สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ได้รับงบประมาณประจำปี 2541

ชื่อโครงการวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เป็นเป็นต้นใหม่ของข้าว
โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Efficient Plant Regeneration from Indica Rice (*Oryza sativa* L.)
by tissue culture Technique

เจ้าของโครงการวิจัย

อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
SB
191
.R5
ว1995

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33294
วัน, เดือน, ปี 21 ก.ค. 2542

T033294

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำการเป็นต้นใหม่ของข้าวโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อ

Efficient Plant Regeneration from Indica Rice (*Oryza sativa* L.) by tissue culture Technique

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ในอาหารแข็งสูตร NB ที่เติมสาร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือสูตร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลิกรัมต่อลิตร และศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วยสาร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำตาลมอลโตส 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ช่วงเวลา 6-16 วัน เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะในการนำไปแยกโปรโตพลาสต์

นำเซลล์แขวนลอยมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าที่ความเข้มข้นแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อเอนไซม์เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 4 ชั่วโมง จะแยกได้โปรโตพลาสต์ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร NBR ที่ประกอบด้วย แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร NAA 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ในสูตรอาหารทุกสูตรใกล้เคียงกัน

Abstract

Seeds of Leuang Pra-tew 123 were cultured on NB medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D , 1 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate , 20 g/l sucrose, 2.6 g/l phytagel 0.5 1.0 and 1.5 mg/l NAA. The suitable callus induction on NB medium containing 1 mg/l NAA . Growth curve was N_6 medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 2 mg/l maltose optimal stage at 6-16 days for active cell and suitable for protoplast isolation.

The concentration of 0.4 M mannitol and combination of enzyme cellulase 1.5 % pectinase 0.5 % at 4 hour for the best protoplast isolation. Protoplast was cultured on NBR medium supplemented with 1 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate, 20 g/l sucrose , 0.1 0.25 and 0.5 mg/l NAA. Protoplast were cell wall and division in the same medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L) เป็นอาหารหลักประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรโลก และมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของข้าวที่ถูกผลิตและบริโภคอยู่ในทวีปเอเชีย สำหรับประเทศไทยถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทยอย่างมาก ประชากรอย่างน้อย 1 ใน 3 ของไทยมีอาชีพการทำนา ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ได้มีการปรับปรุงข้าวให้มีคุณภาพดี ผลผลิตสูง ทนต่อสภาพแวดล้อมและต้านทานโรค โดยใช้เทคนิคต่างๆมากมาย และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาต่างๆในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลักษณะตามต้องการ ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของข้าวได้เจริญก้าวหน้าไปมาก เช่นการเพาะเลี้ยงเอมบริโออ่อน เอมบริโอแก่ ละอองเกสรอับเรณู เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสต์ ในปัจจุบันมีการย้ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อโดยวิธีต่างๆเช่น electroporation particle bombartment และ somatic hybridizer ข้าวพวก Japonica สามารถชักนำให้เป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ แต่ในพวก Indica ยังมีปัญหาอยู่มาก Poeaim และ คณะ (1995) รายงานว่าในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่เติมแอล-โพรลีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ดี Ella และ Zapata (1993) รายงานเกี่ยวกับการเติมแอล-โพรลีน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิคาจะช่วยในการเจริญของแคลลัส และเซลล์ที่เกิดใหม่จะหลุดออกจากแคลลัสเดิมได้ง่าย Poeaim และ คณะ (1996) รายงานว่าการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับนำเซลล์ไปเลี้ยงเป็นต้นใหม่และการแยกโปรโตพลาสต์ ส่วน Utomo และ คณะ(1995) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวอเมริกา 5 พันธุ์ คือ Mercury Lacassine Maybelle Cypress และ Lemont สามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

วัตถุประสงค์ของ

1. ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงให้เป็นแคลลัส
2. ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และหาระยะการเจริญเติบโต
3. ศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

อนุรักษ์ และ นิตย์ศรี (2542) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารแข็งสูตร NB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เลือกแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่น ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 และ R_2 ที่ประกอบด้วยกลูโคส และน้ำตาลมอลโตส 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7-15 วัน ประมาณ 3-4 เดือน จะได้เซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอ สามารถเพิ่มจำนวนได้มากและรวดเร็ว นำเซลล์แขวนลอยที่เติบโตเป็นไมโครแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NBR ที่ประกอบด้วย NAA 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสามสูตรสามารถชักนำให้เกิดจุดเขียวและสามารถเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้

อนุรักษ์ และ นิตย์ศรี (2539) การเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ในสูตรอาหาร MS และ N_6 ที่เติม 2,4-D และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุดคือ สูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 4-10 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยใช้ความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.35 โมลาร์ เอนไซน์เซลลูเลส 3 เปอร์เซ็นต์ กับเอนไซน์มาเซอร์โรไซน์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 8.75×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM-8P MS และ N_6 ภายใน 3-4 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ในอาหารทั้ง 3 สูตร และในสูตร KM-8P มีการแบ่งเซลล์มากกว่าในสูตรอาหาร MS และ N_6 หลังจากเพาะเลี้ยงไป 3 สัปดาห์พบว่าเซลล์ยังมีชีวิต

Wang และคณะ (1987) พบว่าข้าวป่าสายพันธุ์ *Oryza parennis* สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้จะเกาะตัวกันแน่น (compact callus) จากนั้นเมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการ subculture 10 ครั้ง ในระยะเวลา 12 เดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเกิดต้นจะลดลง เมื่อ subculture ครั้งที่ 6 ถึง 10 โดยจะลดลงจาก 80 เปอร์เซ็นต์เหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vajrabhaya และคณะ (1989) รายงานถึงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเหลืองประทิว เพื่อให้ทนเค็ม โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกเอาเฉพาะ embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารสูตร White ดัดแปลงที่เติม $(NH4)_2SO_4$ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 24+3 องศาเซลเซียส

Boissot (1990) ได้ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนและเมล็ดข้าวป่าพันธุ์แอฟริกัน (*Oryza longistaminate*) เมื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 9 ไมโครโมล โดยเลี้ยงไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเกิดแคลลัสได้ดี จากนั้นนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.27 ไมโครโมลและ BAP 2.2 ไมโครโมล เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าภายใน 4 สัปดาห์ แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ 20 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าเปอร์เซ็นต์ในการชักนำให้เกิดเป็นต้นจะลดลงเมื่อเปลี่ยนอาหารให้แคลลัสในครั้งที่ 3 โดยจะลดลง 12.5 เปอร์เซ็นต์

Nishi และคณะ (1968) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดข้าวพันธุ์ Kyoto Ashi โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในสูตรอาหาร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10^{-5} โมล หลังจากเลี้ยงได้ 2 เดือน นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากออกซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 เดือน โดยใช้แคลลัสขนาด 10 มิลลิกรัม พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ถ้าทำการเปลี่ยนอาหาร 1 และ 2 ครั้ง ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่จะลดลงเหลือ 91 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อย้ายต้นใหม่ออกปลูกในสภาพที่มีแสง อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเมื่อย้ายต้นข้าวปรับสภาพได้แล้วย้ายออกมาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าต้นข้าวบางต้นมีลักษณะผิดปกติ เช่น ต้นเตี้ย ใบหงิกงอ แต่เมื่อนำรากมาตรวจโครโมโซม พบว่ามีจำนวนโคโมโซมเท่าเดิมคือ 2n = 24 จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นบนโครโมโซม

Dayuan Wang , Paul D . Miller และ Maro R. Sondaht (1989) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าว 3 genotype คือ B_1 (advanced breeding line of Indica type rice)

C_1 (Japoniga type cytoplasmic male sterile rice)

C_3 (Wild Abortive cytoplasmic male sterile rice)

เซลล์แขวนลอยเตรียมได้จากการเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับชักนำให้สร้างแคลลัสจากนั้นย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลว N_6 ที่มี 2,4-D 1.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Zeatin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที 28 องศาเซลเซียสในที่มืด จากนั้นเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 5-7 วันจะได้เซลล์แขวนลอยที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์ไทยพันธุ์เหลืองประทิว 123
2. สารเคมีต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. เอมไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยพนังเซลล์ เช่น เซลลูเลส และ เพคติเนส
4. สีย้อมตรวจสอบโปรโตพลาสต์ เช่น FDA และ Evan's blue
5. อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรองแบคทีเรีย
6. เครื่องแก้วต่างๆ
7. อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
8. กล้องและอุปกรณ์การถ่ายภาพพร้อมฟิล์มและฟิล์มไสลด์
9. วัสดุอุปกรณ์สำนักงานต่างๆ
10. ตู้ Lamina air flow
11. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
12. เครื่องเขย่า
13. เครื่องเซนติฟิวส์
14. หม้อนึ่งความดัน
15. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
16. กล้อง Inverted microscope
17. กล้อง Fluorescent microscope

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวเจริญเป็นแคลลัส

นำเมล็ดข้าวมาแกะเอาเปลือกออก นำไปล้างโดยผ่านน้ำไหลและล้างด้วยคลอร็อกซ์ จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween 20) จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นครั้งคราว นาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร NB ที่ประกอบด้วย N_6 ธาตุอาหารหลัก B_5 ธาตุอาหารรอง B_5 วิตามิน เดซินไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวม 3 สูตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 2 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยโดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ในแต่ละระยะเวลา คือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 และ 20 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ขวด ในแต่ละระยะเวลา โดยแต่ละขวดมีปริมาณเซลล์แขวนลอย 0.25 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร N_6 มอลโตส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงโดยนำขวดมาวางในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาตามกำหนดจะทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังนี้

2.1 หาน้ำหนักกระดาษกรอง Whatman No. 1 ให้คงที่ โดยนำกระดาษกรองมาใส่ในจานแก้ว แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ บันทึกน้ำหนักของกระดาษกรอง (A)

2.2 เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง ทำการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยระบบสูญญากาศ ล้างเซลล์ที่อาจติดค้างอยู่ในขวดรูปชมพู่ ด้วยน้ำกลั่น

2.3 ชั่งน้ำหนักเซลล์และกระดาษกรอง บันทึกน้ำหนัก (B)

2.4 นำกระดาษที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง และทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

2.5 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้ง แล้วไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง โดยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกผลน้ำหนัก (C)

2.6 นำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ขวดที่ได้มาเขียนกราฟ และหาสมการความสัมพันธ์ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา

2.7 ค่าน้ำหนักสด (fresh weight) = (B) - (A)

ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) = (C) -(A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร NB ที่ประกอบด้วย N6 ธาตุอาหารหลัก B_5 ธาตุอาหารรอง B_5 วิตามิน เคซินไฮโดรไลเลต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวม 3 สูตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส N_6ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส R_2ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 4 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย เคซินไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลิน 1 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงโดยการเทผสมรวมกันระหว่างเซลล์แขวนลอยที่มีลักษณะละเอียดกับอาหารเลี้ยงในแต่ละสูตร พร้อมทั้งเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ แขวนลอย

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 4.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์

4.1.1 ชั่งเซลล์แขวนลอยให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม

4.1.2 นำสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ กับเอนไซม์เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย CPW และแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ คือ 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกันกับเซลล์แขวนลอย แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อที่จะหาช่วงเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม

4.1.3 ทำการนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4.2 การหาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่เหมาะในการแยกโปรโตพลาสต์

4.2.1 ชั่งเซลล์แขวนลอยให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม

4.2.2 นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 3 ความเข้มข้น คือ 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ กับ เอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย CPW และแมนนิทอลที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 4.1 นำมาผสมรวมกันกับเซลล์แขวนลอย แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่งโมง ตามลำดับ เพื่อหาช่วงระยะเวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม

4.2.3 นับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

การทดลองที่ 5 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

1. นำเซลล์แขวนลอยของข้าวน้ำหนัก 0.9 กรัมของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอาหารเหลว N_6ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร ที่ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7-15 วัน

2. นำเซลล์แขวนลอย ตรวจดูการมีชีวิต โดยย้อมด้วย Fluorescien diacetate (ดังรูปที่ 2)

3. นำเซลล์แขวนลอยแช่ในสารละลาย CPW ที่มี แมนนิทอล 0.4 M 30 นาที

4. ดูดสารละลาย CPW ออก แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ เซลลูเลส กับเอนไซม์เพคทิเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นดังการทดลองที่ 4.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น mannitol 0.4M ปิด plate ด้วย parafilm

5. นำไปวางในที่มืดบนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

6. ดูดสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ แยกออกมา กรองผ่านที่กรอง ขนาด 80 ไมโครเมตร ที่บรรจุในหลอดทดลองสำหรับนำไปเหวี่ยงที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที

7. ดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้ง

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

9. แยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ โดยใส่สารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย CPW 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะได้ชั้นของโปรโตพลาสต์อยู่ระหว่างชั้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสและสารละลาย CPW ส่วนของเศษเซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ต้นหลอด ดูดโปรโตพลาสต์ออกมาโดยใช้ปิเปต

10. ล้างโปรโตพลาสต์ออกด้วยสารละลาย CPW 2 ครั้ง เพื่อทำให้โปรโตพลาสต์สะอาด แยกโปรโตพลาสต์โดยนำไปปั่นที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ดูดสารละลาย CPW ออก

11. ดูการมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Fluorescien diacetate และสีย้อม evan blue

12. ปรับปริมาตรของโปรโตพลาสต์เป็น 1 มิลลิลิตร สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจนับ ปรับปริมาตรอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น$2*10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรเพื่อนำไปเลี้ยงต่อไป

13. ใส่อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 3 สูตร ได้แก่ สูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วยเควีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ปรับปริมาตรของโปรโตพลาสต์เป็น 1 มิลลิลิตร

14. ใช้ pasteur pipette ดูดโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงใน plate plastic

15.ปิดด้วย parafilm และเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 $\pm$2C หลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

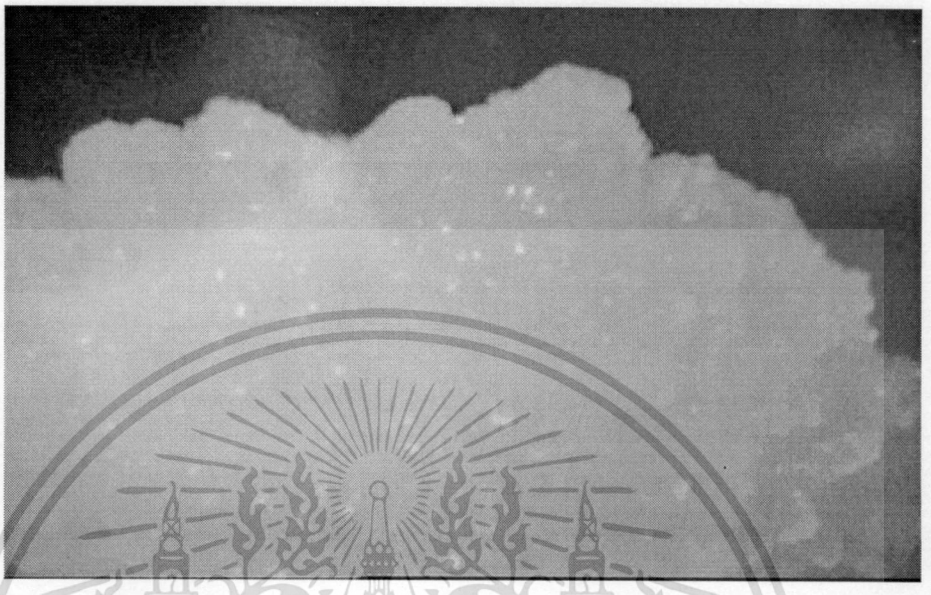
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 เจริญเป็นแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารสูตร สูตร NB ที่ประกอบด้วย N_6 ธาตุอาหารหลัก B_5 ธาตุอาหารรอง B_5 วิตามิน เคซินไฮโดรไลเลต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวม 3 สูตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไปประมาณ 3-4 วัน พบว่าในอาหารแต่ละสูตรจะมีการงอกของต้นกล้าบริเวณคัพภะ และภายในหนึ่งสัปดาห์จะสังเกตเห็นแคลลัสเกิดขึ้นในสูตรอาหารที่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสีเหลืองอ่อนประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กๆ มีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus) (รูปที่ 1) และแบบที่เซลล์เกาะกันหลวมๆ (friable callus) บางแคลลัสพบว่าจะมีทั้งสองลักษณะอยู่รวมกัน ในสัปดาห์ต่อมาแคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและในสูตรอาหารที่มี NAA ในทุกระดับความเข้มข้นจะพบการเจริญของรากจากก้อนแคลลัส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ สังเกตพบการเจริญของแคลลัสเพิ่มขึ้นในทุกสูตร โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 คือ สูตรอาหาร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร(ตารางที่1)



รูปที่1 ลักษณะของแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus)

ตารางที่1 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดความกว้างของแคลลัส(ม.ม.) ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

ระดับความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัม/ลิตร)ในสูตรอาหาร NB	plate1	plate2	plate3	plate4	plate5
0.5	3.67	3.48	3.5	3.38	2.95
1	5.09	4.85	4.88	3.73	3.52
1.5	2.08	1.88	2	1.14	2.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาการหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย (รูปที่ 2)ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N_6ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25±2 องศาเซลเซียสและทำการวัดหาค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในแต่ละระยะเวลาคือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 และ 20 วัน ตามลำดับ เมื่อนำผลที่วัดค่าน้ำหนักแห้งและค่าน้ำหนักสด (ตารางที่ 2) มาเขียนกราฟการเจริญพบว่าเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-16 วัน (รูปที่3 และ 4) ซึ่งช่วงที่เซลล์แขวนลอยมีการเจริญอย่างรวดเร็วจะเป็นช่วงที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์และทำการเปลี่ยนอาหารใหม่

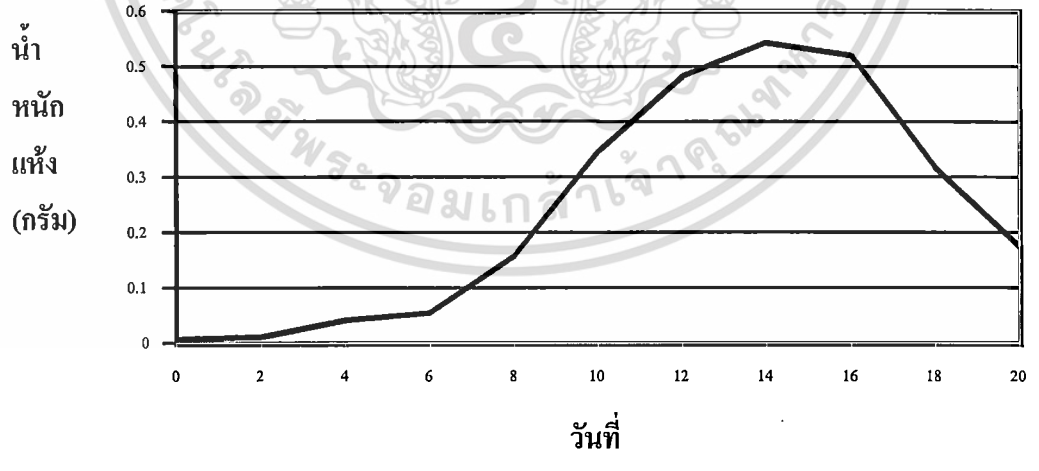
รูปที่ 2 ลักษณะของเซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของ
ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสด

วันที่	น้ำหนักแห้ง(กรัม)	น้ำหนักสด(กรัม)
0	0.0067	0.1775
2	0.0115	0.2135
4	0.0415	0.2895
6	0.055	0.5085
8	0.157	0.5475
10	0.345	0.797
12	0.481	0.9585
14	0.542	1.164
16	0.5201	1.145
18	0.317	0.7485
20	0.1746	0.5013

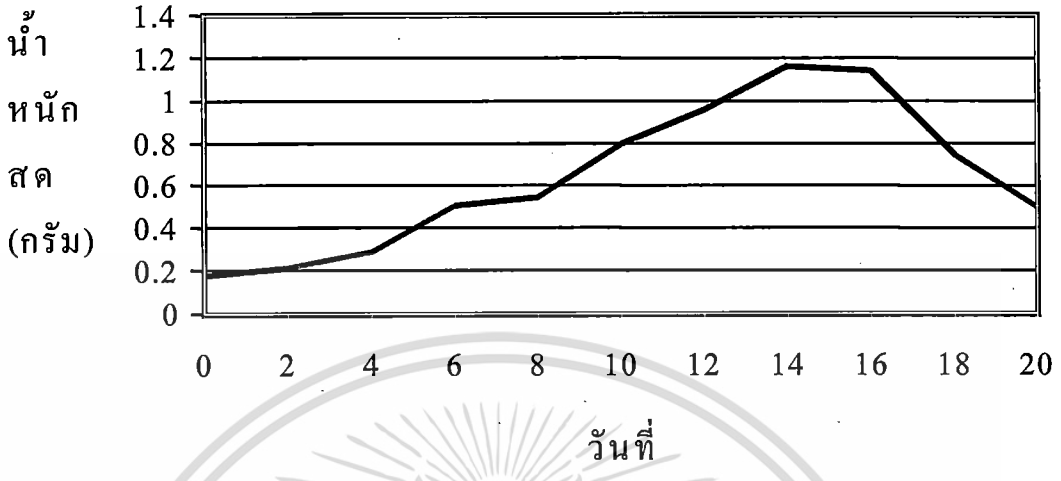
กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123
โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง



รูปที่3 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123
โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยวิธีหาน้ำหนักสด

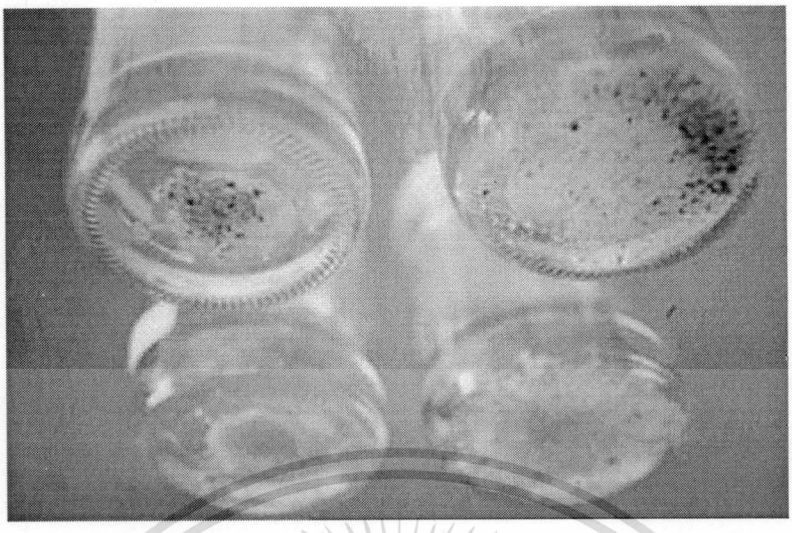


รูปที่4 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยวิธีหาน้ำหนักสด

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษาการพัฒนาของไมโครแคลลัสของข้าวโดยการนำเซลล์แขวนลอยมาเลี้ยงผสมในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลมอลโตส R_2ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ น้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซินไฮโดรไลเซส 0.1กรัมต่อลิตร และแอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 4 สูตร พบว่าสูตร N_6 ที่น้ำตาลมอลโตส สามารถเกิดการพัฒนาของไมโครแคลลัสได้ดีที่สุด โดยไมโครแคลลัสจะมีขนาดเซลล์เล็ก และละเอียด ส่วนใน R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส เซลล์ของไมโครแคลลัสจะมีลักษณะใหญ่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นเอมบริโอเจนิค ส่วนใน R_2ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสไม่พบความแตกต่างระหว่างแต่ละสูตรอาหาร เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ไมโครแคลลัสทั้ง 4 สูตร พบว่าสูตร N_6ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส จะดีกว่าสูตร R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส และสูตร R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสจะดีกว่าสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และสูตร N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจะดีกว่าสูตร R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 5) และตรวจดูด้วยกล้องสเตอริโอมีลักษณะสีเหลืองนวล ขนาดสม่ำเสมอ (รูปที่ 6) เมื่อตรวจดูการมีชีวิตพบว่าเซลล์มีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย fluorescent diacitate จะติดสีเหลือง-เขียว (รูปที่ 7)

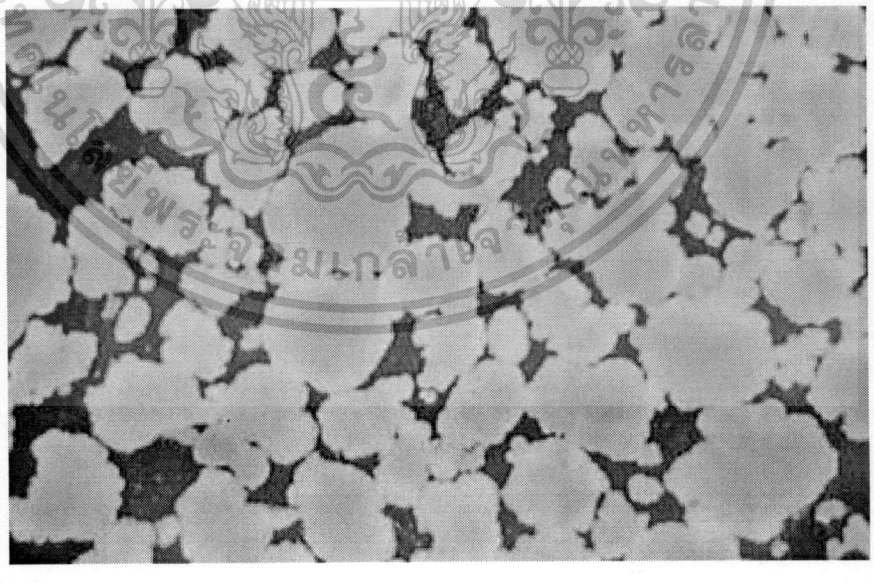
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวต่างๆของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

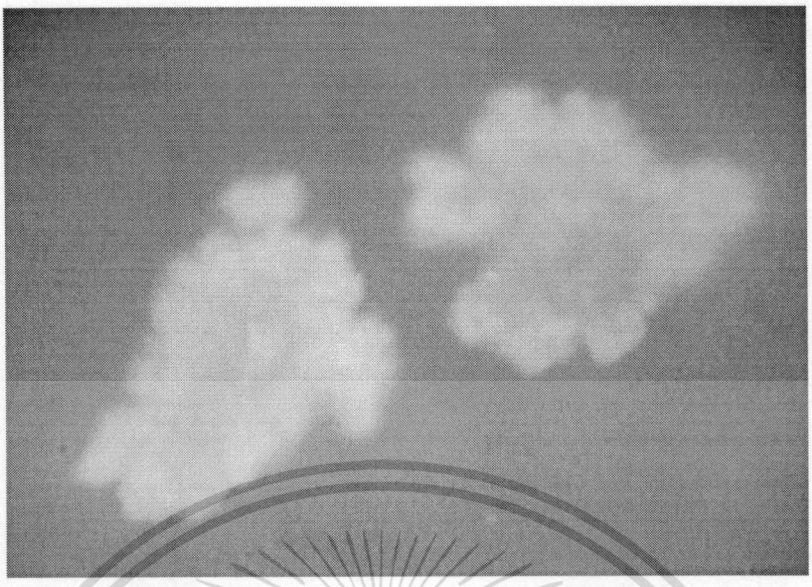
ก. R_2 maltose ข. N_6 maltose

ค. R_2 glucose ง. N_6 glucose



รูปที่ 6 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอภายใต้กล้องสเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตที่ย้อมด้วย fluorescent diacitate

ผลการทดลองที่ 4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

การทดลองที่ 4.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรตพลาสต์

จากการศึกษาหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกับเซลล์แขวนลอย ทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นที่ 0.4 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีสภาพที่เหมาะสม

การทดลองที่4.2 การหาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของข้าว

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยนำสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ1.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์แพคติเนสที่ความเข้มข้น 0.5เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมรวมกับเซลล์แขวนลอย สารละลาย CPW และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของข้าว จะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์แพคติเนส 0.5เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3 แสดงอัตราส่วนเอนไซม์เซลลูเลสและ เพคติเนสในการแยกโปรโตพลาสต์

เอนไซม์	เวลา (ชั่วโมง)				
Cellulase: Pectinase	2	3	4	5	6
1.5 : 0.5	39.16	46.65	72.90	40.82	21.65
1.0 : 0.5	27.07	34.15	37.90	15.40	20.40
0.5 : 0.5	19.15	20.40	12.50	10.00	15.00

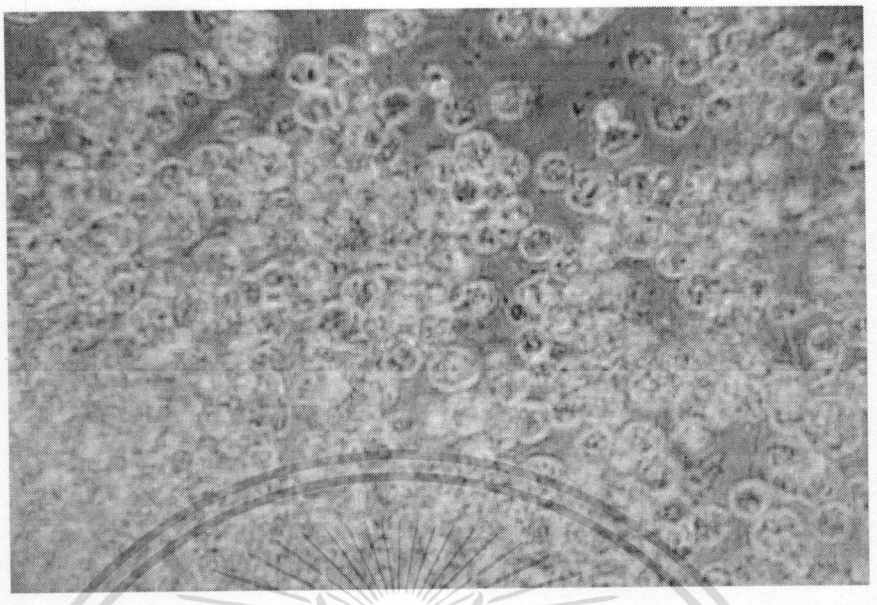
การทดลองที่ 5 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

จากการทดลองทำการแยกโปรโตพลาต์จากเซลล์แขวนลอยโดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสกับเพคติเนสที่ความเข้มข้น 1.5:0.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์พบว่า ในความเข้มข้นเอมไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนสที่ความเข้มข้น 1.5:0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดพบว่า เมื่อทำการตรวจดูโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลมสมบูรณ์ และมีหลายขนาด (รูปที่ 8) โปรโตพลาสต์จะไม่มีคลอโรพลาสต์ และจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น และจะรักษาและคงตัวอยู่ได้ เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการปั่นในสารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ จะได้โปรโตพลาสต์ลอยอยู่ในชั้นของน้ำตาลซูโครส (รูปที่ 9) จะได้โปรโตพลาสต์ที่สะอาด เมื่อนำโปรโตพลาสต์มาตรวจดูการมีชีวิตโดยย้อมด้วยสี evan blue พบว่ามีบางโปรโตพลาสต์มีการติดสีน้ำเงินซึ่งแสดงว่าโปรโตพลาสต์มีการตาย แต่ถ้าไม่ติดสีแสดงว่าโปรโตพลาสต์มีชีวิต (รูปที่ 10)

นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วยเคซินไฮโดรไลเซส 0.1 กรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วยแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ การเลี้ยงในอาหารเหลว โดยทำการเลี้ยงในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิในช่วง 25±2 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไป 1-2 วัน พบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในทุกสูตรอาหาร (รูปที่ 11 และ 12) และเมื่อเปรียบเทียบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ระหว่างสูตรอาหาร 3 สูตร ได้ว่าอาหารทุกสูตรสามารถเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้ใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

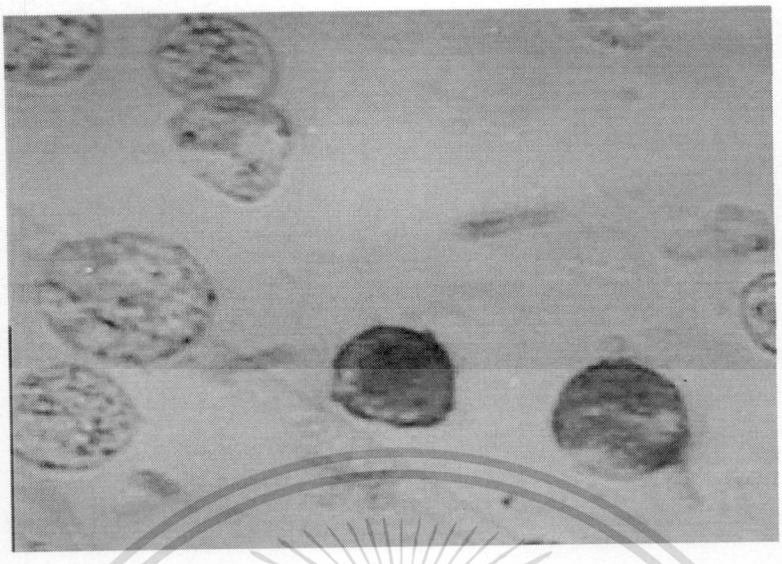
33294



รูปที่ 8 โปรโตพลาสต์ที่อยู่รวมกับเศษเซลล์

รูปที่ 9 โปรโตพลาสต์ลอยอยู่ในชั้นของน้ำตาลซูโครส

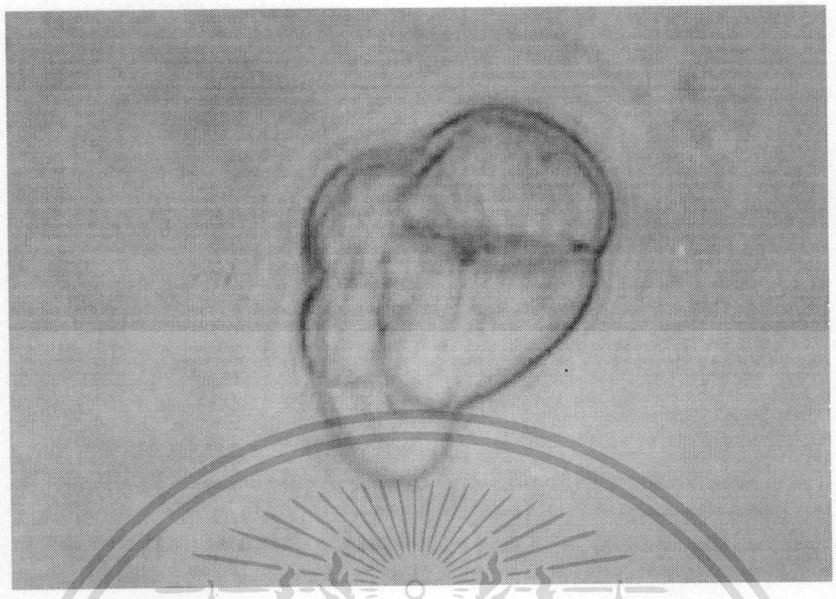
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตย้อมด้วย Evan's blue

รูปที่ 11 ลักษณะการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 ลักษณะการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวเจริญเป็นแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว123

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ให้กลายเป็นแคลลัส คือ อาหารสูตร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 2 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เซลล์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารใหม่และการนำมาทำการแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

ในการหาสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 พบว่าอาหารสูตร N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส N_6ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสสูตร R_2ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และสูตร R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซินไฮโดรไลเซส 0.1 กรัมต่อลิตร และแอลโพลีน 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารทั้งหมด 4 สูตรพบว่า สูตร N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส เหมาะแก่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมากที่สุด เนื่องจากเซลล์ที่ได้มีลักษณะเล็กละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ และการหาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่เหมาะในการแยกโปรโตพลาสต์

สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าว คือที่ความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เพกติเนส เป็น 1.5 ต่อ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง

การทดลองที่ 5 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าว สามารถแยกโปรโตพลาสต์ในปริมาณมากพอสมควร และ เมื่อทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยในสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วยเคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วยแมนนิทอล 0.4 โมลลาร์ อาหาร 3 สูตรโดยแต่ละสูตรทำการเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ภายใน 3-4 วัน และพบว่ามีการแบ่งเซลล์ได้ใกล้เคียงกันในอาหารทุกสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2539. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 หน้า 70-79

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2542. การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 37, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (เล่มเต็มจะเสร็จสมบูรณ์ปลายเดือนมิ.ย.)

Boissot,N., M.Valdez and E. Guiderdomi. 1990. Plant regeneration from leaf and seed derived calli and suspention culture of the African perennial wild rice, *Oryza longistaminata*. Plant Cell Rep. 9 : 447-450.

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.

Ella, E. S. and F.J. Zapata. 1993. Suspension initiation in indica rice requires proline. IRRN.Vol 18:1 17-18.

Poeaim, A., N. Sangduen, S.Pongchareankit, W, Boonmee and W. Kaewbunsong. 1995. Growth curve of KHAO-DAWK-MALI 105 rice (*Oryza sativa* L .) Suspension Culture. p204. In International conference on Biotechnology Research and Application for Sustainable in Development. Chulabhorn Research Institute, (BRASD) August 7-10, Bangkok. (poster).

Poeaim, A., and N. Sangduen. 1996. Protoplast Isolation and Culture from Cell Suspension Culture by using KHAO-DAWK-MALI 105 Rice Callus (*Oryza sativa* L.). p 115. abstracts of the Third Asia - Pacific Conference on Agricutural Biotechnology : Issues and Choices. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA) .November 10-15. Prachuapkhirikhan, Thailand.

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.

Wang, D., P.D. Miller, and M.R. Sondalh. 1989. Plant Regeneration from Protoplast of Indica Type Rice and CMS Rice. Plant Cell Report. 8: 329-332.

Wang,M.S., F.J. Zapata and D.C. De Castro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). Plant Cell Rep. 6: 294-296.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yin Y., S. Li, Y. Chen, H. Guo, W. Tian, Y. Chen, and L. Li. 1993. Fertile Plant Regeneration from Suspention Culture-derived Protoplast of an Indica Type Rice (Oryza sativa L.32). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: 61-68.

Yutomo, H.S, Croughan, S.S and T.P.Croughan . 1995. Suspension and protoplast culture of U.S. rice cultivars. Plant Cell Reports 15: 34-37.

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
KH2PO4	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

ตารางผนวกที่3 สารเคมีในสูตรอาหาร NBR

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร)
N6 Macro-nutrients (Chu et al.. 1975)	
KNO_3	2830
$(NH_4)_2SO_4$	463
$CaCl_2.2H_2O$	166
$MgSO_4 .7H_2O$	185
KH_2PO_4	400
B5 Micro-nutrients	
KI	0.75
H_3BO_3	3
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$MnSO_4.H_2O$	10
$ZnSO_4.7H_2O$	2
$Na_2Mo_4.5H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
B5 vitamines	
Inositol	100
Nicotinic acid	1
Pyridoxine HCL	1
Thiamine HCL	10
Caseine hydrolysate	300
L-Proline	500
Sucose	20,000
NAA	VARY
BAP	3
Kinetin	1
Phytagel	2.6
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่4 สารเคมีในสูตรอาหาร NB

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร)
N6 Macro-nutrients (Chu et al.. 1975)	
KNO_3	2830
$(NH_4)_2SO_4$	463
$CaCl_2.2H_2O$	166
$MgSO_4 .7H_2O$	185
KH_2PO_4	400
B5 Micro-nutrients	
KI	0.75
H_3BO_3	3
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$MnSO_4.H_2O$	10
$ZnSO_4.7H_2O$	2
$Na_2Mo_4.5H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
B5 vitamines	
Inositol	100
Nicotinic acid	1
Pyridoxine HCL	1
Thiamine HCL	10
Caseine hydrolysate	300
L-Proline	500
Sucose	20,000
NAA	VARY
Phytagel	260
$_pH$	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 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 6 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	5.8	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้