สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานฉบับสมบูรณ์

รายงานผลการวิจัยประจำปี 2539

ชื่อโครงการ การชักนำให้เกิดพันธุ์ข้าวทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induction of Salt Tolerant in Rice (*Oryza Sativa* L.) by Tissue Culture Technique

อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QK
725
.R995
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 34690
วัน, เดือน, ปี 19 พ.ย. 2542

T034690

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารแข็งสูตร N_6 สามารถชักนำคัพภะให้เกิดเป็นแคลลัสห้มีจุดเขียวและเป็นต้นใหม่ในข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 คือสูตร N_6 ที่เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือสูตร MS ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

การชักนำแคลลัสให้ได้เซลล์แขวนลอยที่สม่ำเสมอของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ใช้เวลาประมาณ 5-6 เดือน และสามารถชักนำเซลล์แขวนลอยให้มีจุดเขียวในข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 คือสูตร N_6 ที่เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือสูตร N_6 ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดสอบการทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าแคลลัสและเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถทนเกลือได้ที่ระดับ 0.75 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสและเซลล์แขวนลอยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สามารถทนเกลือได้ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ในอาหารเหลวสูตร N_6 MS และ KM-8P ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 20 วัน

Abstract

Seeds culture of Basmati 370 and Kao-Dawk-Mali 105 were cultured on N_6 medium which could induce numerous calli. Induce callus in N6 medium were green sport and regeneration. In Basmati 370 N_6 and 1 mg/l IAA and 6 mg/l BA and Khao Dake Mali 105 in MS 1 mg/l IAA and 4 mg/l BA

Induction of suspension 2 varieties from callus were fine about 5-6 month and induced greens spot and plantlet regeneration on N_6 supplemented with IAA 2 mg /l and NAA 2 mg/l for Basmati 370 and BA 2 mg/l for Khao Dake Mali 105 .

Suspension were transferred on N_6 medium with various concentrations of NaCl at 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 and 2.00 percent. Callus and Cells suspension of Kao-Dawk-Mali 105 and Basmati 370 grew in 0.5 % and 0.75 % .

Potoplast culture 2 varieties can grown and cell division on N_6 MS and KM-8P at NaCl 1 % for 20 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa L*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทยอย่างมาก ประชากรอย่างน้อย 1 ใน 3 ของไทยมีอาชีพการทำนา และพลังงานที่ได้จากการรับประทานข้าวประมาณ 3 ใน 4 จากอาหารทั้งหมด ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น นอกจากนี้ยังเจริญเติบโตได้ในดินหลายประเภทที่มีความเป็นกรด ด่าง และความเค็มต่างๆกัน ในปัจจุบันพื้นที่ในการปลูกข้าวที่เป็นดินเค็ม และพื้นที่ที่มีโอกาสจะกลายเป็นดินเค็มอยู่มากมาย ซึ่งการปลูกข้าวในพื้นที่ที่เป็นดินเค็มนั้นจะทำให้ได้ผลผลิตต่ำ เป็นผลมาจากความเป็นพิษที่เกิดจากเกลือ และการขาดน้ำของพืชเนื่องมาจากพืชดูดน้ำขึ้นมาใช้ลำบากเพราะเกลือในดินดูดน้ำเอาไว้ ข้าวที่ปลูกในดินเค็มมักมีลำต้นแคะแกรน ไม่แตกกอ และเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ และเมล็ดจะลีบทำให้ได้ผลผลิตต่ำ จากปัญหาดังกล่าวมาได้มีการปรับปรุงข้าวให้มีคุณภาพดี ผลผลิตสูง ทนต่อสภาพแวดล้อมและต้านทานโรค โดยใช้เทคนิคต่างๆมากมาย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ และการฉายรังสี ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาต่างๆในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลักษณะตามต้องการ คืออาจจะหาพันธุ์ข้าวที่สามารถทนเค็มได้ ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของข้าวได้เจริญก้าวหน้าไปมาก เช่นการเพาะเลี้ยงเอมบริโออ่อน เอมบริโอแก่ ละอองเรณู อับเรณู เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ ซึ่งปัจจุบันมีการย้ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อ และสามารถชักนำให้เป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ ส่วนมากจะเป็นข้าวพวก Japonica แต่ในพวก Indica ยังมีปัญหาอยู่มาก ถึงแม้ว่าจะสามารถชักนำให้เป็นต้นได้เมื่อประมาณ 3 ปีที่ผ่านมา ข้อมูลที่มีอยู่เป็นข้าวสายพันธุ์ที่ใช้ในต่างประเทศเช่น IR 52 IR 54 ซึ่งจะนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้กับสายพันธุ์ข้าวไทยคงจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ มากมายก่อนที่จะมาใช้ได้โดยตรง

วัตถุประสงค์

1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแคลลัส เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ของข้าว

2 ศึกษาถึงผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงกับการพัฒนาเป็นแคลลัส เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nishi และคณะ(1968) รายงานเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดเป็นต้นได้จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเป็นครั้งแรก ต่อมาได้มีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มได้รายงานไว้เช่น Guka Mukherjec,1973; Henke และคณะ,1978; Wernicke และคณะ, 1981; Lai และ Liu,1982; Ling และคณะ,1983; Chen และคณะ,1983; กลุ่มวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับข้าวทนเค็มเช่น Oono ,1978 ; Suenagac และคณะ,1982 ; Yamada และ คณะ1983 ; และVajrabhaya และคณะ(1989) รายงานเกี่ยวกับความทนเค็มโดยใช้ embryogenic callus ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร White ดัดแปลง ที่มี NaCl 1 หรือ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้น พบว่าอัตราการเกิดเป็นต้นลดลง 0.08 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 8.3-30 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับการทดสอบกับต้นกล้าที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NaCl 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า อัตราการรอดชีวิตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวในชั่วที่ 3 มีอัตราการรอดชีวิต 94.31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดลองในชั่วที่ 4 คล้ายคลึงกับช่วงที่ 3 ต่อมาในช่วง 1985-1987 มีนักวิจัยหลายกลุ่มพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์พวก Japonica ให้เป็นต้นได้ Fujimura และคณะ, 1985; Coulibalyและ Demarly, 1986; Toriyama และคณะ, 1986; Yamada และคณะ,1986; Kyozuka และคณะ,1987; Zhijian และคณะ, 1990; Rvey-Chih Su และคณะ,1992; ในข้าวพวก Indica นั้นนักวิจัยได้ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตรพลาสต์ให้พัฒนาได้เมื่อ 3 ปีที่ผ่านมา Leeและคณะ, (1989)ได้รายงานถึงการชักนำให้เกิดเป็นต้นได้จากโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เซลล์แขวนลอย และจากแคลลัสข้าวสายพันธุ์ IR 54 โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ข้าว Indica มีข้าว Japonica สายพันธุ์ Calrose 76 เป็นเซลล์ พี่เลี้ยง Koetje และคณะ (1989) ได้ศึกษาระบบการชักนำให้เกิดเป็นต้นจากการเพาะ เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าว Indica สายพันธุ์ต่างๆ เช่น IR 8 IR 52 และ IR 54 พบว่า IR 54 เป็นสายพันธุ์ที่ตอบสนองดีที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นพื้นฐานในการศึกษาหาข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็ม การเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 และ บาสมาติ 370
2. สารเคมีต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเกลือ NaCl
3. เอมไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยพนังเซลล์ เช่น เซลลูเลส และ เพคติเนส
4. สีย้อมตรวจสอบโปรโตพลาสต์
5. อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรอง
6. เครื่องแก้วต่างๆ
7. อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
8. กล้องและอุปกรณ์การถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม
9. หม้อนึ่งความดัน
10. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
11. ตู้ Lamina air flow
12. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
13. เครื่องเขย่า
14. เครื่องเซนติฟิวส์
15. กล้อง Inverted microscope
16. กล้อง Fluorescent microscope

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยข้าวสองพันธุ์ที่ได้จากเมล็ด

1.1 การชักนำให้เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส

นำเมล็ดข้าว 2 พันธุ์คือ บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 มาแกะเอาเปลือกออก ฟอกเมล็ดข้าวในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอร็อก 15 เปอร์เซ็นต์ที่เติมสารเปียกใบ (Tween 20) จำนวน 3-4 หยด เขย่าเป็นครั้งคราว นาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2, 4 - D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดไลเซต (Casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน (L-Proline) 1 กรัมต่อลิตร ไมโออินโอซิทอล (myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน

1.2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาแคลลัส

นำแคลลัสข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 อายุประมาณ 30 วันย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 และ MS ประกอบด้วย IAA Kinetin และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตาม (ตารางที่ 1) รวม 14 สูตร บันทึกผลการทดลองในเวลา 30 วัน

การทดลองที่ 2 ชักนำแคลลัสให้เป็นเซลล์แขวนลอยโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว

2.1 ชักนำแคลลัสให้เป็นเซลล์แขวนลอยโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว

นำแคลลัสอายุประมาณ 30 วัน ที่มีลักษณะแบบ friable callus ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล- โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไมโออินโอซิทอล 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 ปริมาณ 20 มิลิลิตร ในฟลาสก์ 125 มิลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7-15 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาเซลล์แขวนลอยให้เป็นต้นใหม่

นำเซลล์แขวนลอยข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่ได้จากการชักนำจากแคลลัส ย้ายลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย IAA NAA Kinetin และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตาม (ตารางที่ 2) รวม 10 สูตร บันทึกผลการทดลองในเวลา 30 วัน

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์

3.1 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

นำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 อายุประมาณ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล- โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไมโออินโอซิทอล 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 9 ระดับ คือ 0 0.25 0.5 0.75 1.0 1.25 1.5 1.75 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ บันทึกผลในเวลา 1 เดือน

3.2 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่มีความสม่ำเสมอเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไมโออินโอซิทอล 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ได้รับการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 7 วันย้ายไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 1.0 1.25 1.5 1.75 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ รวม 9 ระดับ โดยใช้เซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่ออาหารเหลวที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร บันทึกผลในเวลา 1 เดือน โดยการวัดปริมาณเซลล์ และตรวจการมีชีวิตด้วยสีย้อม FDA เพาะเลี้ยงต่อโดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7-15 วัน บันทึกผล นำเซลล์แขวนลอยที่ทนเกลือได้แล้วเทผสมอาหารแข็งลงบนจานแก้วให้พัฒนาเป็นไมโครแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอยของข้าว 2 สายพันธุ์ มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักนำเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัมของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และ พันธุ์หอมมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ได้รับการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 7-15 วัน

2. ตรวจดูการมีชีวิตโดยใช้สีย้อม Fluorescien diacetate

3. นำเซลล์แขวนลอยแช่ในสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.35 โมล 30 นาที

4. ดูดสารละลาย CPW ออก แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ เซลลูเลส กับมาเซอร์โรไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 3:1 และ 2:1 ในข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และพันธุ์หอมมะลิ 105 ตามลำดับ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น แมนนิทอล 0.35 โมล ปิดด้วย พาราฟิล์ม

5. นำไปวางในที่มีมืดบนเครื่องเขย่า 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

6. ดูดสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ แยกออกมากรองผ่านที่กรองขนาด 80 ไมโครเมตร ที่บรรจุในหลอดทดลอง นำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

7. ดูดสารละลายเอนไซม์ออก และทำการล้างด้วยสารละลาย CPW 2-3 ครั้ง แต่ละครั้งแยกโปรโตพลาสต์ออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออก

8. แยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ โดยใส่สารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตรและสารละลาย CPW 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จะได้ชั้นวางของโปรโตพลาสต์ (band) อยู่ระหว่างชั้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสและสารละลาย CPW ส่วนเศษเซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดโปรโตพลาสต์ออกมา

9. ล้างโปรโตพลาสต์ออกด้วยสารละลาย CPW 1-2 ครั้ง เพื่อทำให้โปรโตพลาสต์สะอาด แยกโปรโตพลาสต์โดยนำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีดูดสารละลายCPW ออก

10. ดูการมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Fluorescien diacetate

11. เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 3 สูตร ได้แก่ KM-8P MS และ N_6 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับปริมาตรโปรโตพลาสต์ให้ได้ความหนาแน่น $2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	BA (มก/ล) / IAA (มก/ล)	2	3	4	5	6
MS	1	A	B	C	D	-
	2	-	-	E	F	G
N6	1	H	I	J	K	-
	2	-	-	L	M	N

ตารางที่ 1. แสดงสูตรอาหาร MS และ N_6

ฮอร์โมน(มิลลิกรัม/ลิตร)	
1. IAA 2	6. IAA 2 : BA 2
2. NAA 2	7. IAA 2 : Kin 2
3. BA 2	8. NAA 2 : BA 2
4. Kin 2	9. NAA 2 : Kin2
5. IAA 2 : NAA 2	10. BA 2 : Kin 2

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหาร N_6

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้นอ่อน

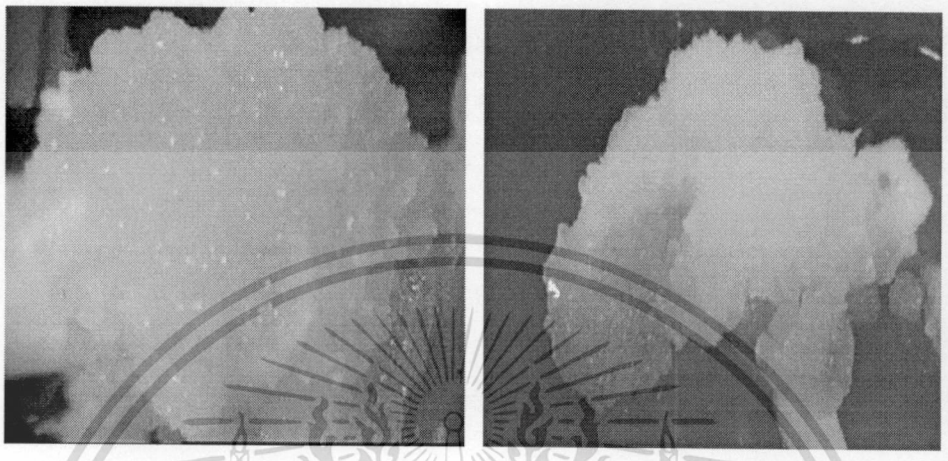
1.1 จากการชักนำให้เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส เป็นระยะเวลา 30 วัน ได้แคลลัส (รูปที่ 1)

1.2 จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้พัฒนาในอาหารสูตรต่าง ๆ

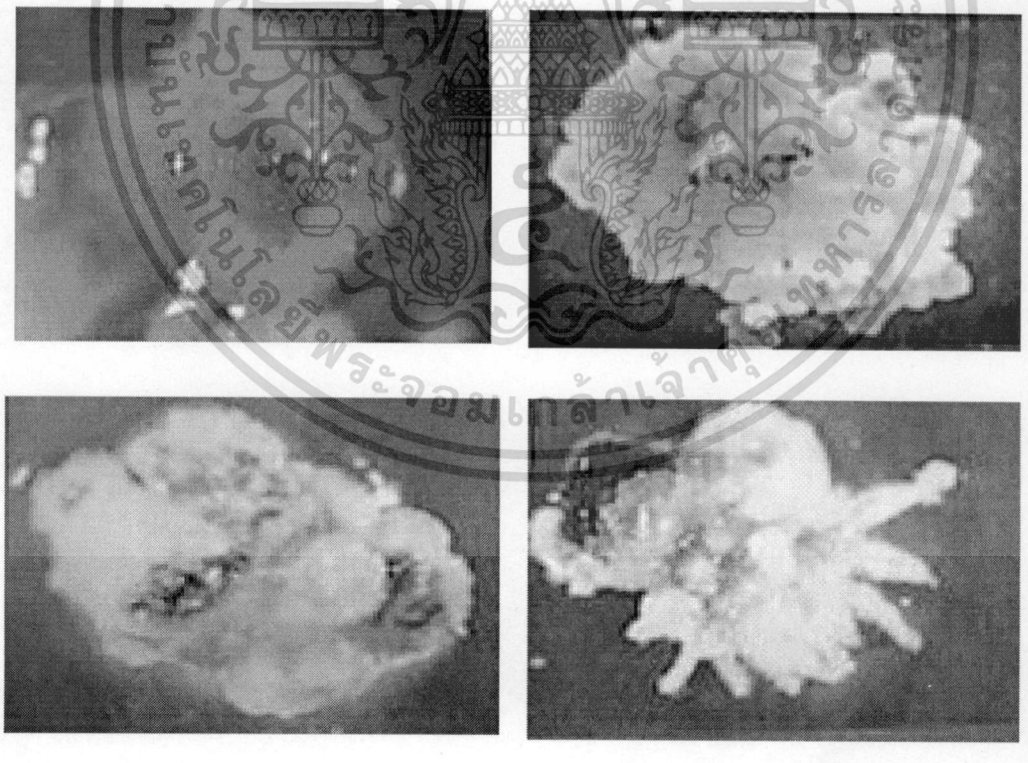
การเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 30 วัน (รูปที่ 2) ในพันธุ์หอมมะลิ 105 มีการพัฒนาไปหลายรูปแบบ เช่น แตกเป็นก้อนเล็ก ๆ ในสูตรอาหารที่มี Kinetin เป็นองค์ประกอบจะเกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร MS IAA 1 : BA 4 เปลี่ยนเป็นสีส้มเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีดำในสูตรที่มีฮอร์โมนมาก และสามารถเกิดเป็นแคลลัสเล็ก ๆ สีขาวได้ใหม่ ส่วนในพันธุ์บาสมาติ 370 มีการพัฒนาเป็นจุดสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขียวที่ผิวของก้อนแคลลัสในสูตรอาหาร N_6 IAA 2 : BA 6 และในทุกสูตรอาหารมีการเจริญเป็นก้อนใหญ่ขึ้น มีการดำน้อยกว่าพันธุ์หอมมะลิ 105



รูปที่ 1 แคลลัสข้าว อายุ 30 วัน



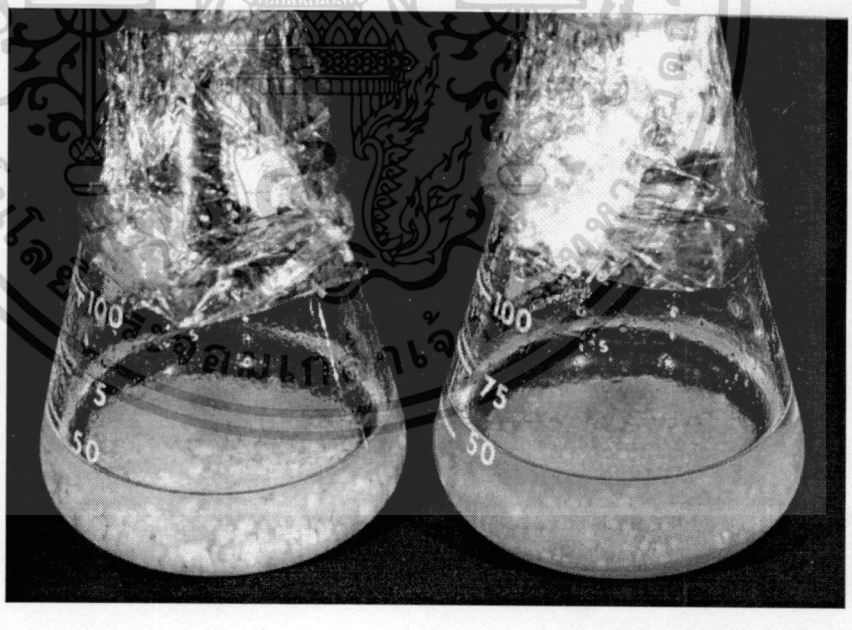
รูปที่ 2 แคลลัสของข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 14 สูตร มีการพัฒนาหลายลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ชักนำแคลลัสให้เป็นเซลล์แขวนลอยโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว

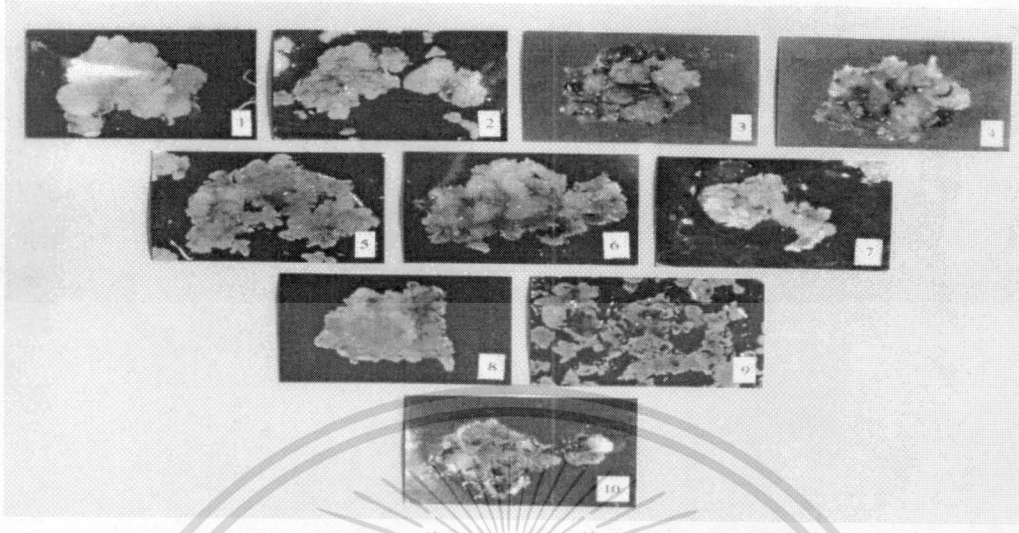
แคลลัสที่มีขนาดเล็ก ๆ จะกลายเป็นสีดำในเวลา 1 เดือน และ แคลลัสใหญ่ ๆจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นจะเกิดตุ่มขาวงอกออกจากก้อนแคลลัสสีน้ำตาล เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยในเวลา 3 เดือน และมีขนาดสม่ำเสมอเมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงต่อไปเรื่อยเป็นเวลา 5 เดือน สามารถเพิ่มจำนวนได้มากและรวดเร็ว (รูปที่ 3)

นำเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 มาวางบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยฮอร์โมนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 เกิดตุ่มเขียวได้ในหลายสูตรอาหารแต่เกิดได้มากที่สุดในสูตร N_6 BA 2 ส่วนเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่มีลักษณะอ่อนนิ่มเกิดพัฒนาเป็นรากได้ในอัตราส่วนที่น้อย ในสูตรอาหาร N_6 IAA 2 : NAA 2 และเกิดเป็นตุ่มสีเขียวในสูตรอาหาร N_6 NAA2 : BA 2 ได้ดี (รูปที่ 4 และ 5) และสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (รูปที่ 6)



รูปที่ 3 เซลล์แขวนลอยข้าว 2 พันธุ์ คือซ้ายบาสมาติ 370 และขวาหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการชักนำแคลลัสในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



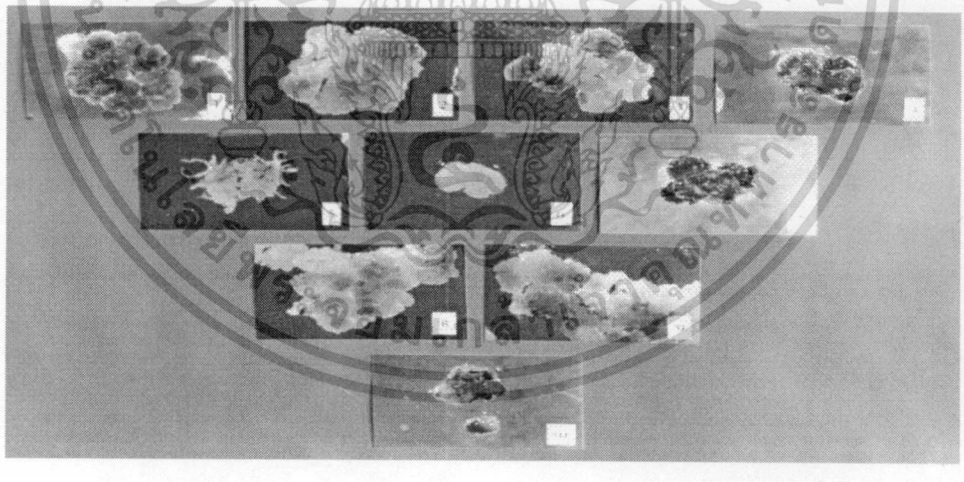
รูปที่ 4 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยฮอร์โมนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน

1. IAA2 2. NAA2 3. BA2 4. Kin2

5. IAA2:NAA2 6. IAA2 : BA2 7. IAA2 : Kin2

8. NAA2 : BA2 9. NAA2 : Kin2

10. BA2 :Kin2



รูปที่ 5 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยฮอร์โมนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน

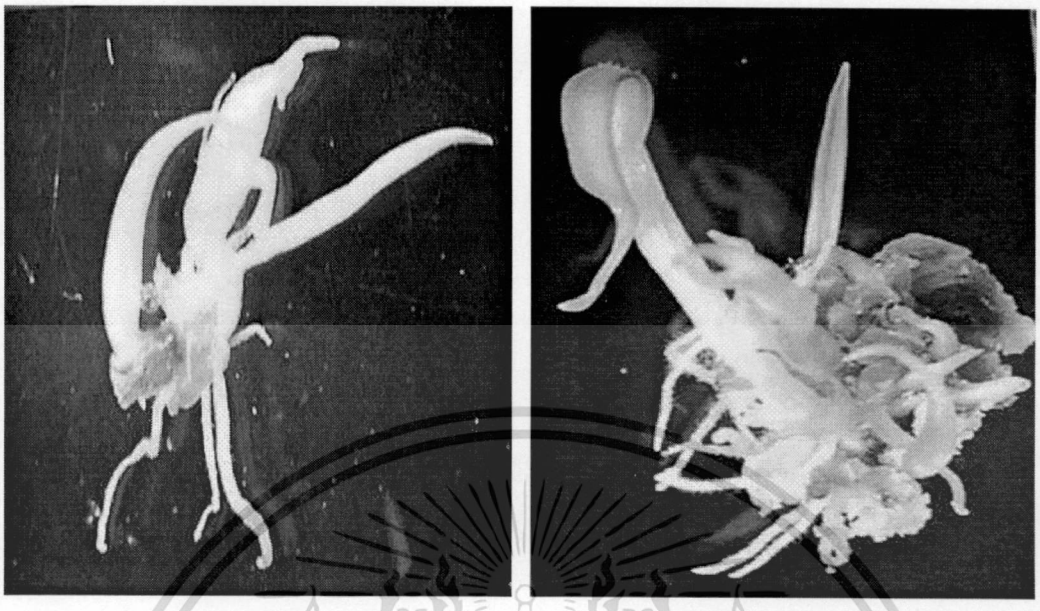
1. IAA2 2. NAA2 3. BA2 4. Kin2

5. IAA2:NAA2 6. IAA2 : BA2 7. IAA2 : Kin2

8. NAA2 : BA2 9. NAA2 : Kin2

10. BA2 :Kin2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แคลลัสสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 3. ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

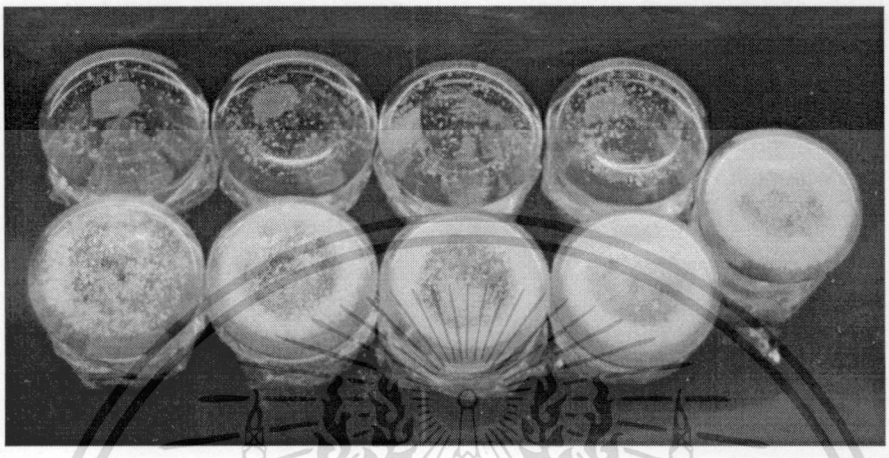
แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยเกลือ จะทำให้เกิดความเครียดสามารถดึงน้ำมาใช้ได้น้อยลงและตายเนื่องจากความเป็นพิษของเกลือ แคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 0.75 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสข้าวพันธุ์หอมมะลิ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสุงสุด 0.5 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ยังมีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้น 1.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ยังมีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะมีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่น้อยกว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 3 และ4) (กราฟที่ 1 และ 2) และ (รูปที่ 7 และ 8) และเมื่อเปลี่ยนอาหารเหลวที่มีเกลือ ทุก 7-15 วันเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าสามารถมีชีวิตและขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้นได้ในระดับความเข้มข้น 0.75 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ตามลำดับ ส่วนเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการทดลองที่ 2 เมื่อนำไปวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเกลือ ผลสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ และมีการเจริญเติบโต เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเกลือน้อยจะโตได้ดีและเร็วกว่าที่มีความเข้มข้นเกลือมาก ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เซลล์แขวนลอยจะเปลี่ยนสี (รูปที่ 9) และการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยเป็นดัง (รูปที่ 10)



รูปที่ 7 ผลการเจริญของเซลล์แขวนลอยของข้าวบาสมาติ 370ในอาหารเหลวสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 1.0 1.25 1.5 1.75 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ รวม 9 ระดับ

รูปที่ 8 ผลการเจริญของเซลล์แขวนลอยของข้าวหอมมะลิ 105 ในอาหารเหลวสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 9 ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 1.0 1.25 1.5 1.75 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

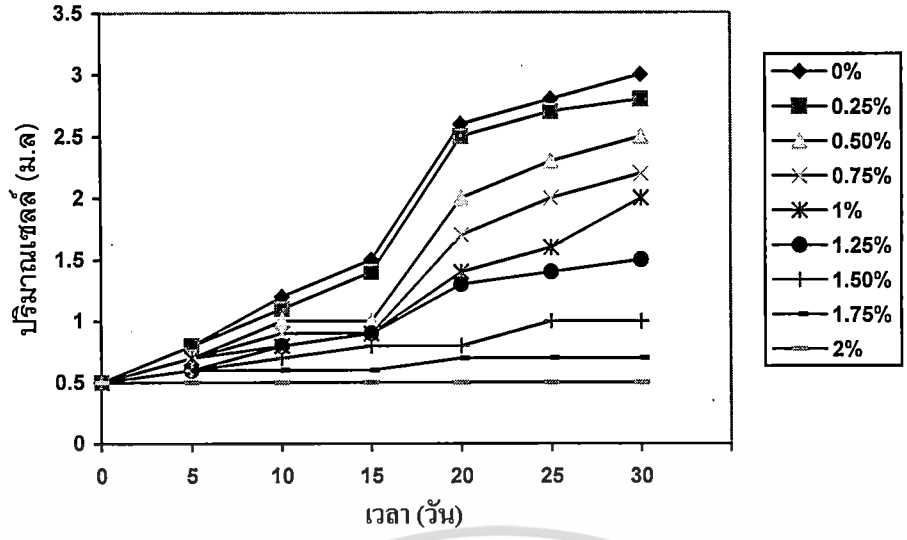
ตารางที่ 3 การเจริญของเซลล์แขวนลอย บาสมาติ 370

ความเข้มข้น	วันแรก	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 30
0 %	0.5	0.8	1.5	2.5	2.7	2.9	3.2
0.25 %	0.5	0.8	1.3	2.3	2.6	2.7	2.9
0.50 %	0.5	0.8	1.3	2.1	2.4	2.6	2.8
0.75 %	0.5	0.8	1.2	2.2	2.3	2.4	2.7
1.0 %	0.5	0.8	1	1.7	1.8	1.9	2.2
1.25 %	0.5	0.7	0.9	1.8	1.8	1.8	2.0
1.5 %	0.5	0.7	0.8	1.2	1.3	1.3	1.4
1.75 %	0.5	0.7	0.8	1.2	1.2	1.3	1.3
2.0 %	0.5	0.7	0.8	0.9	1	1.3	1.2

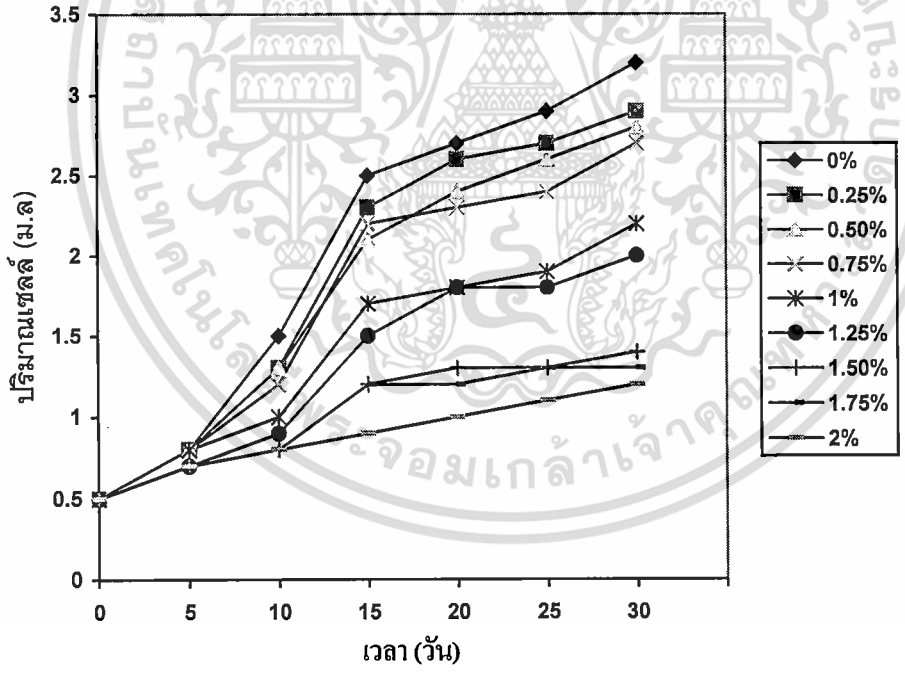
ตารางที่ 4 การเจริญของเซลล์แขวนลอย หอมมะลิ 105

ความเข้มข้น	วันแรก	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 30
เกลือ 0%	0.5	0.8	1.2	1.5	2.6	2.8	3
0.25 %	0.5	0.8	1.1	1.4	2.5	2.7	2.8
0.50 %	0.5	0.7	1	1	2	2.3	2.5
0.75 %	0.5	0.7	0.9	0.9	1.7	2	2.2
1.0 %	0.5	0.7	0.8	0.9	1.4	1.6	2
1.25 %	0.5	0.6	0.8	0.9	1.3	1.4	1.5
1.5 %	0.5	0.6	0.7	0.8	0.8	1	1
1.75 %	0.5	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7
2.0 %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



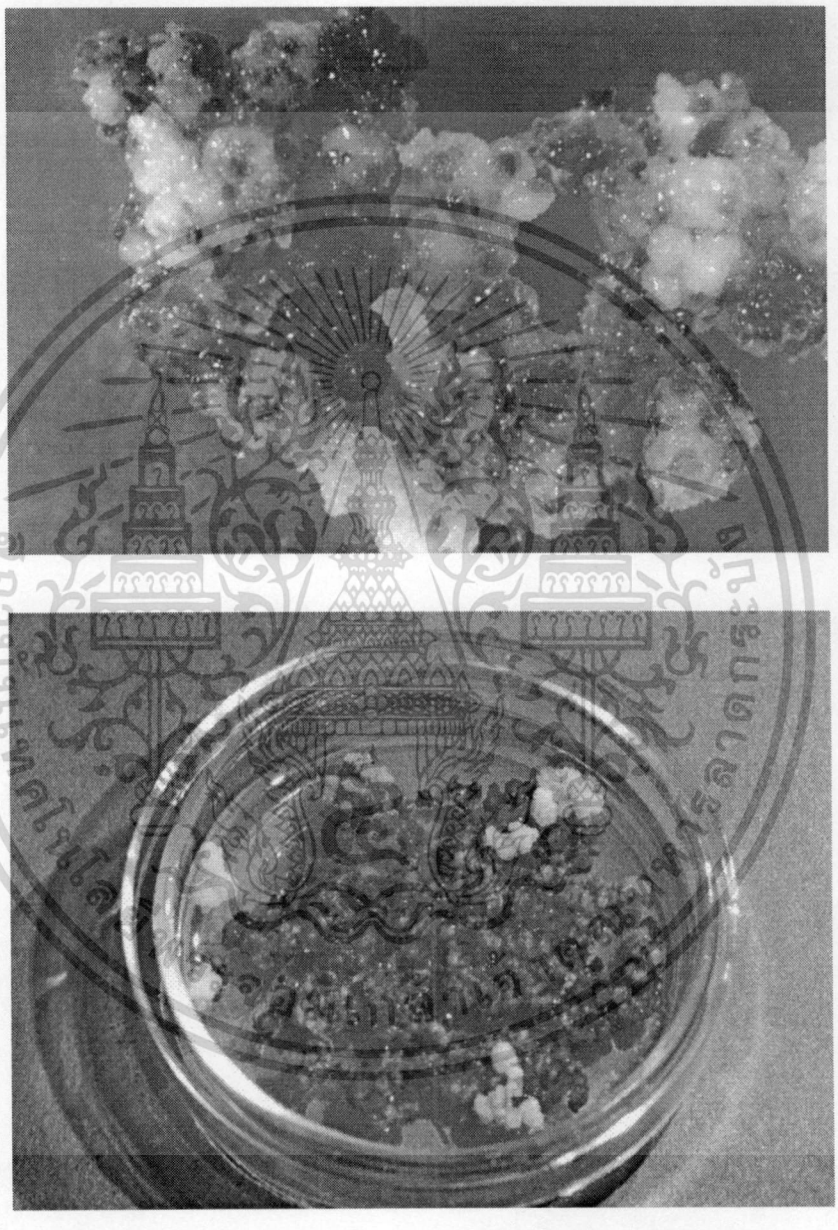
กราฟที่ 1. กราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 โดยวัดปริมาณเซลล์ ในอาหารที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 0.25 0.5 0.75 1 1.25 1.5 1.75 และ 2 เปอร์เซ็นต์



กราฟที่ 2. กราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 โดยวัดปริมาณเซลล์ในอาหารที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 0.25 0.5 0.75 1 1.25 1.5 1.75 และ 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



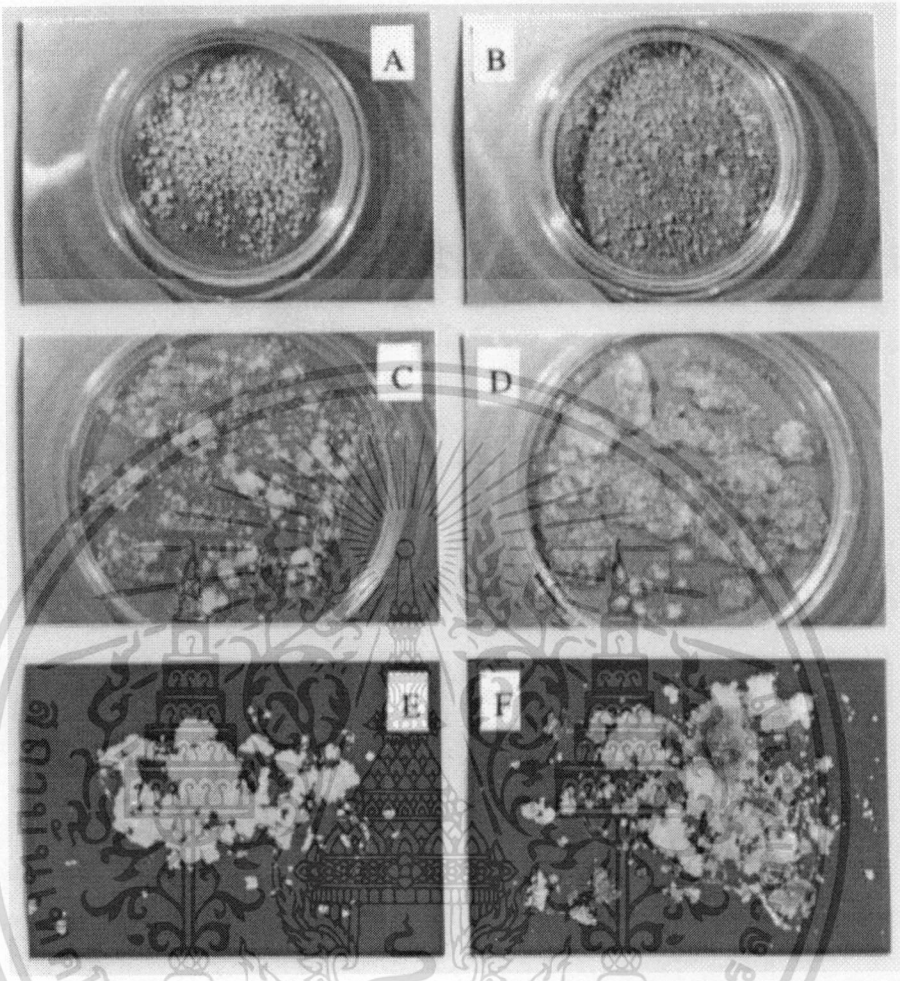
รูปที่ 9 เซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2 จะเปลี่ยนสีเมื่อบนอาหารมีเกลือ

บน บาสมาติ 370

ล่าง หอมมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

34690



รูปที่ 10 การพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอเป็นไมโครแคลลัส

ซ้าย รูป ACE บาสมาติ 370 ขวา รูปBDF หอมมะลิ 105

A-B เทเซลล์แขวนลอยผสมอาหารแข็งเลี้ยง 1-2 เดือน

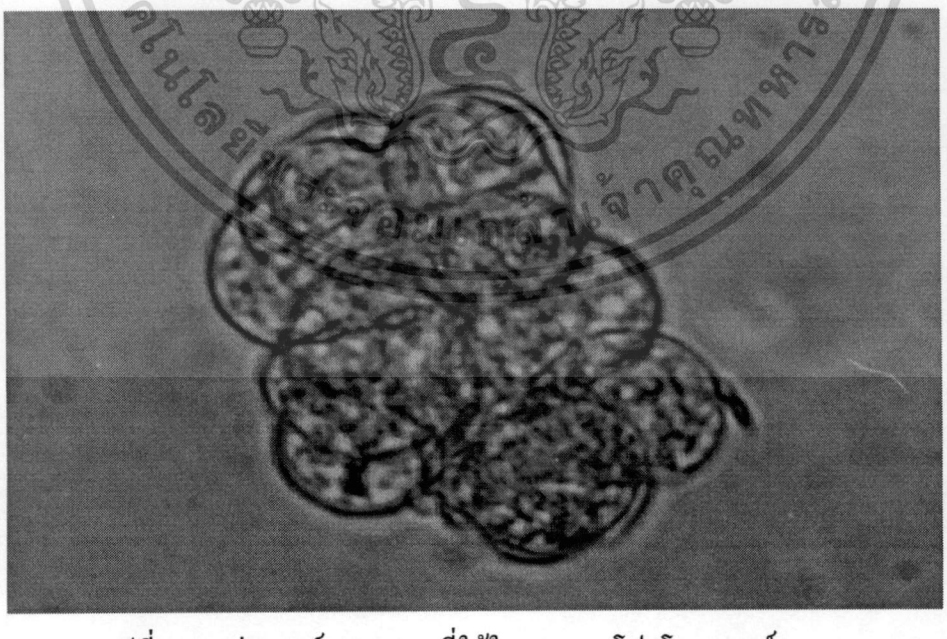
รูป C-D ตัดชิ้นวุ้นวางบนอาหารใหม่

รูป E-F การเจริญดูจากกล้องสเตริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

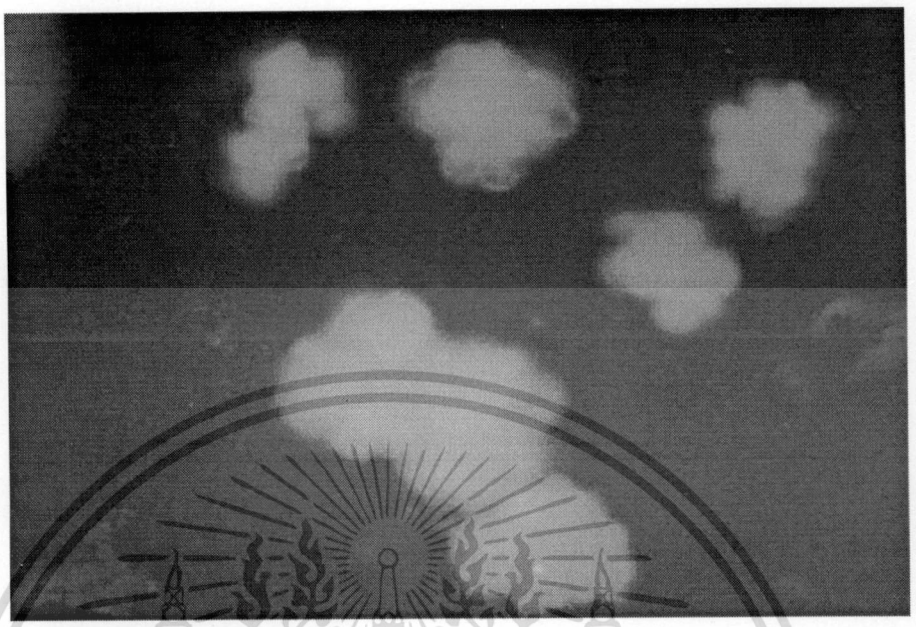
การทดลองที่ 3.3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอยของข้าว 2 สายพันธุ์ โดยนำเซลล์แขวนลอยมาศึกษาลักษณะของเซลล์แขวนลอยก่อนทำการแยกโปรโตพลาสต์ (รูปที่ 11) และ ตรวจดูการมีชีวิตโดยใช้สีย้อม Fluorescien diacetate ปรากฏว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีเหลือง-เขียว (รูปที่ 12) แยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ เซลลูเลส กับมาเซอร์โรไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 3:1 และ 2:1 ในสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.35 โมลลาร์ โปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีหลายขนาด (รูปที่ 13) และย้อมสี Colcofluor white ตรวจดูการย่อยผนังเซลล์พบว่าถูกย่อยอย่างสมบูรณ์คือไม่ติดสีย้อม (รูปที่ 14) ดูดโปรโตพลาสต์ที่อยู่ระหว่างชั้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสและสารละลาย CPW ส่วนเศษเซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด (รูปที่ 15) ตรวจสอยการมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Fluorescien diacetate ปรากฏว่าโปรโตพลาสต์ ที่มีชีวิตคือจะติดสีเหลือง-เขียว (รูปที่ 16) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 3 สูตร ได้แก่ KM-8P MS และ N_6 ที่มีเกลือระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับปริมาตรโปรโตพลาสต์ให้ได้ความหนาแน่น $2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลในการเพาะเลี้ยงภายใน 5 วันแรกพบการสร้างผนังเซลล์ (รูปที่ 17) และติดสีย้อม Clocofluor white (รูปที่ 18) ในวันที่ 5-15 วันยังมีชีวิตติดสีย้อมทุกโปรโตพลาสต์ในทุกระดับความเข้มข้นเกลือ มีการแบ่งเซลล์ (รูปที่ 19) ในวันที่ 23 พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เจริญเริ่มตาย



รูปที่ 11 กลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

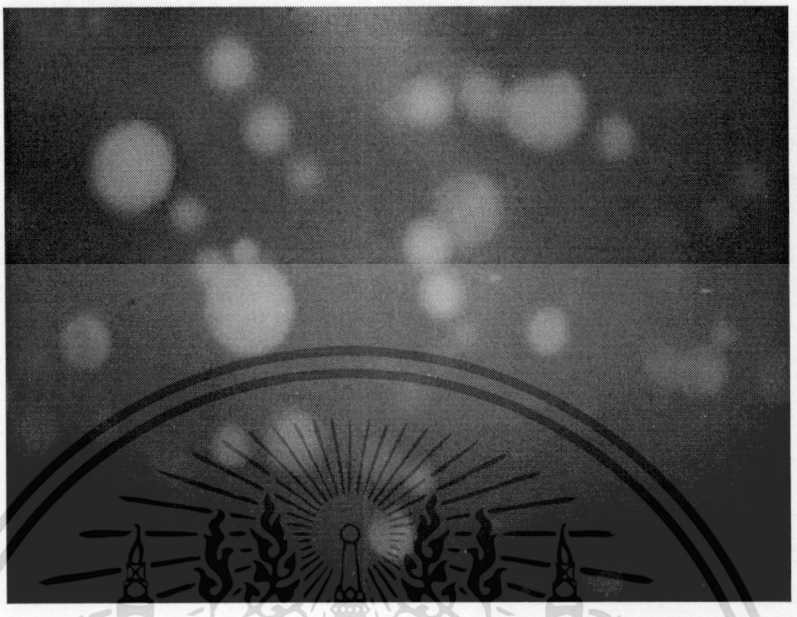
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



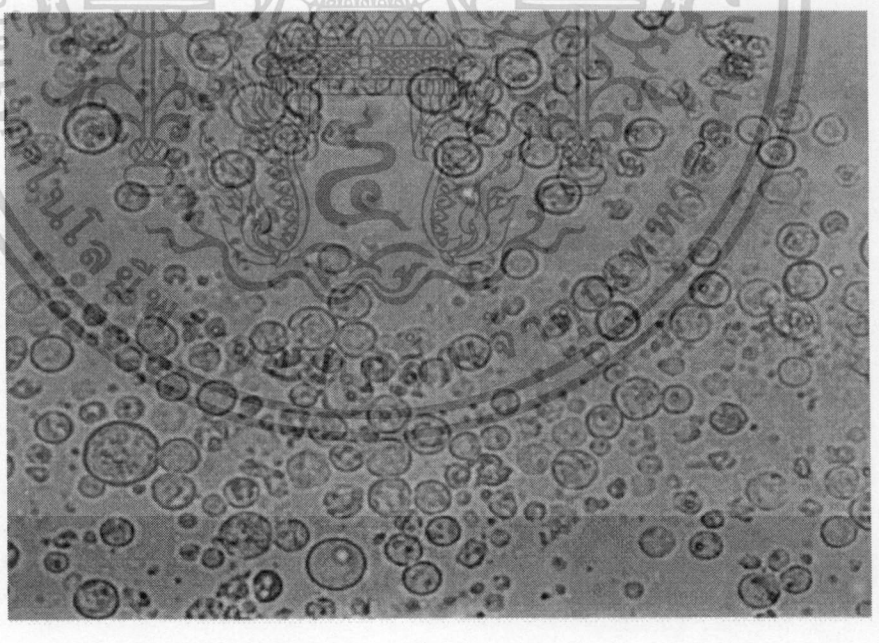
รูปที่ 12 การตรวจการมีชีวิตเซลล์แขวนลอยด้วยสีย้อม FDA เรืองแสงสีเขียว-เหลือง

รูปที่ 13 โปรโตพลาสต์มีหลายขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

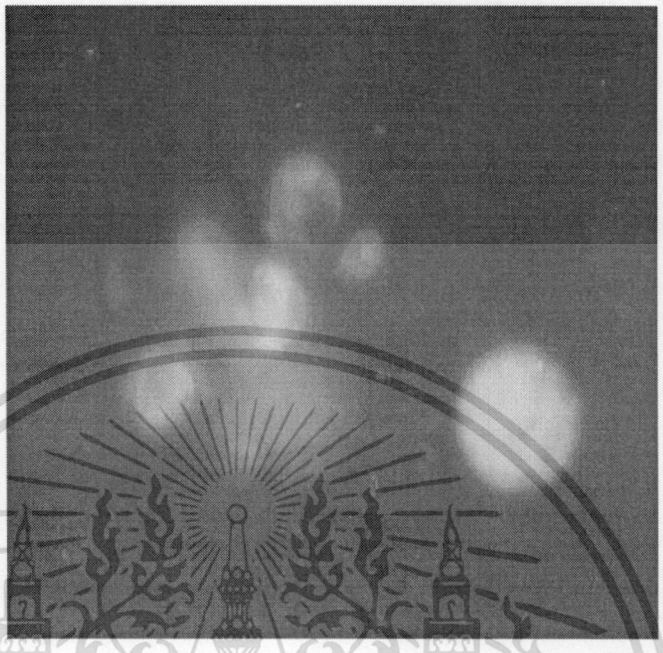


รูปที่ 16 โปรโตพลาสต์ติดสีย้อม FDA

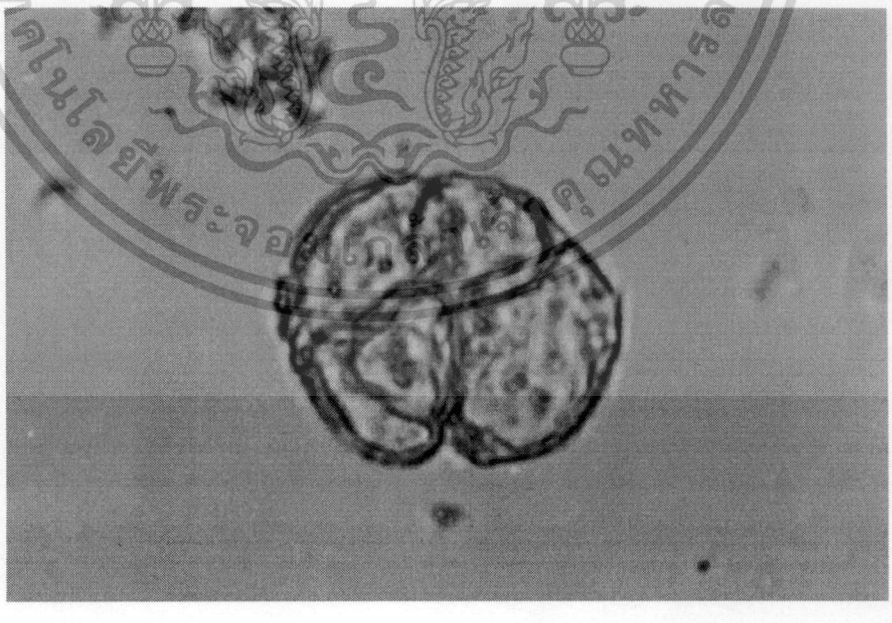


รูปที่ 17 โปรโตพลาสต์ เริ่มสร้างผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 โปรโตพลาสต์ ที่สร้างผนังเซลล์แล้ว ติดสีย้อม Clocofluor white



รูปที่ 19 โปรโตพลาสต์ที่พัฒนาขึ้นและมีแบ่งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญคือ N6 IAA 2 : BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS IAA 2 : BA 4 ตามลำดับ สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญคือ N6 BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS NAA 2 : BA2 ตามลำดับ

การทดลองที่ 2

สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอได้ในระยะเวลา 5-6 เดือน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถขยายจำนวนและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

การทดลองที่ 3

3.1 แคลลัส ข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.75 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.2 เซลล์แขวนลอย ข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.75 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.3 โปรโตพลาสต์ ข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้ประมาณนาน 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Chen, T.H., Lam, L. and Chen, S.C. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young influorescences of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell Tiss. Org. 4:51-54.

Coulibaly, M.Y. and Demarly, Y. 1986 . Regeneration of plantlets from protoplasts of rice, *Oryza sativa* L. Z. Pflanzenziichtg. 96: 79-81.

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.

Fujimura, T., Sukurai, M., Akagi, H., Negiahi, T. and Hirose A. 1985. Regeneration of rice plants from protoplasts, Plant Tissue Cultuer Letters. 2: 74-75.

Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoid from rice pollen. J. Exp. Bot. 24: 139-144.

Henke, R.R., Mansur, M.A. and Constantin, M.J. 1987. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling derived calli of rice (*Oryza sativa* L). Physiol. Plant 44: 11-14.

Koetji, D.S. Grimes, H.D., Wang, Yi-Chang and Hodges, T.K. 1989. Regeneration of Indica rice (*Oryza sativa* L.) from primary callus derived from mature embryos. J. Plant Physiol. 135: 184 190.

Kyozuka, J.,Hayashi,Y. and Shimamoto, K. 1987. High frequenc plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 206: 408-413.

Lai, K.L. and Liu, L.F. 1982. Induction and plant regeneration of callus from immature embryos of rice plants (Oryza sativa L.). Japan J. Crop sci. 41: 70-74.

Nishi, T., Yamada, Y. and Takahashi, E. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature 219: 508-509.

Oono . 1978 . Test tube breeding of rice by tissue. Acta Agron 35: 7-26

Ruey-Chih, S. Rudert, M.L. and Hodges T.K. 1992. Fertile indica and japonica rice plants regenerated from protoplasts isolated from embrogenic haploid suspension cultures. Plant cell reports. 12: 45-49.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Suenaga ,K. Abrigo EM. Yoshida S. 1982. Seed derived callus culture for selecting salt- tolerant rice I. Callus induction . plant regeneration. And variation in visible plant traits. IRRI Res Pap Ser. 79: 793-802.

Toriyama, K., Hinata, K. and Sasaki, T. 1986. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. Theor. Appl. Genet. 73: 16-19.

Vajrabhaya, M., T., Thanapaisal and T. Vajrabhaya. 1989 . Development of salt tolerant lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture . Plant Cell Rep. 8: 411-414.

Wernick, W., Brettel, R., Wakizuru, T. and Potrykus, I. 1981. Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. Z. Pflanzenphysiol. 103: 361-363.

Yamada, Y . Ogawa M. Yano S . 1983. Tissue culture in sea water increase salt tolerance of rice plant In: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press. Beijing ;IRRI. Manila. 229-235 p.

Yamada, Y., Yang, Z.Q. and Tang, D.T. 1986. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (Oryza sativa L.). Plant Cell Reports. 5:85-88.

Zhijian, L and Murai, N. 1990. Effect plant regeneration from rice protoplasts in general medium . Plant Cell Reports. 9: 216-220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่1 สารเคมีในสูตรอาหาร N_6 Chu และคณะ (1975)

Stock	Component	Concentration (mg/l)
I	$(NH_4)_2SO_4$	463
	KNO_3	2830
	KH_2PO_4	400
	MgSO47H2O	185
II	$CaCl_2.2H_2O$	166
III	$MnSO_4.H_2O$	3.33
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.50
	H3BO3	1.60
	KI	0.8
IV	Na_2EDTA	37.30
	$FeSO_4.7H_2O$	27.80
V	glcine	2.0
	Thiamine-HCI	1.00
	Pyridocxine-HCI	0.50
	nicotinic acid	0.50

L-proline	0.69	g/l
Casein hydrolysate	0.10	g/l
Sucrose	20	g/l
Phytagel	2.6	g/l

pH 5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงสารเคมีในสูตรอาหาร Murashigae and Shoog (1996) :MS

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
I	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	KH_2PO_4	170
	$MgSO_4 .7H_2O$	3700
II	$CaCl_2.2H_2O$	440
III	KI	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
	$NaMo_4.2H_2O$	0.25
IV		
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
V	Inositol	100
	Nicotinic acid	0.5
	Pyridine HCL	0.5
	Thiamine HCL	0.1
	Glycine	2

L-proline	1	g/l
Casein hydrolysate	0.10	g/l
Sucrose	30	g/l
Phytagel	2.6	g/l
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