MS ตามลำดับ พบว่าเกิดกลุ่มเซลล์ภายใน 30 วัน การรวมโปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิดด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 90 โวลต์/ซม. 30 วินาที ไฟฟ้ากระแสตรง 1100 โวลต์/ซม. 40 ไมโครวินาที 2 pulses เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ 22.44±5.35% ได้ลูกผสมต่างสกุล 5.20±0.97% มีชีวิต 79.40±1.92% นำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 10 วัน มีอัตราแบ่งเซลล์ 6.89±2.05% และอัตรารอด 19.75±2.87%

Aquatic plant *Anubias nana* Engler was cultured on semi-solid MS medium supplemented with 8 μM BA. The maximum shoot proliferation (6.80±0.79 shoots/pieces) was obtained after 6 weeks of culture. The plantlets were transplanted to a greenhouse and cultured in hydroponic system. High quality plants were produced within 90 days with average weight of 7.34±1.29 g, height of 7.91±0.79 cm and 86 % survival rate.

The suitable gamma ray dose (GR_{30}) for induced mutation of *A. nana* was 34.56 grays and for *Anubias congensis* N.E. Brawn was 28.30 grays. The gamma ray significantly decreased height and number of shoots and roots ($p<0.05$) of plants. Abnormal appearances were observed, i.e. dwarf plants, change of leaf shape and color. After transplantation to the greenhouse, there were 5 mutated plants exhibiting good growth. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers could identify mutated plants from normal plants.

For the protoplast fusion experiments, protoplasts were successfully isolated from the *in vitro* plantlet leaves of *A. nana* and *Cryptocoryne wendtii* De Wit. Purified protoplasts of *A. nana* were cultured on KM8P medium while those of *C. wendtii* were cultured on MS medium by agarose bead with thin layer liquid culture. Micro-colonies were formed within 30 days. Protoplasts of *A. nana* × *C. wendtii* were electrofused at a density of 5×10^5 protoplasts/ml using an alternating current (AC field) of 90 V/cm for 30 s followed by 2 pulses of 1100 V/cm direct current (DC) field and 40 μs duration. The intergeneric hybridization produced 5.20±0.97 % heterokaryons with 79.40±1.92 % viability. The heterokaryons were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg/l (2,4 D), 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l zeatin by agarose bead with thin layer liquid culture method. The plating efficiency of 6.89±2.05% and viability of 19.75±2.87% were observed after 10 days' culture.