สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ได้รับงบประมาณประจำปี 2540

ชื่อโครงการวิจัย ศึกษาการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดโดยจากเซลล์แขวนลอย

Studies on Isolation and Protoplast Culture of corn (*Zea may* L.) by Cell Suspension Culture

T034692

เจ้าของโครงการวิจัย

อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QK
725
ล/995
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 34692
วัน, เดือน, ปี 19 พ.ย. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอข้าวโพดพันธุ์ สุวรรณ 3 พบว่าอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ R_2 ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส 2 เปอร์เซนต์ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เซลล์แขวนลอยที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่และแยกโปรพลาสต์

ศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลว โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 6-14 เซลล์แขวนลอยมีรูปร่างยาวรี และเมื่อย้อมด้วยสี fluorescein diacetate พบว่าเซลล์ยังมีชีวิต เป็นช่วงที่เหมาะสำหรับการเปลี่ยนอาหารใหม่ การแยกโปรโตพลาสต์ และการชักนำให้กลายเป็นต้นใหม่

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนส เป็น 1.5:0.5 ที่เวลา 6 ชั่วโมงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ เพื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NBR ซึ่งปรากฏว่าโปรโตพลาสต์มีการแบ่งตัวและสร้างผนังเซลล์

Abstract

Embryos of Suwan 3 were cultured on N_6 medium supplement of 2,4-D 2 mg/l NAA 1 mg/l BA 1 mg/l and Kinetin 1 mg/l suitable to used for callus initiation from immature embryos.

Suspension culture in N_6 medium containing 2,4-D 2 mg/l NAA 1 mg/l and N_6 medium containing maltose 2% 2,4-D 2 mg/l present cell suspension which suitable for plantlet regeneration and for protoplast isolation.

Growth curve were determined by fresh and dry weight measurements of suspension culture. The results showed that the expertential log phase of the suspension culture at 6-14 days. These suspension culture have ellipse shapes and still viable after fluoresce diacitate staining. The suspension culture in optimal transfer period at 6-14 days which was suitable for subculture, protoplast isolation and regeneration.

Condition was developed for isolated protoplasts from cell suspension . The enzyme ratio between cellulase and pectinase 1.5:0.5 and mannitol 0.6 M at digestion period 6 hours was the suitable condition for protoplast isolated .

Protoplast from cell suspension were cultured in NBR medium. Cell wall was completely divided within 1-2 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลก รองจากข้าวสาลีและข้าว ข้าวโพดมีคุณค่าทางอาหารสูง จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อาหารสัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ จากความสำคัญดังกล่าว จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีคุณภาพดี ผลผลิตสูงขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อม และต้านทานต่อโรค โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดซึ่งจะช่วยลดปัญหาต่าง ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะตามต้องการลงไปได้เป็นอย่างมาก ทั้งด้านเวลา แรงงาน ทุนทรัพย์ และข้อจำกัดในการผสมพันธุ์อื่นๆ สำหรับส่วนต่างๆ ของข้าวโพดที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ เอนโดสเปิร์ม ข้อ ปลายราก ละอองเรณู เอมบริโอ อับเรณู เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติของโปรโตพลาสต์ พบว่ามีความสำคัญเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การรวมกันของโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีตามต้องการ การศึกษาทางด้านชีวเคมี การศึกษาการสร้างผนังเซลล์ และการย้ายสารพันธุกรรม เข้าไปในโปรโตพลาสต์ โดยการใช้วิธีทางไฟฟ้าเช่น อิเลคโตรฟอเรชัน โซมาติกไฮบริไดเซอร์ หรือใช้สารเคมี PEG ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงเทคนิคขั้นพื้นฐานต่าง ๆ และวิธีเกี่ยวกับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดก่อนที่จะศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของคัพภะเป็นแคลลัสของข้าวโพด
2 ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด
3 หากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด
4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวโพดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Gramineae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea may* L. มีระบบรากแบบรากฝอย ลำต้นสูงประมาณ 30 ซม. ถึง 7.5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 2.5-5 ซม. ลำต้นมีลักษณะเป็นข้อปล้อง ปล้องที่อยู่ส่วนโคนของลำต้นมีขนาดสั้นกว่าปล้องที่อยู่ถัดไป ฐานของปล้องทุกปล้อง ยกเว้นปล้องสุดท้ายมีตาอยู่ 1 ตา ตาที่อยู่ใกล้ดินเจริญเป็นหน่อส่วนตาที่อยู่เหนือดินเจริญเป็นฝัก

ใบประกอบด้วยกาบใบทำหน้าที่หุ้มตาและลำต้น ใบเป็นแผ่นเรียวยาวประมาณ 80 ซม. มีเยื่อกันน้ำเป็นแผ่นบางอยู่ตรงรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ หูใบเกิดที่ฐานของใบทั้งสองข้าง ข้าวโพดเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้เกิดจากตายอดของลำต้น ส่วนช่อดอกตัวเมียหรือฝักเกิดจากตาบริเวณซอกใบประมาณข้อที่เจ็ดนับจากใบธงลงมา ตามซอกใบมี prophyllum หุ้มอยู่ prophyllum ต่างจากใบธรรมดาคือมีเส้น 2 เส้น ตาที่เจริญเป็นฝักเมื่อยังอ่อนอยู่เหมือนตาที่เจริญเป็นแขนง แต่ต่อมา prophyllum ของตาฝักจะเจริญต่อไปและเจริญเป็นฝักอ่อน สำหรับก้านฝักจะไม่ยืดตัวทำให้ใบที่เกิดขึ้นมีแต่ก้านใบกลายเป็นเปลือกหุ้มฝัก (กรมวิชาการเกษตร , 2524)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Green and Philip (1975) ใช้คัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ A-188 สามารถชักนำให้เป็นแคลลัส และชักนำต่อให้เป็นต้นข้าวโพดได้สำเร็จเป็นครั้งแรก Armstrong and Green (1985) กับ Duncan and Widholm (1987) รายงานว่า L-proline มีผลต่อการเลี้ยงและการเจริญเติบโตเป็นต้นข้าวโพด Duncan และคณะ (1985) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตรที่ได้จากการเลี้ยงคัพภะอ่อนและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Potrykus และคณะ (1977) แยกโปรโตพลาสต์ออกจากส่วนของลำต้นบริเวณข้อ และปล้องของข้าวโพดพันธุ์แท้ 2717 โดยใช้เอนไซม์ Cellulase Onzuka R10 นำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร P2 ดัดแปลงแบบ microdrop array (MDA) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

กอบเกียรติ (2532) ได้ทดลองเลี้ยงคัพภะข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 บนอาหารสูตร MS (1962) พบว่าเมื่อใช้ 2,4-D 9.048 ไมโครโมล น้ำตาลซูโครส 2-4 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในสภาพมืดตลอดเวลาสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีจากรายงานของ Green and Philip (1975) พบว่าคัพภะข้าวโพดอายุ 16-20 วัน หลังถ่ายละอองเรณูสามารถชักนำให้ส่วน เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 9.048 ไมโครโมล ไกลซีน 7.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เอสพาราจีน 1.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนอาซีน 1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไพริดอกซิน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมแพนโททีเนต 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Vasil และคณะ (1983;1984)ได้ทดลองเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2.262-4.524 ไมโครโมล น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ส่วนของ mesocotyl เกิดแคลลัสได้และเมื่อย้ายลงบนอาหารที่มี 2,4-D 4.524 ไมโครโมล เคซีนไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือย้ายลงบนอาหารที่ปราศจาก 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Goble และคณะ(1986) พบว่าคัพภะข้าวโพดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D 2.262 ไมโครโมล น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

Imbrie - Milligan และคณะ (1987) รายงานว่าองค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี 2,4-D 9.048 ไมโครโมล มายโออินโนซิตอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารสูตร N_6 ที่มี 2,4-D 4.524 ไมโครโมล เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับข้าวโพดสายพันธุ์ A188 (Kamo และคณะ,1987)

Imbrie - Milligan และ Hodes (1986) และ Imbrie - Milligan และคณะ (1987) แยกโปรโตพลาสต์จาก embryogenic callus ซึ่งได้มาจากการเพาะเลี้ยง immature embryo ของข้าวโพดพันธุ์ inbred A188 ในอาหารที่ประกอบด้วย เคซีนไฮโดรไลเซต น้ำมะพร้าว กรดอะมิโน น้ำตาล phytohormones ไนเตรต แคลเซียม และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยนำแคลลัสมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ นำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร NN67 ดัดแปลง โดยวิธีชั้นเซลล์พี่เลี้ยง (feeder layer) และเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cell) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

Saleem และ Cutler (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากส่วนของใบข้าวโพดพันธุ์ Market Beauty ที่มีอายุประมาณ 10-15 วัน โดยนำต้นมาไว้ในที่มืด 24-30 ชั่วโมง ก่อนนำใบมาย่อย ฟอกฆ่าเชื้อใบด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 นาที ชั่งใบหนักประมาณ 0.2 กรัม นำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพาะเลี้ยงอาหารสูตร Kao ร่วมกับ 0.25 มิลลิลิตร n-propyl gallate จะมีการสร้างผนังเซลล์ และโปรโตพลาสต์จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 2-3 สัปดาห์

Vasil และ Vasil (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ Dekalb XL 82 โดยนำเซลล์แขวนลอยมาย่อยด้วยสารละลาย เอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 3 เปอร์เซ็นต์ และ pectinase serva 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 7 mM $CaCl_2\,2H_2O$, 0.7 mM $NaH_2PO_4.H_2O$, 0.5 M manital และ 3 mM MES ที่ pH 5-6 จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1\text{-}3x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM ดัดแปลงในที่มืด สามารถชักนำให้เกิดเป็นโซมาติกเอมบริโอได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kamo และคณะ (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์ A 188x Black Mexican Sweet โดยนำเซลล์แขวนลอยมา 3-4 กรัมของน้ำหนักสด มาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิตร ที่ประกอบด้วย MS basal salts ไทอามีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร mannital 0.2 M 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร $CaCl_2.2H_2O$ 80 mM cellulase 2 เปอร์เซ็นต์ pectinase 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร PCM (protoplast culture medium) โดยวิธีชั้นเซลล์พี่เลี้ยง และย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และสูตร N_6 สามารถชักนำให้เกิดเป็นโซมาติกเอมบริโอได้

Sun และคณะ (1989) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม Supersweet (sh2sh2) โดยนำเซลล์แขวนลอยมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส และเพคโตไลเอส ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ นำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 1-3x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6P หรือ N_6K โดยวิธีชั้นเซลล์พี่เลี้ยง จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร D19 โดยวิธีมีเซลล์พี่เลี้ยง และไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PRM1 และสูตร PRM2 สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร GR-1 จะได้ต้นที่มีระบบรากที่สมบูรณ์

Parker และคณะ (1990) ได้นำแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย แอล-เอสพาราจีน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์แขวนลอยถูกทำให้เจือจาง 1:20 ในอาหารใหม่ศึกษาการเจริญในช่วง 7 วัน พบว่า lag phase ประมาณ 3 วัน log phase ประมาณ 6-7 วัน จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยไปทดสอบความต้านทานกับสาร sethoxydim

Kathleem D' H และคณะ (1992) ได้ทำการถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pDE 108 ในข้าวโพดพันธุ์ H99 และ Pa91 เริ่มจากการเพาะเลี้ยงคัพภะในที่มืดที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในอาหาร N_6 (Chu และคณะ, 1975) ที่ประกอบด้วย เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 6 มิลลิโมล 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MeS) 0.5 กรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ไฟทาเจล 1.6 กรัมต่อลิตรและเสริมด้วย $MgCl_2$ 0.75 กรัมต่อลิตร pH 5.8 พบว่ารุ่นลูกจะได้รับยีนต้านทานกานาไมซิน เป็นไปตามกฎของเมนเดลและแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วจึงคัดเลือกในอาหารที่ประกอบด้วยกานาไมซิน

Sukhapida K. และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากไมโครสปอร์ของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet (BMS) และโปรโตพลาสต์ที่ได้รับพลาสมิด pDAB199 ที่ประกอบด้วยยีน gusA และ nptII พบว่าแคลลัสที่เกิดการถ่ายยีนแล้วจะถูกคัดเลือกในอาหารที่ประกอบด้วยกานาไมซินและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jeanette L. Rasmussen และคณะ (1994) ใช้ Escherichia coli SL131 ที่มียีน B และ C1 เพื่อผลิตแอนโธไซยานิน เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ประกอบด้วยแอมพีซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เป็นไมโครโปรเจคไทล์สำหรับนำ DNA เข้าสู่เซลล์ของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet ซึ่งใช้ฮีเลียมเป็นตัวยิง โดยเตรียมสารละลายแบคทีเรียด้วยฟีนอลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยให้อัตราการถ่ายยีนสูงขึ้น

Brigitte K and Horst Lorz (1995) ได้ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ และเพคติเนส วาย23 0.078 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสมของไมโครสปอร์ของข้าวโพดหลายสายพันธุ์ นำโปรโตพลาสต์ที่ปรับความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 10 กรัม และสามารถชักนำข้าวโพดลูกผสม H99 กับ FR-16-I จากโปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นแคลลัสและชักนำให้เป็นต้นได้

Welter M.E. และคณะ (1995) ศึกษาการพัฒนารูปร่างของคัพภะข้าวโพดไปเป็นแคลลัสชนิด พบว่าคัพภะของข้าวโพดที่พัฒนาไปเป็นแคลลัสชนิด friable ประกอบไปด้วยลักษณะรูปร่างหลายแบบในช่วงต่าง ๆ ระหว่างการเปลี่ยนอาหารจะทำให้ได้แคลลัสที่มีรูปร่างชนิด typeII 3 แบบ ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีรูปร่าง 3 แบบ ได้แก่ pre-embryogenic, early-embryogenic และ late-embryogenic ถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบใช้แสงและแบบส่องกราด จากการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ของการพัฒนาระหว่างรูปร่างทั้ง 3 แบบ และการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ทำให้ทราบว่าลักษณะรูปร่างทั้ง 3 แบบ สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ผ่าน somatic embryogenesis

Marie-Francoise J. และคณะ (1995) ศึกษาความเหมาะสมในการถ่ายทอด DNA และการแสดงออกของ β-glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพดโดยวิธีอิเลคโตรพอเลชั่น พบว่าสามารถการนำ DNA อิสระเข้าไปในไมโครสปอร์ของข้าวโพดลูกผสมโดยวิธีอิเลคโตรพอเลชั่น ซึ่งการเลือกสารละลายสำหรับทำเลคโตรพอเลชั่นพิจารณาจากความสามารถที่ให้การเจริญเป็นต้นใหม่ได้จำนวนมาก การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีเอสถูกยับยั้งโดยการเพิ่ม KNO_3 และ $MgSO_4$ 100 mM ในสารละลายสำหรับทำอิเลคโตรพอเลชั่น การแสดงออก 7 ลักษณะของเวกเตอร์ได้แก่ ยีนรายงานผล Uid A ที่ถูกควบคุมโดยโมซาอิคไวรัสของดอกกะหล่ำ ยีน Lat 52-7 Zmg 13 Emu Ubig-1 Al หรือ ยีนโปรโมเตอร์ Act 1 ใช้ทดสอบความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ β-glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพด ระดับการแสดงออกสูงสุดเมื่อยีน Uid A ถูกขับโดยยีนโปรโมเตอร์ Act 1 ดังนั้นเวกเตอร์ตัวนี้จึงมีการใช้ต่อไปเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ระดับการแสดงออกของ β-glucuronidase สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัสดุและอุปกรณ์ที่จำเป็น:-

1. อุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัย

1.1 เอมบริโอ ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

1.2 สารเคมีต่างๆที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.3 เอนไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยผนังเซลล์ เซลลูเลส และ เพคติเนส

1.4 สีย้อมตรวจสอบโปรโตพลาสต์

1.5 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรอง

1.6 เครื่องแก้วต่างๆ

1.7 อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1.8 โถดูดความชื้น

1.9 ตู้ปลอดเชื้อ

1.10 เครื่องดูดอากาศ

1.11 หม้อนึ่งความดัน

1.12 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

1.13 เครื่องเขย่า

1.14 เครื่องเซนติฟิวส์

1.15 กล้อง fluorescent microscope

1.16 กล้อง inverted microscope

1.17 กล้องถ่ายภาพ

1.18 ตู้อบความร้อน

1.19 สไลด์นับจำนวนเซลล์ (heamacytometer)

1.20 สารควบคุมการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้คัพภะพัฒนาเป็นแคลลัส ของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

1.1 นำฝักข้าวโพดที่มีอายุประมาณ 14 วัน หลังจากถ่ายอับละอองเรณู โดย แช่ฝักข้าวโพดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่เติมคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ทวิน 20 2-3 หยด นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

1.2 ใช้ปลายมีดแคะคัพภะขนาด 1.5 -2 มิลลิเมตร ออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 6 สูตร (ตารางที่ 1) โดยทุกสูตรมีส่วนประกอบของ แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล 0.3 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันตัดยอดอ่อนและรากออกแล้วย้ายแคลลัส ลงบนอาหารแข็งสูตรเดิม

1.4 เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน วัดค่าการเจริญเติบโตของแคลลัสก่อนย้ายลงในอาหารเหลวเพื่อเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอยต่อไป

ฮอร์โมน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	$N_6$1	N_6 2	N_6 3	N_6 4	N_6 5	N_6 6
2,4-D	2	2	2	2	2	2
NAA	0	1	1	1	1	1
Kinetin	0	0	0.25	0.5	0.75	1
BA	0	0	0.25	0.5	0.75	1

ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของคัพภะไปเป็นไมโครแคลลัส

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

1. นำแคลลัสมาใส่ในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยซูโครสและมอลโตส และ R_2 ที่ประกอบด้วยซูโครสและมอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ เตรียมไว้ประมาณ 20 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 125 มิลลิลิตร
2. นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที
3. เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 7 วัน โดยการถ่ายอาหารเก่าออกครึ่งหนึ่ง แล้วเติมอาหารสูตรเดิมลงไปใหม่ประมาณครึ่งหนึ่ง
4. ศึกษาดูการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 3 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

จากการวัดค่าการเจริญเติบโตของแคลลัสก่อนย้ายลงในอาหารพบว่าสูตร N_6 2 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด จึง นำเซลล์แขวนลอยจากสูตร N_6 2 มาศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลา คือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 22 วัน ตามลำดับ โดยการทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละระยะเวลา ทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังนี้

2.1 หาน้ำหนักกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ให้คงที่ โดยนำกระดาษกรองมาใส่ในจานแก้ว แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักของกระดาษกรอง

2.2 นำแผ่นกระดาษกรองวางบนกรวยกรอง ที่วางอยู่บนขวดรูปชมพู่ เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรองโดยใช้เครื่องดูดอากาศช่วย นำกระดาษกรองไปชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

2.3 กรองเซลล์แขวนลอยออก ล้างเซลล์ที่อาจติดค้างอยู่ภายในขวดรูปชมพู่ ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้เครื่องดูดอากาศช่วย ชั่งน้ำหนักเซลล์และกระดาษกรอง บันทึกผล

2.4 นำกระดาษที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง และทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

2.5 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้ง แล้วไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง บันทึกผล

2.6 นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาเขียนกราฟ การเจริญเติบโตของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา

การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต R_2 ที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีการสารควบคุมการเจริญเติบโต N_6 ที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบ โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วยเคซีนไฮโดรไลเซท 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงโดยนำไมโครแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียสที่มีแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ สุวรรณ3

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

5.1. การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย มีขั้นตอนดังนี้

5.1.1. นำเซลล์แขวนลอยมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.8 กรัม

5.1.1. นำสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ กับ เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ คือ 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกับเซลล์แขวนลอยที่บดละเอียด แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อที่จะหาช่วงเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

5.1.2 ทำการนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

5.2 การทดลองที่ 5.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย มีขั้นตอนดังนี้

5.2.1 นำเซลล์แขวนลอยน้ำหนัก 0.8 กรัม

5.1.2.2. นำเซลล์แขวนลอยบดให้ละเอียดแล้วแช่ในสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ 30 นาที

5.2.2. ดูดสารละลาย CPW ออกแล้วใส่สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสกับเพคติเนสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1.5:0.5 1.0:0.5 และ 0.5:0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวางในที่มืดบนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อที่จะหาช่วงเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม

5.2.3. นับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 6 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดน้ำหนัก 0.8 กรัม

2. นำเซลล์แขวนลอยบดให้ละเอียดแล้วแช่ในสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ นาน 30 นาที

3. ดูดสารละลาย CPW ออกแล้วใส่สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนสที่ระดับความเข้มข้น 1.5:0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น แมนนิทอล 0.6 โมลาร์ ปิด จานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม

4. นำไปวางในที่มืดบนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

5. ดูดสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ แยกออกมา กรองผ่านที่กรอง ขนาด 80 ไมโครเมตร ที่บรรจุในหลอดสำหรับนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7นาที

6. ดูดสารละลายเอนไซม์ออก

7. ทำการล้างด้วยสารละลาย CPW 2-3 ครั้ง แต่ละครั้งแยกโปรโตพลาสต์ออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ดูดสารละลาย CPW ออก

8. แยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ โดยใส่สารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย CPW 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที จะได้ชั้นของโปรโตพลาสต์อยู่ระหว่างชั้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสและสารละลาย CPW ส่วนของเศษเซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดโปรโตพลาสต์ออกมาโดยใช้ปิเปต

9. ล้างโปรโตพลาสต์ออกด้วยสารละลาย CPW 2 ครั้ง เพื่อทำให้โปรโตพลาสต์สะอาด โดยนำไปปั่นที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ดูดสารละลาย CPW ออก

10. ตรวจสอบการมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Fluorescien diacetate และสีย้อม evan blue

11. ใส่อาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สูตร NBR ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 0.1 0.25 0.5 ปรับปริมาตรของโปรโตพลาสต์เป็น 1 มิลลิลิตร สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจนับ ปรับปริมาตรอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 2 $x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรเพื่อนำไปเลี้ยงต่อไป

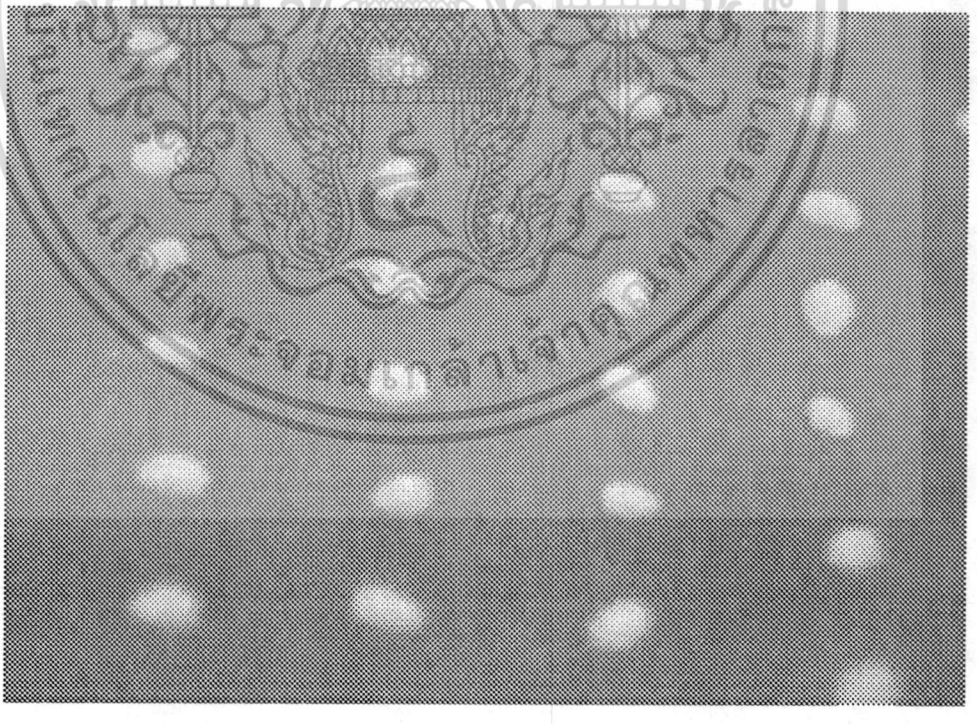
12. ปิดด้วยพาราฟิล์มและเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25˚C หลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

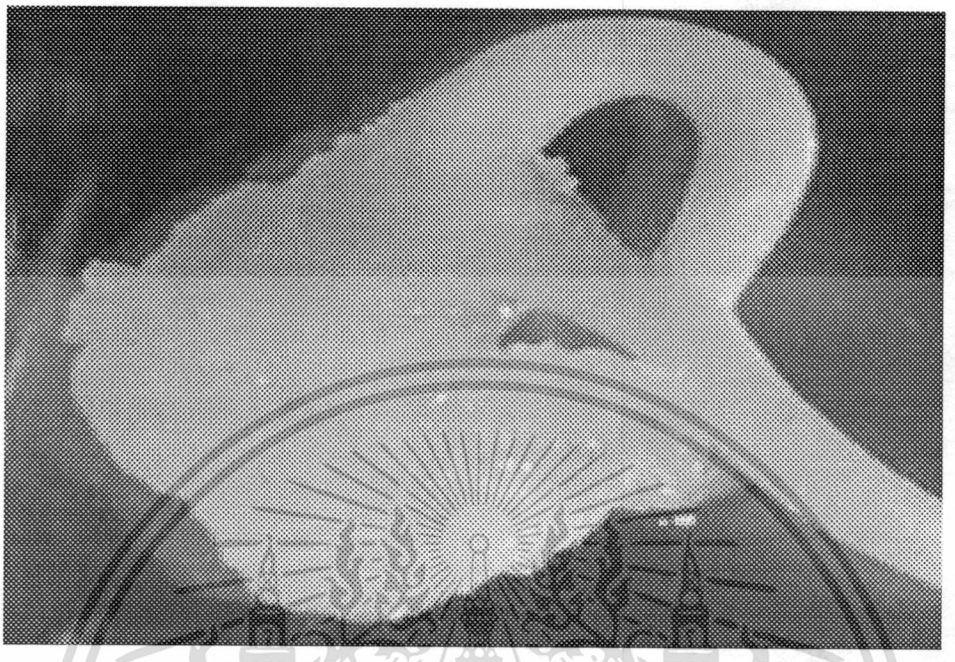
การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้คัพภะให้เป็นคัลลัสของข้าวโพพันธุ์สุวรรณ 3

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวโพด (รูปที่ 1) ในอาหารสูตร N_6 ที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตดังตารางที่ 1 พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าในอาหารแต่ละสูตรมีการงอกของแคลลัส (รูปที่ 2) ภายใน 2 สัปดาห์จะสังเกตเห็นลักษณะของแคลลัสเกิดขึ้นดีที่สุดของข้าวโพดทุกพันธุ์ในสูตรอาหาร N_6 ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสีเหลืองอ่อนประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ มีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น (typeI) และแบบที่เซลล์เกาะกันหลวมๆ (typeII) บางแคลลัสพบว่าจะมีทั้งสองแบบอยู่รวมกัน (รูปที่ 3)

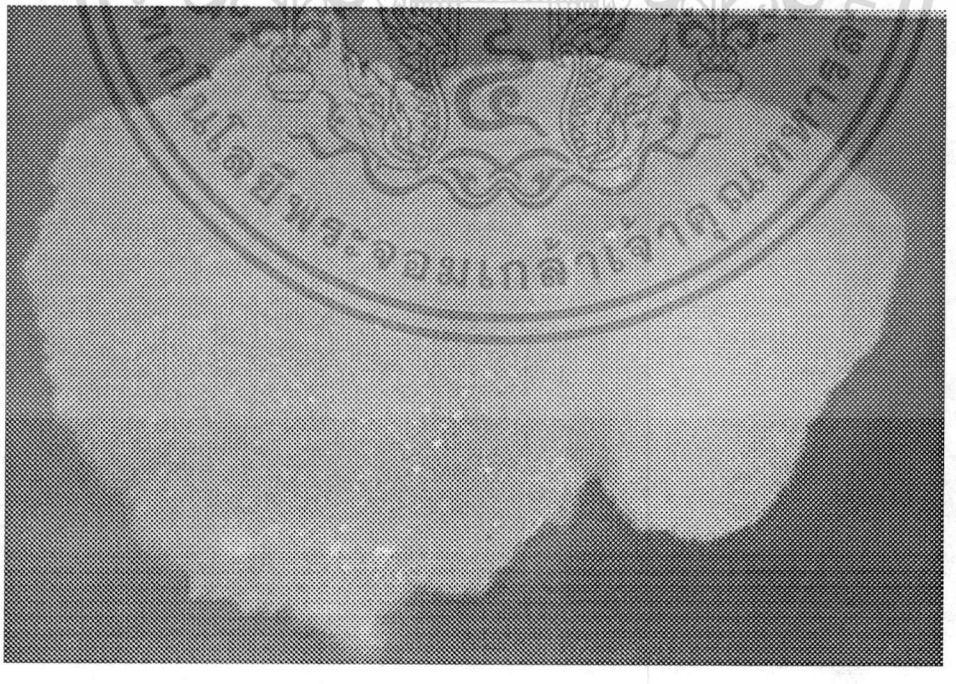


รูปที่ 1 แสดงลักษณะเอมบริโอของข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง N_6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาจากคัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง N_6

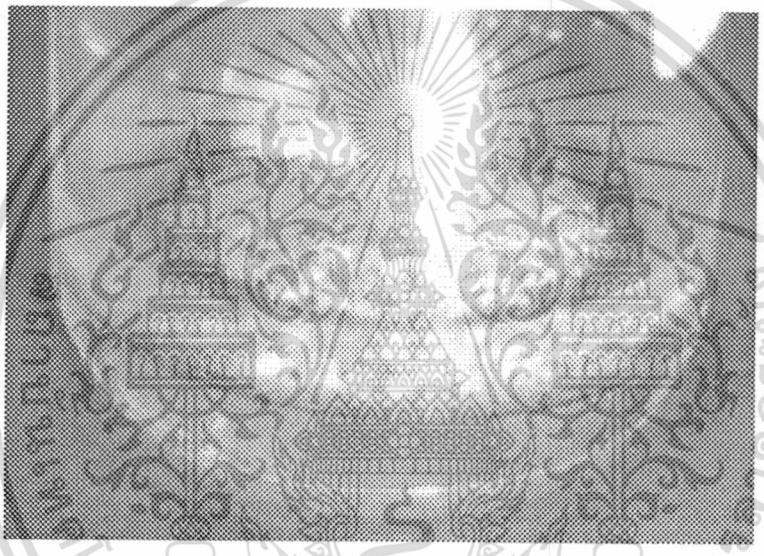


รูปที่ 3 แสดงลักษณะของแคลลัสแบบ compact callus และ friable callus

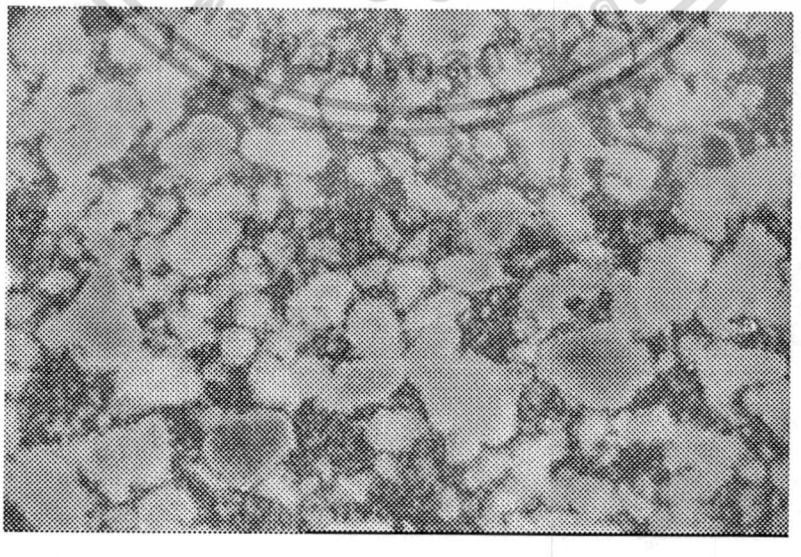
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

นำแคลลัสมาใส่ในอาหารเหลว N_6 และ R_2 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยซูโครส ที่ประกอบด้วยมอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตที่ดี (รูปที่ 4) แสดงลักษณะของเซลล์แขวนลอยเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (รูปที่ 5) แสดงลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA จะเรืองแสงสีเขียว-เหลือง (รูปที่ 6) เซลล์ที่ได้จะเหมาะสม ต่อการนำไปชักนำให้เป็นต้นและแยกโปรโตพลาสต์



รูปที่ 4 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในขวด



รูปที่ 5 แสดงลักษณะของเซลล์แขวนลอยเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 แสดงลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA

การทดลองที่ 3 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

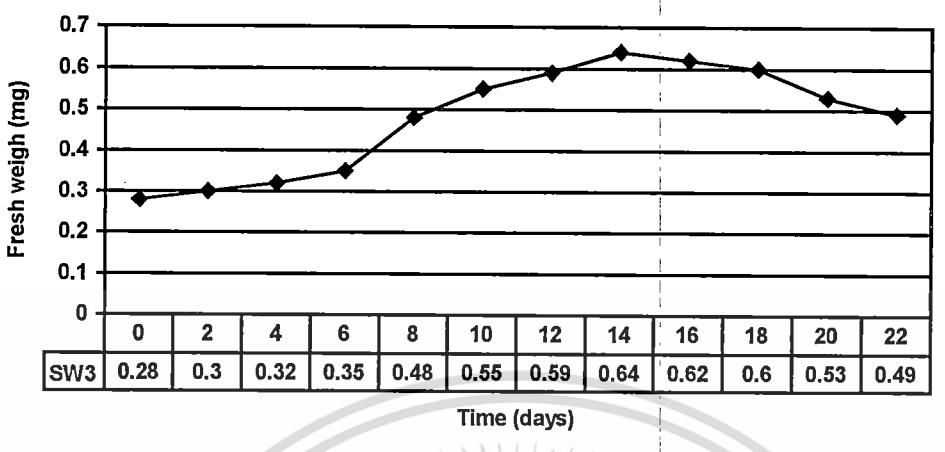
จากการหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25- 27 องศาเซลล์เซียส และทำการวัดหาค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2) ในแต่ละระยะเวลาคือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 22 วันตามลำดับ เมื่อนำผลที่วัดค่าน้ำหนักแห้งและค่าน้ำหนักสดมาเขียนกราฟการเจริญ พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-14 วัน (รูปที่ 7 และ8) ซึ่งช่วงที่เซลล์แขวนลอยมีการเจริญอย่างรวดเร็วจะเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์และทำการเปลี่ยนอาหารใหม่รวมทั้งการชักนำให้เกิดเป็นต้น

	เวลา (วัน)											
น้ำหนัก (ม.ก.)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
สด	0.28	0.30	0.32	0.35	0.48	0.55	0.59	0.64	0.62	0.60	0.53	0.49
แห้ง	0.002	0.002	0.003	0.004	0.007	0.009	0.011	0.012	0.012	0.010	0.008	0.008

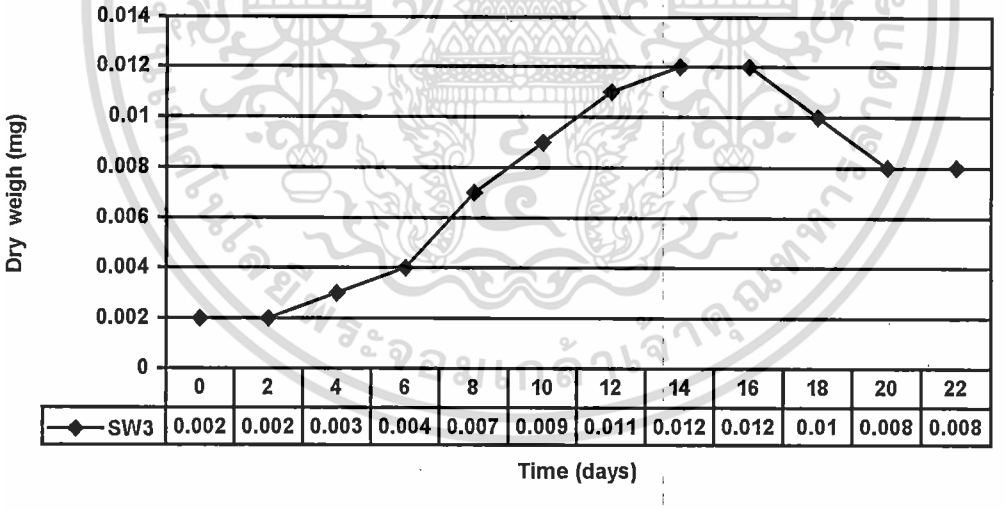
ตารางที่ 2 แสดงน้ำสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยการหาน้ำหนักสด



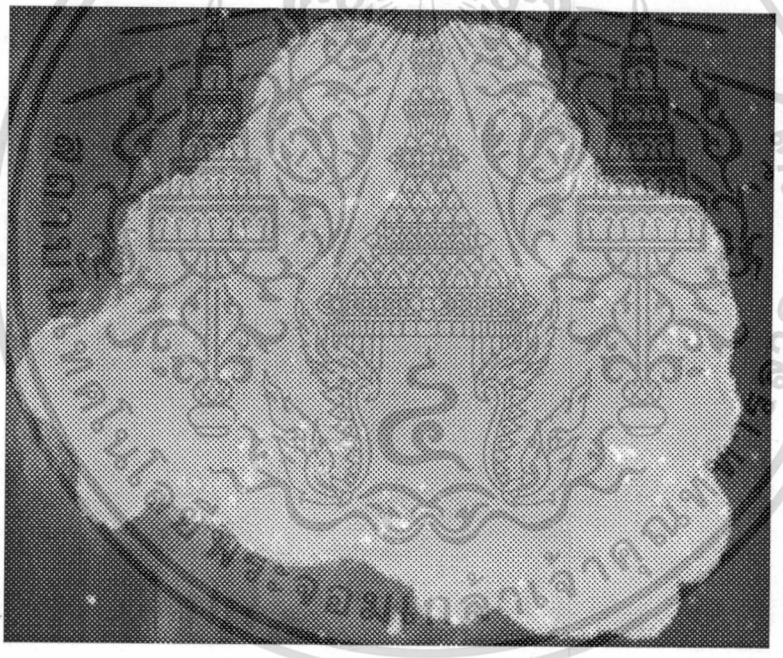
รูปที่ 8 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยการหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

34692

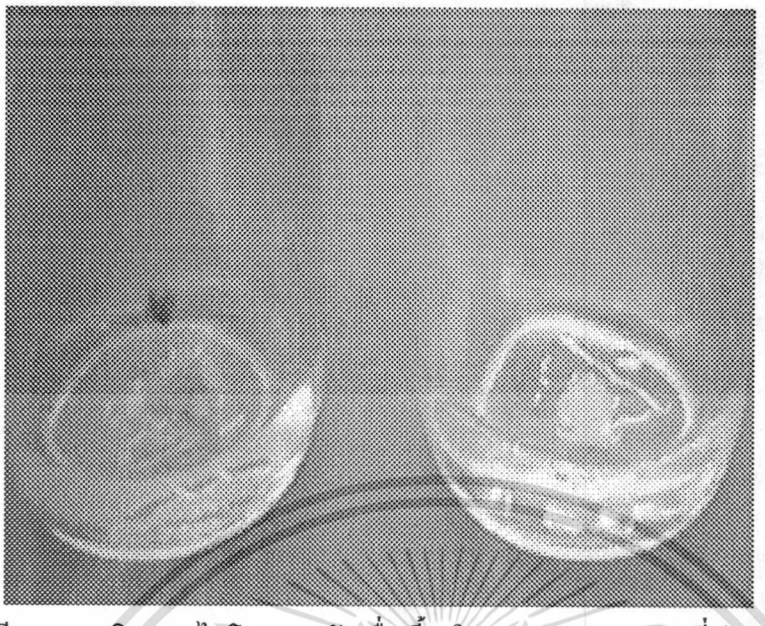
การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

เมื่อนำไมโครแคลลัส (รูปที่ 9) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 และ R_2 ที่ประกอบด้วยกลูโคส และมอลโตส โดยไม่มีการสารควบคุมการเจริญเติบโต (รูปที่ 10) จะมีการพัฒนาไปเป็นส่วนของยอดมีสีเขียว (รูปที่ 11) อาหารสูตร N_6 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเซลล์มีการเพิ่มจำนวน เกาะกันอย่างแน่น และมีสีเขียวเกิดขึ้น ส่วนอาหารสูตร R_2 ที่เติมมอลโตสเซลล์ที่ได้จะมีการเพิ่มจำนวนและมีการพัฒนาของยอดและราก (รูปที่ 12) และพบว่าอาหารสูตร R_2 ที่เติมมอลโตสมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาของไมโครแคลลัสมากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอื่น



รูปที่ 9. ลักษณะของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

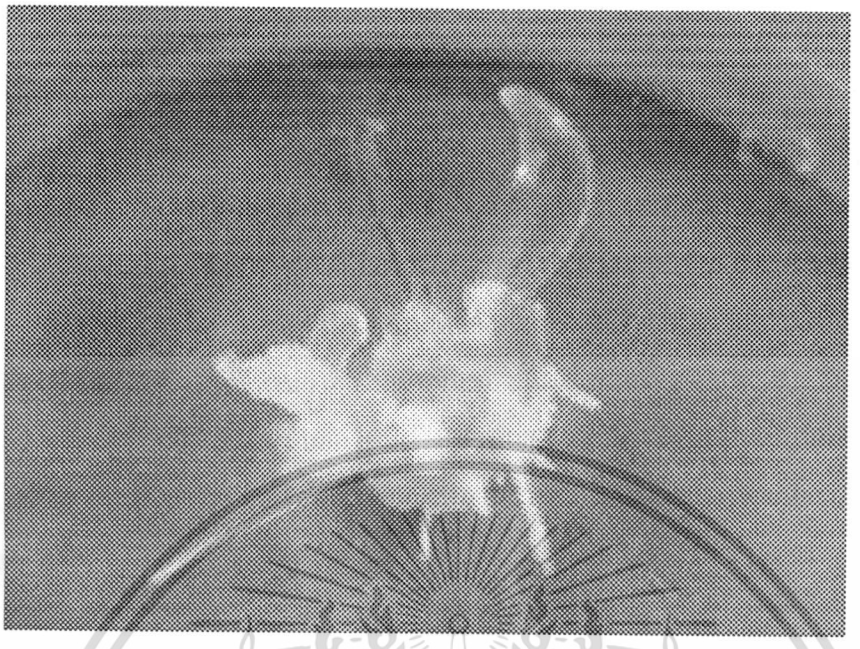
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



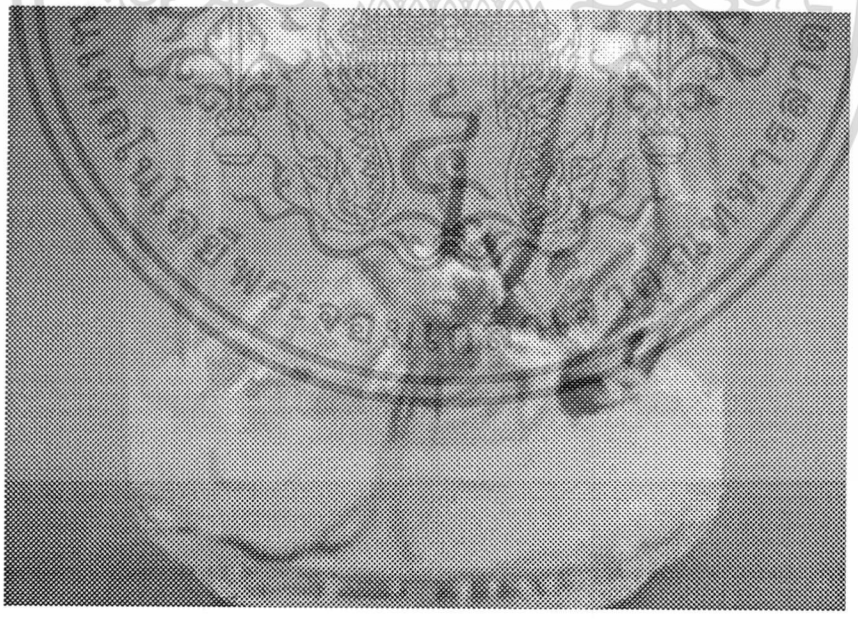
รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของไมโครแคลลัสเมื่อเลี้ยงในอาหาร R_2 และ N_6 ที่ประกอบด้วยมอลโตส

รูปที่ 11 การพัฒนาไปเป็นส่วนของยอดมีสีเขียวเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 ลักษณะการพัฒนาของไมโครแคลลัสมีการพัฒนาของยอดและราก



รูปที่ 13 ลักษณะการพัฒนาของไมโครแคลลัสเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

5.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอย

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ กับเอนไซม์เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกับเซลล์แขวนลอย ทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ 0.4 และ 0.5 โมลาร์ จะได้สภาพเซลล์ที่ไม่ดี รวมทั้งโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีปริมาณน้อย และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำให้ได้เซลล์มีสภาพดี เหมาะสำหรับนำไปทำการเพาะเลี้ยงและได้โปรโตพลาสต์ปริมาณมาก

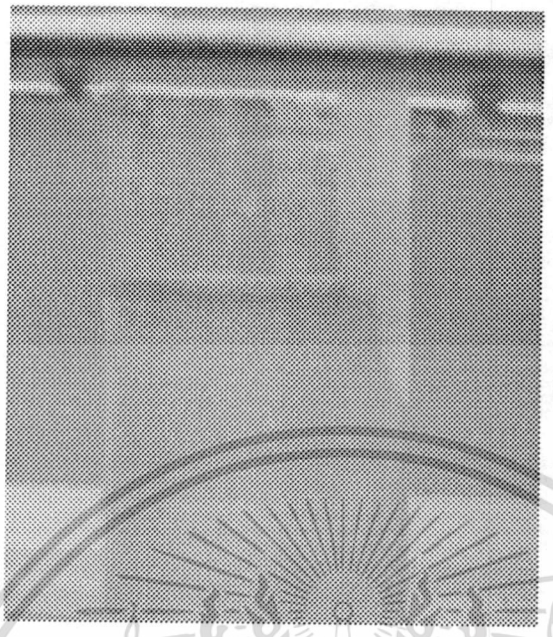
5.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยนำสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 1.5 1.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมรวมกับเซลล์แขวนลอย และสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ สามารถเห็นแถบของโปรโตพลาสต์ได้ชัดเจน (รูปที่ 14) และตรวจสอบการมีชีวิตโดยย้อมสี FDA พบว่ามีการเรืองแสงเป็นสีเขียว-เหลือง (รูปที่ 15) หลังการแยกด้วยสารละลายซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ความเข้มข้นของเอนไซม์ %	เวลา (ชั่วโมง)				
	2	3	4	5	6
0.5:0.5	0	2.075	1.25	3.75	4.16
1.0:0.5	0	0.825	1.65	2.5	9.15
1.5:0.5	0.825	2.035	3.75	2.9	12.9

ตารางที่ 3. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอย ตามความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



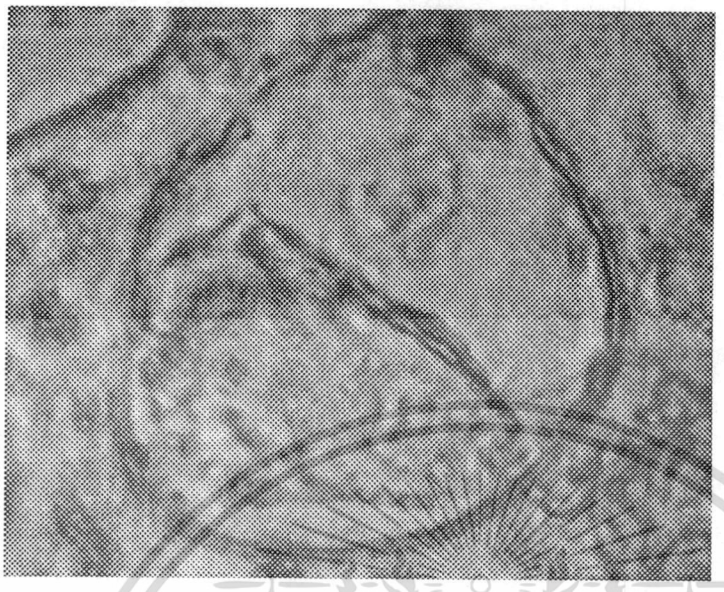
รูปที่ 14 แสดงแถบของโปรโตพลาสต์ที่ได้หลังจากการแยกด้วยสารละลายซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 15 แสดงโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA

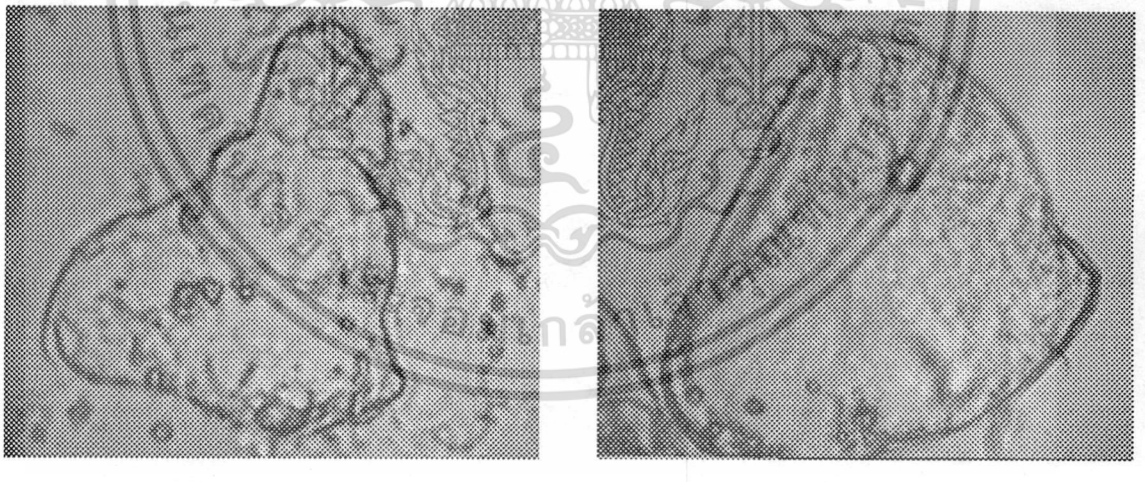
การทดลองที่ 6 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากข้าวโพดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NBR โดยทำการเลี้ยงในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิในช่วง 25-27 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน สังเกตพบการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (รูปที่ 16 และ 17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1-2 วัน



รูปที่ 17 แสดงการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสได้ดี มีลักษณะเป็นทั้งแบบ friable และ compact callus คือ อาหารสูตร N_6ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 2

การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ R_2 ที่ประกอบด้วย มอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 25 ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้เซลล์ที่เหมาะสมต่อการนำไปชักนำให้เป็นต้นและแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 3

การเจริญของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-14 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารใหม่และการนำมาแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 4

ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของไมโครแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร R_2 ที่ประกอบด้วย มอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์และมีการพัฒนาเป็นยอด ลำต้น และราก ที่สมบูรณ์

การทดลองที่ 5

การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย พบว่าที่สภาวะความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.6 โมลาร์และที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนส 1.5:0.5 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 6

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในอาหารเหลวสูตร NBR พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์และมีการแบ่งเซลล์ภายใน 1-2 วัน และสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร, ข้าวโพด. เอกสารทางวิชาการเล่มที่ 4. กรุงเทพฯ. 2545. 291 หน้า.

กอบเกียรติ แสงนิล. 2532. การเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวโพดเพิ่มระดับความทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

Armstrong, C.L and C.G. Green . 1985. Establishment and maintenance of friable embrogenic maize callus and the involvement of L-proline . Planta. 164 : 207-214.

Brigitte Krautwig and Horst Lorz. 1995. Single androgenetic structures of maize (Zea mays L.) for the initiation of homogenous cell suspention and protoplast cultures". Plant Cell Reports. 14. 477-481.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C. S., Hus, C., Yin K .C ., and C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18 : 695-668.

Duncan, D.R., M.E., William, M.E. Zehr and J.M. Widholm. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous Zea mays genotypes. Planta. 165 : 322-332.

Duncan, D.r and J.M Widholm. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. Plant Physiol. 83 : 705-708.

Green, C.E and R.L Philips. 1975. Plant regenerate from tissue culture of maize. Crop Sci. 15 : 417-421

Imbrie-miligan, C.W., K.K Kamo and T.K. Hodges. 1987 . Microcallus growth from maize protoplasts. Planta. 171 : 58-64.

Imbrie-Milligan. C.W. and T.K. Hodges. 1986. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus . Planta. 168 : 395-401.

Jeanette L. Rasmussen, Jjulie R. Kikkert, Mihir K. Roy, and John C. Sanfort. 1994 . Biolistic transformation of tobacco and maize suspention cells using bacterial cells as microprojectiles. Plant Cell Reports. 13 : 212-217.

Kamo, K.K., K.L. Chang, M.E. Lynn and T.K. Hodges. 1987. Embryogenic callus formation from maize protoplasts . Planta. 172 : 245-251.

Kathleen D'Halluin, E Bonne, M Bossut, M.D. Beuckeleer, and Jan Leemans. 1992. Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. The Plant Cell. 4 : 1495-1505.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marie-Francoise J, A Souvre, M. Beckert, and Gilbert Alibert. 1995. Optimaisation of DNA transfer and transient β-glucuronidase expression in electroporated maize (*Zea mays* L.) microspores.Plant Cell Reports. 15 : 55-58.

Pareddy, D.R., R.I. Greyson and D.C. Walden. 1987. Fertilization and seed production with pollen from in-vitro cultured maize tassel. Planta. 170 : 141-143

Parker. W.B., D.A. Somers, D.L. Wyse, R.A. Keith, J.B.Burton, J.W. Gronwald and B.G. Gengenbach. 1990. Selection and characterization of sethoxydim-tolerant maize tissue culture. Plant Physiol. 92 : 1220-1225.

Potrykus, I., C.T. Harms, H. Lorz and E. Thomas. 1977. Callus formation from stem protoplasts of corn (Zea mays L.). Mol. Gen. Genet. 156: 347-350

Saleem, M. And A.J. Cutler. 1987. Stabilizing corn leaf protoplast with n-propyl gallate. J. Plant. Physiol. 128 : 479-484.

Sukhapinda K., M.E. Kozuch, B. Rubin-Wilson, W.M. Ainley, and D.J. Merlo. 1993. Transformation of maize (Zea mays L.) protoplasts and regeneration of haploid transgenic plants. Plant Cell Reports. 13 : 63-68.

Sun, C.S., L.M. Prioli and M.R. Sondahl. 1989. Regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of super sweet (sh2 sh2) corn. Plant cell Reports. 8 : 313-316.

Vasil, V. and I.K. Vasil. .1987. Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet. 73: 793-78

Welter M.E., D.S. Clayton, M.A.. Miller, and J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus .Plant Cell Reports. 14 :725-729

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่1 สารเคมีในสูตรอาหาร N_6 Chu และคณะ (1975)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
$(NH_4)SO_4$	463
KNO_3	2830
KH_2PO_4	400
$MgSO_4.7H_2O$	185
$CaCl._2H_2O$	166
$MnSO_4.4H_2O$	3.33
$ZnSO_4.7H_2O$	1.5
H_2BO_3	1.6
KI	0.8
Na_2EDTA	37.3
$FeSO_4$ .7HO	27.8
glycine	2.0
nicotinic acid	1.0
pyridoxine-HCl	0.5
thiamine-HCl	0.5
$_pH$	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 สารเคมีในสูตรอาหาร R_2

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (กรัม/ลิตร)
$(NH_4)SO_4$	8.25
KNO_3	100
$MgSO_4.7H_2O$	6.25
$CaCl._2H_2O$	7.5
$MnSO_4.4H_2O$	0.5
$ZnSO_4.7H_2O$	0.55
H_2BO_3	0.715
KI	0.2
$CuSO_4$	0.049
NaH_2PO_4	75
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0315
$CuCl_2.6H_2O$	0.00625
Na_2EDTA	0.83
$FeSO_4.7HO$	0.62
nicotinic acid	0.25
pyridoxine-HCl	0.25
thiamine-HCl	0.5
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 สารละลายสูตร CPW ที่ใช้ล้างโปรโตพลาสต์ Frearson และ คณะ (1973)

สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัม/ลิตร)
KH_2PO_4	27.2
KNO_3	101
$CaCl_2.2H_2O$	1480
$MgSO_4.7H_2O$	246
KI	0.16
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
MES	1013
Mannitol	72800
pH	5.8

ตารางผนวกที่ 4 สูตรสารละลายเอนไซม์ ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ Frearson และคณะ (1973)

สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัม/ลิตร)		
	1	2	3
KH_2PO_4	27.2	27.2	27.2
KNO_3	101	101	101
$CaCl_2.2H_2O$	1480	1480	1480
$MgSO_4.7H_2O$	246	246	246
KI	0.16	0.16	0.16
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025
MES	1013	1013	1013
Mannitol	78200	78200	78200
Cellulase from Trichoderma (%)	0.5	1.0	1.5
Pectinase from Rhizopus (%)	0.5	0.5	0.5
pH	5.8		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้