สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระบบการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นาย กานดิษฎ์ ทวีทรัพย์ รหัส 37054304
นาย วิษณุ ศรีสวาท รหัส 37054359

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ปท.
ก432ร
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30615
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

Regeneration system in rice (*Oryza sativa* L.) by tissue culture

Karnadit Taweesup **37054304**
Wissanu Srisawart **37054359**

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1997

เรื่อง **ระบบการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**
Regeneration system in rice (Oryza sativa L.) by tissue culture

โดย นาย กานดิษฏ์ ทวีทรัพย์ รหัส 37054304
นาย วิษณุ ศรีสวาท รหัส 37054359
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

____________________ หัวหน้าภาค
(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

____________________ ประธานกรรมการ
(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

____________________ กรรมการ
(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

____________________ กรรมการ
(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ระบบการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของข้าวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
นักศึกษา	1. นายกานดิษฐ์ ทวีทรัพย์	37054304
	2. นายวิษณุ ศรีสวาท	37054359
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2540	

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และหอมมะลิ 105 ในอาหารแข็งสูตรNBที่เติมสาร2,4-D และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำคือสูตรNBที่ระดับความเข้มข้นของNAA 1.0 มิลิกรัมต่อลิตรส่วนในพันธุ์หอมมะลิ105 ระดับความเข้มข้นของNAAทุกสูตรมีความสามารถใกล้เคียงกัน จากการศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123ที่เลี้ยงในอาหารเหลวN6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าที่ช่วงเวลา 6-16 วันเป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะใการนำไปแยกโปรโตพลาสต์

เมื่อนำไมโครแคลลัสของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 หอมมะลิ 105และบาสมาติ 370จากอาหารแข็งสูตรNBในสูตรต่างๆข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อหาอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยพบว่าในอาหารทั้ง 4 สูตรคือN6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส N6ที่ประกอบด้วยน้ำกลูโคส R2ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส R2ที่ประกอบด้วยน้ำกลูโคส พบว่าอาหารที่เหมาะสมคือ N6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส รองลงมาคือ R2ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาศึกษาเพื่อชักนำไมโครแคลลัสให้เป็นต้นในอาหารแข็งสูตร NBRประกอบด้วย BAP ไคนิติน NAAที่ระดับคามเข้มข้น 0.1 0.25และ 0.5มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าอาหารแข็งสูตรที่เหมาะสมคือNBR 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยของข้าวมาศึกษาหาความเข้มข้นของแมนนนิทอลและอัตราส่วนของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส ต่อเอนไซม์เพคติเนส พบว่าข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ที่ความเข้มข้นแมนนิทอล 0.4 โมลาร์อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลส ต่อเอนไซม์เพคติเนส 1.5 ต่อ0.5เปอร์เซนต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์อาหารแข็งสูตร NBRที่ระดับความเข้มข้น NAA 0.1 0.25 และ0.5มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.4 โมลาร์พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ในสูตรอาหารทุกสูตรใกล้เคียงกัน

Special Project Title: Regeneration system in rice (Oryza sativa L.) by tissue culture

NAME Karnadit Taweesup 37054304

Wissanu Srisawart 37054359

Special Project Advisor Anurug Poeaim

Department Applied Biology

Academic Year 1997

ABSTRACT

Seed of Leuang pra-tew 123 and Mali 105 were cultured on NB medium supplement of 2,4-D and NAA 0.5 1.0 and1.5 mg/l. The suitable callus induction medium of Laengtil123 was NB medium containing 1 mg/l NAA and the other was NB medium not different. Growth curve was estiblished from Leuang pra-tew123 to optimal stage at 6-16 days for cell active cell can do protoplast isolation.

Solid medium which is suitable culture for cell suspension of Leuang pra-tew123 Mali105 and Basmati370. The most suitable solid medium is N_6 containing maltose. R_2 containing maltose is more suitable than R_2,N_6 containing glucose.

Medium was developed for regeneration from cell suspension of Leuang pra-tew123. Cell suspension of Leuang pra-tew123 was cultured on NBR medium suplement of NAA 0.1 0.25and 0.5. The suitable regeneration medium of Leuang pra-tew 123 was NBR medium containing 0.1 mg/l NAA.

Condition was developed for isolated protoplasts from cell suspension of Leuang pra-tew 123. The Enzyme combination between ratios cellulose (1%) and pectinase 0.5% (1.5:0.5) CPW mannitol(0.4 0.5and0.6 M) and digestion 2,3,4,5 and 6 hours were conduct the suitable condition for protoplast isolated from cell suspension of Leuang pra-tew 123 was 0.4 M mannital, ratios 1% cellulase : 0.5% pectinase; 1.5:0.5,digestion period 4 hours.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เนาวรัตน์ ปานแย้ม กรรมการ และ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ในความกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน ให้ความเอื้อเฟื้อเครื่องมือต่างๆ ในการทำปัญหาพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และครอบครัว เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำปัญหาพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ
มีนาคม 2541

สารบัญ

หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ
สารบัญตาราง ง
สารบัญรูป จ
บทที่1 บทนำ 1
บทที่2 ตรวจเอกสาร 3
บทที่3 การดำเนินการวิจัย 10
บทที่4 ผลการทดลอง 18
บทที่5 สรุปผลการทดลอง 46
เอกสารอ้างอิง 48
ภาคผนวก 50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่1 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัส(มิลลิเมตร) ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 20

ตารางที่2 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัส(มิลลิเมตร) ของข้าวหอมมะลิ105 21

ตารางที่3 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยวิธีหาน้ำหนักสดและแห้ง 24

ตารางที่4 แสดงอัตราส่วนเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนสในการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 37

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่1 แสดงลักษณะของเซลล์เกาะกันแน่น(compact callus) 19

รูปที่2 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ใช้ในการทดลอง 23

รูปที่3 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยวิธีหาน้ำหนักสด 25

รูปที่4 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง 26

รูปที่5 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวต่างๆของพันธุ์เหลืองประทิว123 28

รูปที่6 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวต่างๆของพันธุ์บาสมาติ370 29

รูปที่7 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวต่างๆของพันธุ์หอมมะลิ105 30

รูปที่8 ภาพถ่ายการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากกล้องสเตอริโอ 32

รูปที่9 ภาพถ่ายการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากกล้องสเตอริโอ 33

รูปที่10 ลักษณะของแคลลัสในสูตรอาหารแข็ง NBR สูตรต่างๆ 34

รูปที่11 ลักษณะของแคลลัสในสูตรอาหารแข็ง NBR 0.1 NAA 35

รูปที่12 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ 39

รูปที่13 แคลลัสที่ย้อมด้วย FDA 40

รูปที่14 โปรโตพลาสต์ที่อยู่รวมกับเศษเซลล์ 41

รูปที่15 แถบของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกในสารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ 42

รูปที่16 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตย้อมด้วย evan blue 43

รูปที่17 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 44

รูปที่18 ลักษณะการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ 45

รูปที่19 ลักษณะการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ 46

บทที่ 1
บทนำ

ข้าว (Oryza sativa L.) เป็นอาหารหลักประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรโลกสำหรับประเทศไทยถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทยอย่างมาก ประชากรอย่างน้อย 1 ใน 3 ของไทยมีอาชีพการทำนา ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ได้มีการปรับปรุงข้าวให้มีคุณภาพดี ผลผลิตสูง ทนต่อสภาพแวดล้อมและต้านทานโรค โดยใช้เทคนิคต่างๆมากมาย และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาต่างๆในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลักษณะตามต้องการ ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของข้าวได้เจริญก้าวหน้าไปมาก เช่นการเพาะเลี้ยงเอมบริโออ่อน เอมบริโอแก่ ละอองเกสร อับเรณู เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสต์ ในปัจจุบันมีการย้ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อโดยวิธีต่างๆเช่น electroporation particle bombartment และ somatic hybridizer ข้าวพวก Japonica สามารถชักนำให้เป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ แต่ในพวกอินดิคายังมีปัญหาอยู่มาก ถึงแม้ว่าจะสามารถชักนำให้เป็นต้นได้เมื่อไม่นานมานี้ จากข้อมูลที่มีอยู่เป็นข้าวสายพันธุ์ที่ใช้ในต่างประเทศเช่นสายพันธุ์ IR43 IR52 IR54 IR64 IR72 และ IR57311-95-2-3 105 ได้ผลดี Ella และ Zapata (1993) ได้รายงานเกี่ยวกับการเติมแอล-โพรลีน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิคาจะช่วยในการเจริญของแคลลัส และเซลล์ที่เกิดใหม่จะหลุดออกจากแคลลัสเดิมได้ง่าย

วัตถุประสงค์ของปัญหาพิเศษ

1. ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงให้เป็นแคลลัส
2. ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย และหากราฟการเจริญเติบโต
3. ศึกษาการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยในอาหารแข็งสูตรต่างๆ
4. ศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ข้าวหอมมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองไทย ลักษณะลำต้นมีสีเขียวอ่อน สูงประมาณ 140 เซนติเมตร ใบยาวค่อนข้างแคบสีเขียว ใบธงทำมุมกว้างกับรวง ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ดข้าวมีรูปร่างเรียวขนาดเมล็ดข้าวกล้องยาว 7.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร หนา 1.8 มิลลิเมตร ผลผลิตประมาณ 363 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะพันธุ์ไวต่อช่วงแสง คุณภาพข้าวสุกนุ่มหอม เปอร์เซ็นต์แป้งอะไมโลสประมาณ 12-17 ข้อดีของข้าวพันธุ์นี้คือเป็นข้าวต้นสูงเก็บเกี่ยวง่าย อายุค่อนข้างเบาและเก็บเกี่ยวได้เร็ว นวดง่าย ทนดินเปรี้ยวและดินเค็ม ทนแล้งได้ดีพอสมควร สามารถปลูกเป็นข้าวไร่ได้ แต่โดยทั่วไปนิยมปลูกแบบข้าวนาสวน เมล็ดข้าวสารใส แข็งแกร่ง คุณภาพการขัดสีดี คุณภาพการหุงต้มมีกลิ่นหอมและอ่อนนิ่ม จำหน่ายได้ราคาดี แต่มีข้อเสียคือต้นข้าวอ่อนล้มง่าย ทรงกอแผ่ถ้าแก่สุกงอมเกินไปจะเกี่ยวยาก ปลูกได้เฉพาะนาปีเท่านั้น น้ำหนักเมล็ดเบาผลผลิตค่อนข้างต่ำ ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ โรคใบสีส้มและโรคใบหงิก(จู๋) ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียวและหนอนกอ (วราภรณ์,2535)

พรทิพย์ (2539) ได้ทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 เกิดเอมบริโอจินิคแคลลัสได้ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารแข็งสูตรพื้นฐาน N_6 MS และ R_2 ความเข้มข้นสูตรของ 2,4-D 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแอล-โพรลีน 8 10 และ 12 มิลลิโมลาร์ พบว่าอาหารที่เหมาะสมคืออาหารพื้นฐานอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โพรลีน 8 มิลลิโมลาร์ การเพิ่มเคซีนไฮโดรไลเซลงในอาหารไม่ได้ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมปริโอจินิคแคลลัสหรืออาจทำให้ลดลงได้ อาหารที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์

จตุพร (2540) การเพาะเลี้ยงเมล็ดของข้าวหอมมะลิ 105 ในอาหารชักนำแคลลัสสูตรต่างๆ พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัสสำหรับใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ คืออาหารแข็งสูตร MSที่มี 2,4-D มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 10 มิลลิโมลาร์ ซูโครส 3 เปอรเซ็นต์และวุ้น 0.8 เปอรเซ็นต์ เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ นำเอมบริโอเจนิคที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้เป็นเวลา 3 วันในที่มืด และเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรMSที่ประกอบด้วย BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำ

มะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุด นำเอมบรโอเจนิคไปแยกโปรโตพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ที่มีเซลลูเลส อาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ เพคติเนส วาย-23 0.1เปอร์เซ็นต์ และMES 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายใน washing solution ที่แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.01เปอร์เซ็นต์ ที่pH 5.8เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตรสูงที่สุด เมื่อนำโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงที่ความหนาแน่น 5 x 10^5โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในอาหารแข็งสูตร MSที่มี2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 10 มิลลิโมลาร์ ซูโครส 3 เปอรเซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ และวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ได้ใหม่

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

Kamo และ Hodges (1986) รายงานว่า นำแคลลัสชนิดเกาะกันแบบหลวมๆของข้าวโพดพันธุ์ B73 x A188 หนัก 4 กรัมโดยน้ำหนักสด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ แอล-โพรลีน 6 มิลลิโมล เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอบไซซิค แอซิก 0.1 ไมโครโมลและ 2,4-D 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 7 วัน หลังจาก 30 วัน นำเซลล์แขวนลอยไปผสมด้วยอาหารใหม่ในอัตราส่วน 1:1 และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน จากนั้นนำเซลล์ที่มีน้ำหนัก 0.01 หรือ 0.04 กรัมของน้ำหนักแห้ง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของ 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า lag phase อยู่ในช่วง 0-2 วัน log phase อยู่ในช่วง 4-7 วัน และ stationary phase อยู่ในช่วง 10-15 วัน ถ้าเริ่มต้นด้วยเซลล์ที่มีน้ำหนัก 0.07 กรัมของน้ำหนักแห้ง พบว่า lag phase อยู่ในช่วง 0-3 วัน log phase อยู่ในช่วง 4-6 วัน และ stationary phase อยู่ในช่วง 7-9 วัน และพบว่าเซลล์แขวนลอยเป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์และศึกษาการเกิดเป็นต้นใหม่ของโปรโตพลาสต์

Wang และคณะ (1987) พบว่าข้าวป่าสายพันธุ์ Oryza parennis สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BAP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้จะเกาะตัวกันแน่น (compact callus) จากนั้นเมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เคซีน ไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ 10 ครั้ง ในระยะเวลา 12 เดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเกิดต้นจะลดลง เมื่อทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ ครั้งที่ 6 ถึง 10 โดยจะลดลงจาก 80 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์

Raina และคณะ (1987) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ในอาหารแข็งสูตร MS พบว่าการเติม 2,4-D หรือ 2,4,5-T ที่ 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อนำแคลลัสเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน และเติมทริปโตเฟน 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

Vajrabhaya และคณะ (1989) รายงานถึงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 และเหลืองประทิว เพื่อให้ทนเค็ม โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไคนิติน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกเอาเฉพาะ เอมบริโอเจนิค แคลลัส มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร White ดัดแปลงที่เติม $(NH4)_2SO_4$ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคนิติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 24+3 องศาเซลเซียส ในการทดสอบความทนเค็มจะใช้แคลลัสที่มีอายุประมาณ 2-4 สัปดาห์ โดยนำ embryogenic callus ไปเลี้ยงในอาหารที่มี โซเดียมคลอไรด์ 1 หรือ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเมื่อนำแคลลัสนั้นมาชักนำให้เกิดต้น พบว่าอัตราการเกิด เป็นต้นลดลง 0.08 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 8.3-30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบกับต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กระทำโดยการนำต้นกล้าไปเลี้ยงในน้ำที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งผลการทดลองพบว่า อัตราการรอดชีวิตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

ในชั่วที่ 3 มีค่าสูงถึง 94.31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 2 เปอร์เซ็นต์และผลการทดลองในชั่วที่ 4 คล้ายคลึงกับในชั่วที่ 3

Wang และ คณะ (1989) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าว 3 สายพันธุ์ 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)

เซลล์แขวนลอยเตรียมได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับชักนำให้สร้างแคลลัส จากนั้นย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลว N_6 ที่มี 2,4-D 1.5-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซิเอติน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด จากนั้นเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 5-7 วัน จากนั้นทำการแยกโปรโตพลาสต์จะใช้เซลล์แขวนลอยที่เปลี่ยนอาหารแล้ว 2-3 วัน ย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย Pectolyase Y-23 0.5 เปอร์เซ็นต์ Cellulase RS 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม MES 5 มิลลิโมลาร์ และ $CaCl_2 2H_2O$ 7 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่มี กลูโคส 0.5 โมลาร์ pH 5.6 บ่มไว้ 4 ชั่วโมง ผนังเซลล์จะถูกย่อยหมด ซึ่งตรวจสอบได้โดยการย้อมด้วยสี Calcoflour white M2R นำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 2-5 $*10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่มี 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิเอติน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซินไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 0.5 โมลาร์ และอะกาโรส 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และมีการเติมอาหารใหม่ทุก ๆ 7-10 วัน โปรโตพลาสต์เจริญเป็นโคโลนี จากนั้นย้ายลงอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิเอติน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายแคลลัสลงอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสแข็งขึ้น จากนั้นย้ายลงอาหารสูตร N_6 ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เป็นต้นในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มี ซิเอติน 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Boissot (1990) ได้ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนและเมล็ดข้าวป่าพันธุ์แอฟริกัน (Oryza longistaminate) เมื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 9 ไมโครโมล โดยเลี้ยงไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเกิดแคลลัสได้ดี จากนั้นนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.27 ไมโครโมลและ BAP 2.2 ไมโครโมล เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าภายใน 4 สัปดาห์ แคลลัสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ 20 และ

100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าเปอร์เซ็นต์ในการชักนำให้เกิดเป็นต้นจะลดลงเมื่อเปลี่ยนอาหารให้แคลลัสในครั้งที่ 3 โดยจะลดลง 12.5 เปอร์เซ็นต์

Jiahua และคณะ (1994) ศึกษาผลของน้ำตาลมอลโตส (moltose), 2,4-D และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของข้าวจาโปนิคา 3 สายพันธุ์ คือ line 02428, Xiushu 117 และ Taipei 309 พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นในอาหารที่ใส่มอลโตสเท่านั้นแต่ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลยในอาหารที่ใส่ซูโครส (surcose) ส่วนผลของ 2,4-D และ NAA พบว่า 2,4-D ให้ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่า NAA และจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น แต่การชักนำให้เกิดต้นให้ผลในทางกลับกันคือแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใส่ NAA จะให้ผลดีกว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใส่ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำและความเข้มข้นสูงตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลของ 2,4-D ต่อการเกิดต้นของ Siriwardana และ Nabor (1983) และ Ribnicky และคณะ(1966) อัตราส่วนของออกซิน และ ไซโตไคนิน มีความสำคัญต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัส ยอดและราก การเติมไซโตไคนินหรือกรดอมิโนบางชนิดสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเกิดยอดได้เนื่องจากไซโตไคนินมีผลกระตุ้นการเกิดยอด และกรดอมิโนบางชนิดอาจเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการพัฒนาไปเป็นอวัยวะของพืช

Bajaj และ Rajam (1996) รายงานว่าโพลามีน มีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นต้น โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสในข้าวพันธุ์ TN-1 พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงเป็นเวลานานจะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นลดลงซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการสะสมของ พูเทรสซิน การทดลองใส่สารยับยั้งการสังเคราะห์ พูเทรสซิน เช่น แอลฟา-ไดฟลูออโรเมททิลอาร์จินิน หรือการเติม สเปอร์มิดินลงในอาหารเพื่อช่วยลดปริมาณ พูเทรสซิน และปรับอัตราส่วนของ พูเทรสซิน ต่อ สเปอร์มิดิน ให้เหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นสูงขึ้นได้

Jain และ คณะ(1996) ทำการทดลองเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยในข้าวพันธุ์ บาสมาติ 335 และ บาสมาติ 1 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของอกาโรส (agarose) จาก 0.5 เป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ จะเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดต้นได้สูงถึง 86 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใส่แมนนิทอล 0.1-0.2 M จะกระตุ้นการเกิดยอดในพันธุ์ พูสะ บาสมาติ 1 มากถึง 5 เท่า แต่ไม่มีผลในพันธุ์ บาสมาติ 385 การใส่แมนนิทอล 0.4 M จะยับยั้งการเกิดยอดแม้ว่าจะส่งเสริมการเกิดเอมบริโอจินิคแคลลัส แต่หลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีแมนนิทอล แคลลัสสามารถเกิดยอดได้มาก การปล่อยแคลลัสให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนย้ายลงในอาหารสูตรชักนำ

ให้เกิดต้น พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ 3 เท่า และจะเพิ่มมากขึ้นถึง 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของอกาโรสเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เทคนิคนี้ให้ผลเช่นเดียวกันในข้าวพันธุ์ IR43 และ Taipei309

Abe และ คณะ (1996) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในแคลลัสของข้าวโดยนำแคลลัสของข้าว 5 พันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซส 1 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในที่มีแสง โดยจะเปลี่ยนอาหารใหม่ประมาณ 30 วัน โดยอาหารที่เปลี่ยนใหม่จะเติมกรดแอบซิซิค 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซอร์บิทอล 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 60 วัน หลังจากนั้นแคลลัสจะถูกย้ายไปเลี้ยงในสูตรอาหารเดิมที่เติมกรดแอล-แนพทาลีนอะซิติค 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้น และวัดความสามารถในการเจริญเป็นต้น พบว่าแคลลัสที่สามารถเจริญได้เร็วแสดงว่าแคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ดีและมีปริมาณของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงด้วยทั้ง 5 พันธุ์

Bajaj และ Rajam (1996) รายงานว่า polyamine มีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นต้น โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสในข้าวพันธุ์ TN-1 พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงเป็นเวลานานจะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นลดลงซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการสะสมของ พูเทรสซิน การทดลองใส่สารยับยั้งการสังเคราะห์ พูเทรสซิน เช่น แอลฟา-ไดฟลูออโรเมททิลอาร์จินิน หรือการเติม สเปอร์มิดิน ลงในอาหารเพื่อช่วยลดปริมาณ พูเทรสซิน และปรับอัตราส่วนของ พูเทรสซิน ต่อ สเปอร์มิดินให้เหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นสูงขึ้นได้

Mandal and Gupta (1997) ได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคและสภาวะแวดล้อมโดยนำพันธุ์ข้าวที่มียีนฮอร์โมน AA มาผสมกันโดยใช้พันธุ์ Oryza sativa L. CV.pankaj ผสมกับพันธุ์ O.rufipogon Griff ลูกผสมที่ได้นำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 R_3 He_2 และ He_5 ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นแคลลัส คือ สูตรอาหาร He_2 และ เมื่อนำแคลลัสจากสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS พบว่าเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดในอาหารแข็งสูต ร He_2

Khanna และ Raina (1997) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นของข้าวพันธุ์ บาสมาติ cv. Karnal local ได้สูงถึง 95-100 เปอร์เซ็นต์ และเกิดต้น 6-7 ต้นต่อแคลลัส เมื่อใช้ KNO_3 35 มิลลิโมลาร์ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารที่ชักนำแคลลัสแทนการใช้ KNO_3 19 มิลลิโมลาร์ และ NH_4NO_3 21 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดต้นได้เพียง 65-69 เปอร์เซ็นต์ และเกิดต้นเพียง 2-3 ต้นต่อ แคลลัส และ พบว่าในช่วงของการพัฒนาเป็นต้นนั้นต้องการไนโตรเจนในระดับที่สูงกว่าในช่วงของการชักนำให้เกิดแคลลัส

บทที่3

การดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์ไทยพันธุ์เหลืองประทิว 123 บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105
2. สารเคมีต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. เอมไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยผนังเซลล์ เช่น เซลลูเลสจากไตรโคเดอร์มา และเพคติเนสจากไรโซปัส
4. สีย้อมตรวจสอบโปรโตพลาสต์ เช่น FDA และ Evan's blue
5. อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรองแบคทีเรีย
6. เครื่องแก้วต่างๆ
7. อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
8. กล้องและอุปกรณ์การถ่ายภาพพร้อมฟิล์มและฟิล์มไสล์ด
9. วัสดุอุปกรณ์สำนักงานต่างๆ
10. ตู้ปลอดเชื้อ
11. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
12. เครื่องเขย่า
13. เครื่องเซนติฟิวส์
14. หม้อนึ่งความดัน
15. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
16. กล้อง Inverted microscope
17. กล้องฟลูออเรสเซนต์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
18. ตู้อบฆ่าเชื้อ
19. ปั๊มดูดอากาศสำหรับกรองเซลล์
20. กระดาษกรอง Whatman No.1
21. ไนลอนกรองเซลล์
22. จานพลาสติก

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 7 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวเจริญเป็นแคลลัส 2 พันธุ์

นำเมล็ดข้าว 2 พันธุ์ คือเหลืองประทิว 123 และหอมมะลิ 105 มาแกะเอาเปลือกออก นำไปล้างโดยผ่านน้ำไหลและล้างด้วยคลอร็อกซ์ จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (ทวีน20) จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นครั้งคราว นาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB ที่ประกอบด้วย N6 ธาตุอาหารหลัก B5 ธาตุอาหารรอง B5วิตามิน เคซินไฮโดรเลต 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 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 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวเหลืองประทิว123 โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ในแต่ละระยะเวลา คือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 และ 20 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ขวด ในแต่ละระยะเวลา โดยเซลล์เริ่มต้นแต่ละขวดมีปริมาณเซลล์แขวนลอย 0.25 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 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 เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาตามกำหนดจะทำการกรองเซลล์แขวนลอยเพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังนี้

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

2.2 เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง ทำการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยระบบสุญญากาศ 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 และหาสมการความสัมพันธ์ของน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา

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

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

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 หอมมะลิ 105 และ บาสมาติก 370

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB ที่ประกอบด้วย N6 ธาตุอาหารหลัก B5 ธาตุอาหารรอง B5วิตามิน เคซินไฮโดรเลต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวม 3 สูตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส N_6ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 4 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย เคซินไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอลโพลิน 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 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไมโครแคลลัสจากเซลล์ แขวนลอยของข้าวพันธุ์หอมมะลิ เพื่อชักนำให้เป็นต้น

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสมีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 4 สูตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 15 วัน ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคนิติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย เคซีนไฮโดรไรเซต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรีน 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตรปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงโดยการวางก้อนเซลล์ของเซลล์แขวนลอยที่มีลักษณะเป็นก้อน บนอาหารแข็งดังกล่าวในแต่ละสูตร ๆ ละ 2 ก้อน นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่างที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าว พันธุ์ เหลืองประทิว 123

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่5.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของข้าว พันธุ์ เหลืองประทิว 123

5.1.1 นำเซลล์แขวนลอยมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.9 กรัมของข้าว พันธุ์เหลืองประทิว 123

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

5.1.3 ทำการนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 5.2 การหาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่เหมาะในการแยกโปรโตพลาสต์

5.2.1 นำเซลล์แขวนลอยมาชั่งให้ได้ 0.5 กรัมของข้าว พันธุ์เหลืองประทิว 123

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

5.2.3 ทำการนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

การทดลองที่ 6 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 มีขั้นตอนดังนี้

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

2. นำเซลล์แขวนลอย ตรวจดูการมีชีวิตโดยย้อมด้วย ฟลูโอเรสซิน ไดอะซิเตต

3. นำเซลล์แขวนลอยแช่ในสารละลาย CPW ที่มี แมนนิทอล 0.4 M 30 นาที

4. ดูดสารละลาย CPW ออก แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ เซลลูเลส กับเอนไซม์เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นดังการทดลองที่ 4.2 ตามแต่ละพันธุ์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น แมนนิทอล 0.4M ปิด จานเพาะเลี้ยง ด้วย พาราฟิล์ม

5. นำไปวางในที่มืดบนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

6. ดูดสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ แยกออกมา กรองผ่านที่กรอง ขนาด 80 ไมโครเมตร ที่บรรจุในหลอดทดลอง

7. นำหลอดทดลองไปเหวี่ยงที่ 760 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที

8. ดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้ง

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

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

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

12. ดูการมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม ฟลูโอเรสซิน ไดอะซิเตต และสีย้อม evan blue

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

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

14. ใส่อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 3 สูตร ได้แก่ อาหารเหลวสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารเหลวทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย เคซีน ไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ปรับปริมาตรของโปรโตพลาสต์เป็น 1 มิลลิลิตร

15. ดูดโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก

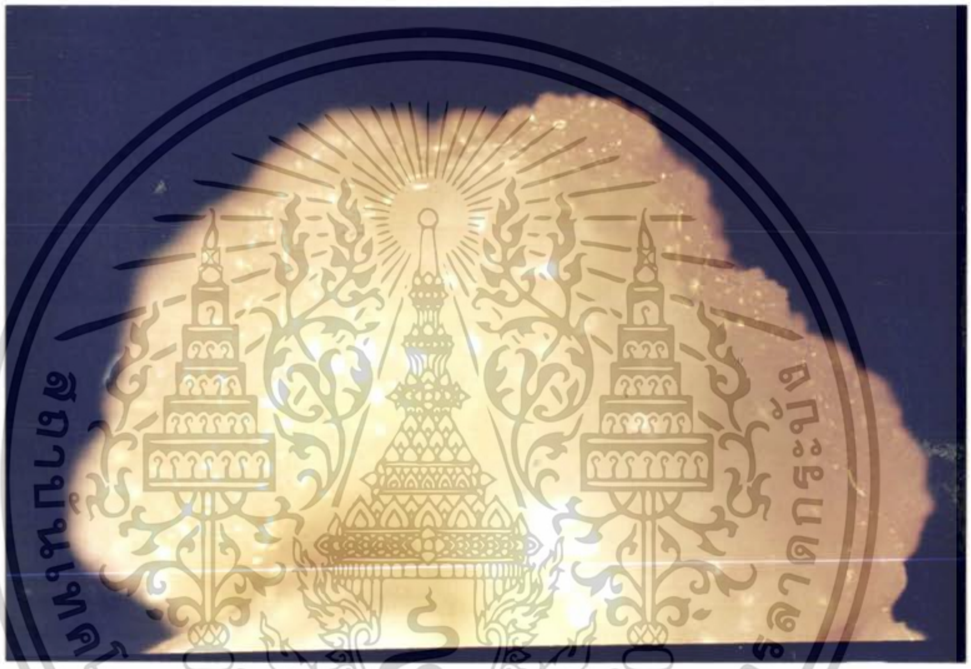
16.ปิดด้วยพาราฟิล์ม และเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 ±2 องศา หลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

30615

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และพันธุ์หอมมะลิ105 เจริญเป็นแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และเมล็ดข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ในอาหารแข็งสูตร NB ที่ประกอบด้วย N_6 ธาตุอาหารหลัก B5 ธาตุอาหารรอง B5วิตามิน แคซินไฮโดรเลต 0.1 กรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวม 3 สูตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไปประมาณ 3-4 วัน พบว่าในอาหารแต่ละสูตรจะมีการงอกของต้นกล้าบริเวณคัพภะ และภายในหนึ่งสัปดาห์จะสังเกตเห็นแคลลัสเกิดขึ้นในสูตรอาหารที่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสีเหลืองอ่อนประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กๆ มีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น (รูปที่ 1) และแบบที่เซลล์เกาะกันหลวมๆ บางแคลลัสพบว่าจะมีทั้งสองลักษณะอยู่รวมกัน ในสัปดาห์ต่อมาแคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและในสูตรอาหารที่มี NAA ในทุกระดับความเข้มข้นจะพบการเจริญของรากจากก้อนแคลลัส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ สังเกตพบการเจริญของแคลลัสเพิ่มขึ้นในทุกสูตร โดยสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 คือ อาหารแข็ง สูตร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่1) และสำหรับสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 คือ สูตรอาหาร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความใกล้เคียงกัน (ตารางที่2)



รูปที่1.ลักษณะของแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus)

ตารางที่1 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัส(มิลลิเมตร) ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

ระดับความเข้มข้นของNAA (มิลลิกรัม/ลิตร) ในอาหารเพิ่งสูตร NB	จานเพาะเลี้ยงที่1	จานเพาะเลี้ยงที่2	จานเพาะเลี้ยงที่3	จานเพาะเลี้ยงที่4	จานเพาะเลี้ยงที่5
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

ตารางที่2 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัส(มิลลิเมตร) ของข้าวพันธุ์เหลืองหอมมะลิ 105

ระดับความเข้มข้น ของ NAA (มิลลิกรัม/ลิตร) ในอาหารแข็งสูตร NB	จานเพาะเลี้ยงที่1	จานเพาะเลี้ยงที่2	จานเพาะเลี้ยงที่3	จานเพาะเลี้ยงที่4	จานเพาะเลี้ยงที่5
0.5	4.91	4	3	4.65	4.77
1	4.25	5	4.4	4.15	4.39
1.5	3.88	5.07	5.42		

การทดลองที่ 2 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

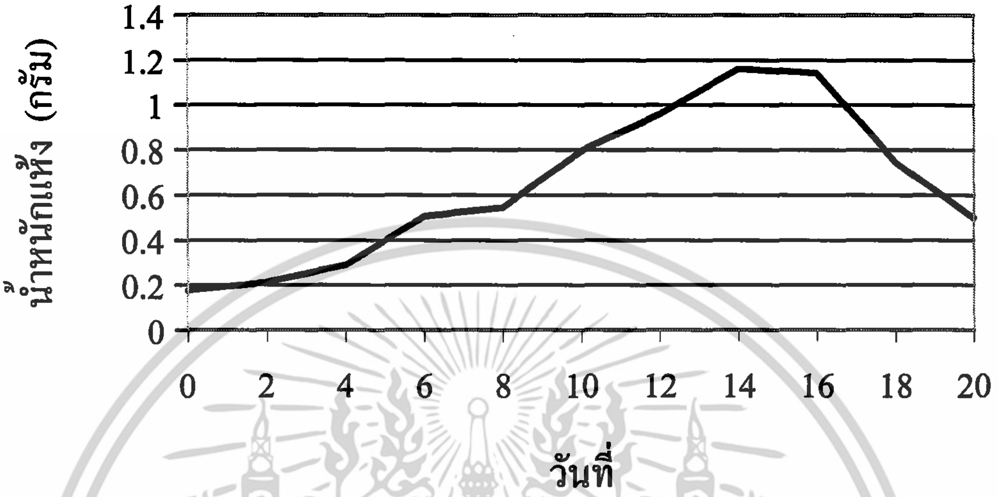
จากการศึกษาการหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของพันธุ์เหลืองประทิว 123 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25±2 องศาเซลล์เซียส (รูปที่ 2) และทำการวัดหาค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง (ตารางที่3) ในแต่ละระยะเวลาคือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 และ 20 วัน ตามลำดับ เมื่อนำผลที่วัดค่าน้ำหนักสด (รูปที่3) และค่าน้ำหนักแห้ง (รูปที่4) มาเขียนกราฟการเจริญ พบว่าเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-16 วัน ซึ่งช่วงที่เซลล์แขวนลอยมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และเป็นช่วงที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์และทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ต่อไป

รูปที่2 ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่3 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสด

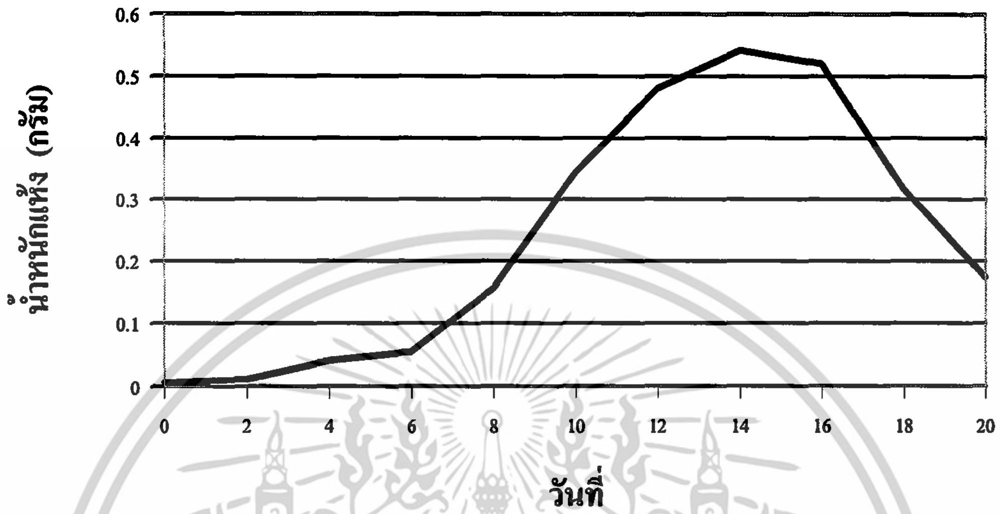
วันที่	น้ำ หนักแห้ง(กรัม)	น้ำหนักสด(กรัม)
0	0.0067	0.1775
2	0.0115	0.2135
4	0.0415	0.2895
6	0.055	0.5085
8	0.157	0.5475
10	0.345	0.797
12	0.481	0.9585
14	0.542	1.164
16	0.5201	1.145
18	0.317	0.7485
20	0.1746	0.5013

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยวิธีหาน้ำหนักสด



รูปที่3 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยวิธีหาน้ำหนักสด

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง



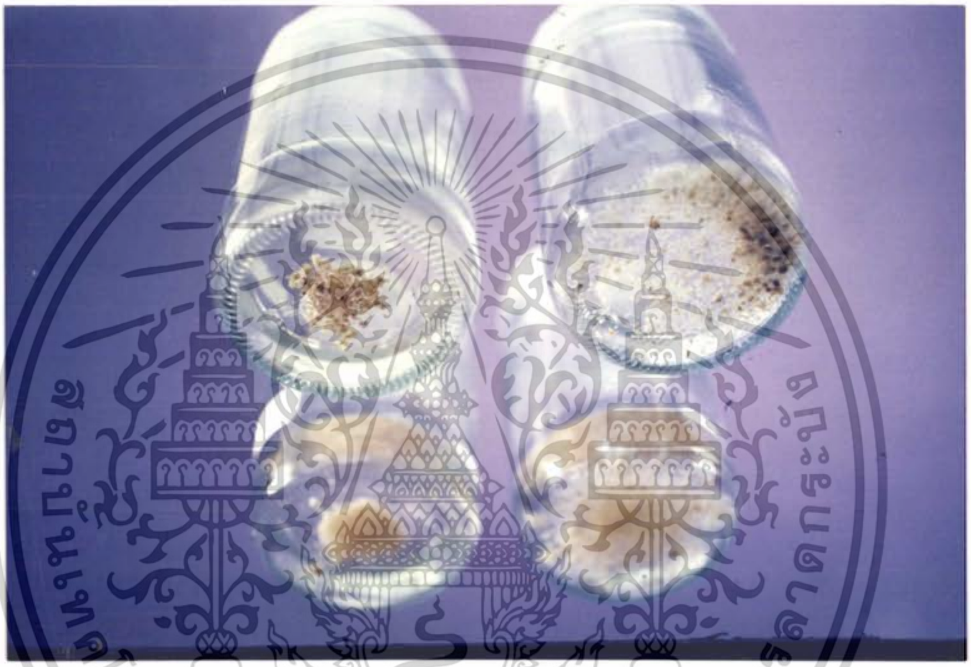
รูปที่4 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 พันธุ์บาสมาติก370 และพันธุ์หอมมะลิ105

จากการศึกษาการพัฒนาของไมโครแคลลัสของข้าวทั้งสามสายพันธุ์โดยการเลี้ยงแบบผสมในอาหารเหลว ซึ่งเป็นอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซส 0.1กรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1กรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 4 สูตร พบว่าในพันธุ์เหลืองประทิว123 N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสสามารถเกิดการพัฒนาของไมโครแคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสจะมีขนาดเซลล์เล็กและละเอียด ส่วนใน R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส เซลล์ของแคลลัสจะมีลักษณะใหญ่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นเอมบริโอเจนิค ส่วนใน R_2ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและ N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสไม่พบความแตกต่างระหว่างแต่ละสูตรอาหาร เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเซลล์แคลลัสทั้ง 4 สูตร พบว่า N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส จะดีกว่า R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส และ R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสจะดีกว่าN_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และ N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจะดีกว่าR_2ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (รูปที่5)

พันธุ์บาสมาติ 370 ในอาหารเหลวสูตร N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส จะมีลักษณะดีที่สุด โดยที่เซลล์จะมีลักษณะละเอียด มีสีเหลืองอ่อน ดีกว่าทุกๆสูตร (รูปที่ 6)

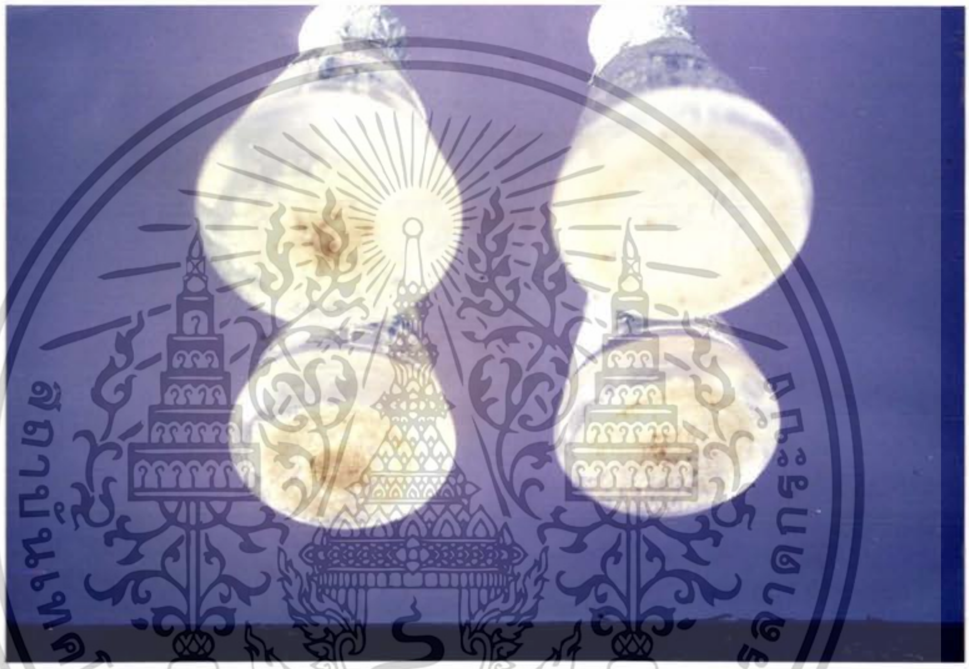
พันธุ์หอมมะลิ105 ในอาหารเหลวสูตร R_2ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส แคลลัสจะมีขนาดใหญ่มากกว่าในอาหารเหลวสูตร N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ส่วนในอาหารเหลวสูตร N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และอาหารเหลวสูตร R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสลักษณะของแคลลัสจะมีลักษณะเซลล์ใกล้เคียงกัน (รูปที่7)



รูปที่5 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวต่างๆของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

ก. R_2 มอลโตส ข. N_6 มอลโตส

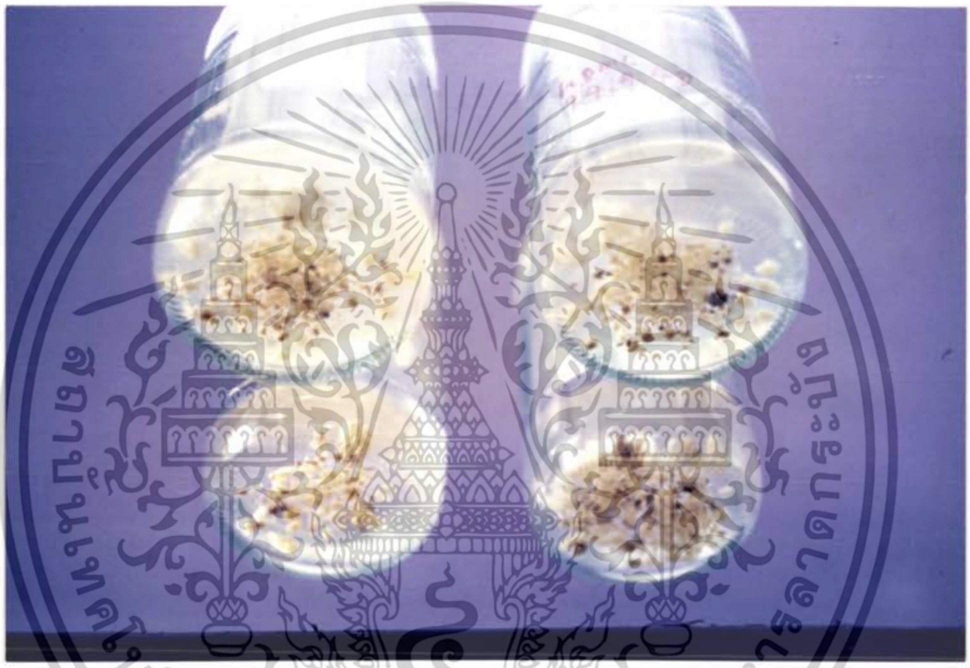
ค. R_2 กลูโคส ง. N_6 กลูโคส



รูปที่6 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวของข้าวพันธุ์บาสมาติ370

ก. R_2 มอลโตส ข. N_6 มอลโตส

ค. R_2 กลูโคส ง. N_6 กลูโคส



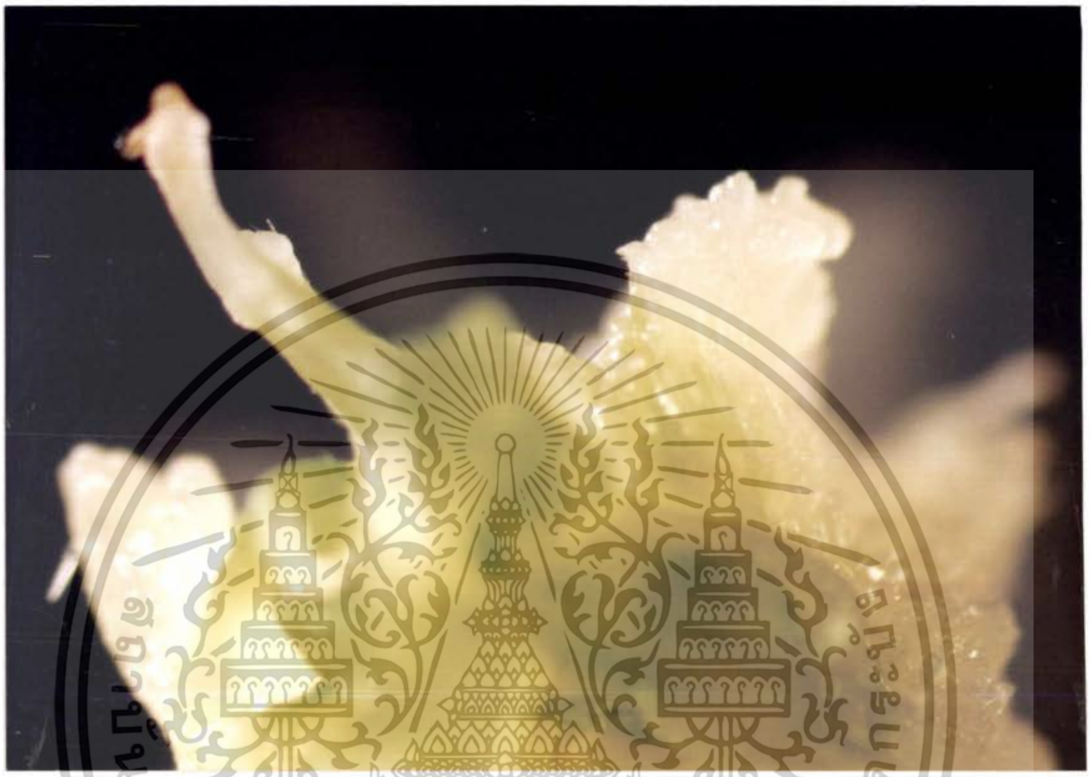
รูปที่ 7 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหารเหลวต่างๆ ของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105

ก. R_2 มอลโตส
ข. N_6 มอลโตส
ค. R_2กลูโคส
ง. N_6 กลูโคส

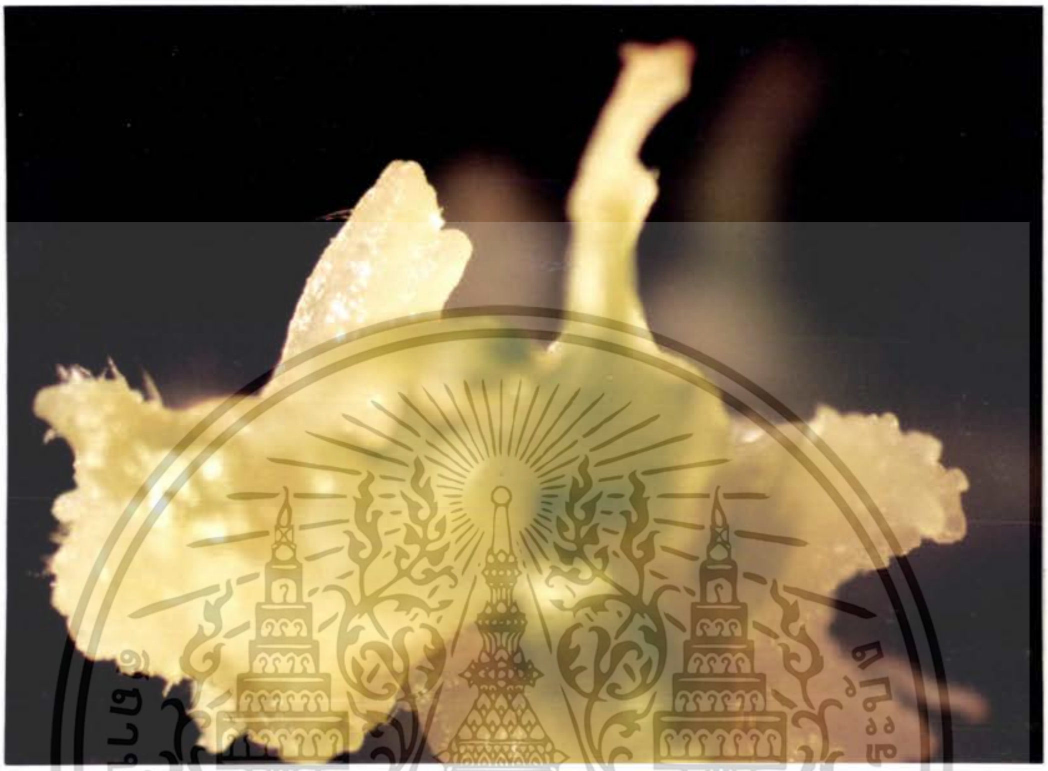
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาบองไมโครแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมมะลิ105

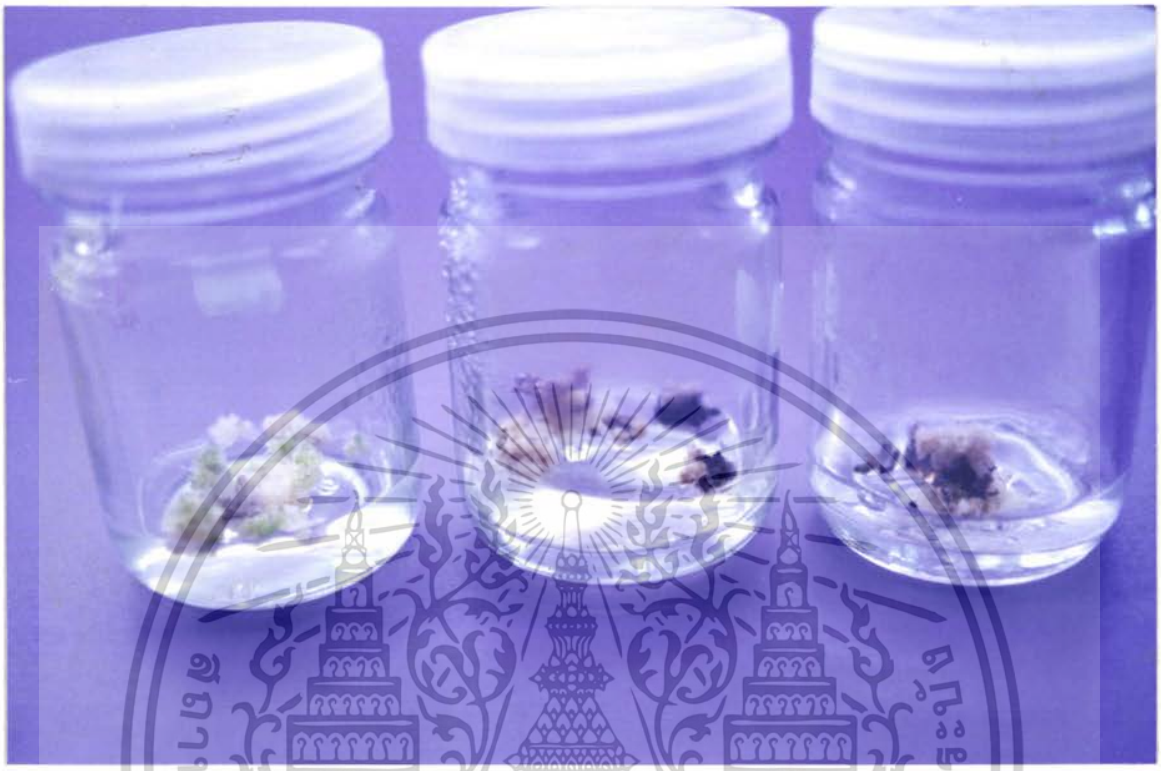
จากการศึกษาการพัฒนาของไมโครแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมมะลิ105 โดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลิตร ไคนิติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารแข็งทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเติม เคซีน ไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารทุกสูตรสามารถเกิดการเพิ่มปริมาณของไมโครแคลลัสได้ โดยพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไป 1 สัปดาห์จะเกิดการเพิ่มปริมาณของไมโครแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมมะลิ105 และเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์จะเกิดการเพิ่มปริมาณของไมโครแคลลัสมากขึ้นซึ่งลักษณะของแคลลัสที่สังเกตได้จะประกอบด้วยเซลล์เล็ก ๆ รวมกลุ่มกันอยู่ เกิดตุ่มเขียวขึ้นเป็นจุดกระจายบนไมโครแคลลัสซึ่งพบว่า สูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นต้น(รูปที่ 8 9 10 11) คือ NBR ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใน NBR ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น มีการแบ่งตัวเหมือนกันแต่ไม่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นต้น



รูปที่ 8 ภาพถ่ายการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากกล้องสเตอริโอ



รูปที่ 9 ภาพถ่ายการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากกล้องสเตอริโอ



รูปที่ 10 ลักษณะของแคลลัสในสูตรอาหารแข็ง NBR สูตรต่างๆ
ก.NBR 0.1 NAA ข.NBR 0.25 NAA ค.NBR 0.5 NAA

รูปที่11 ลักษณะของแคลลัสในสูตรอาหารแข็ง NBR 0.1 NAA

ผลการทดลองที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

การทดลองที่ 5.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

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

การทดลองที่ 5.2การหาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยนำสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ1.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์เพคติแนสที่ความเข้มข้น 0.5เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมรวมกับเซลล์แขวนลอย สารละลาย CPW และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 จะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์เพคติเนส 0.5เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

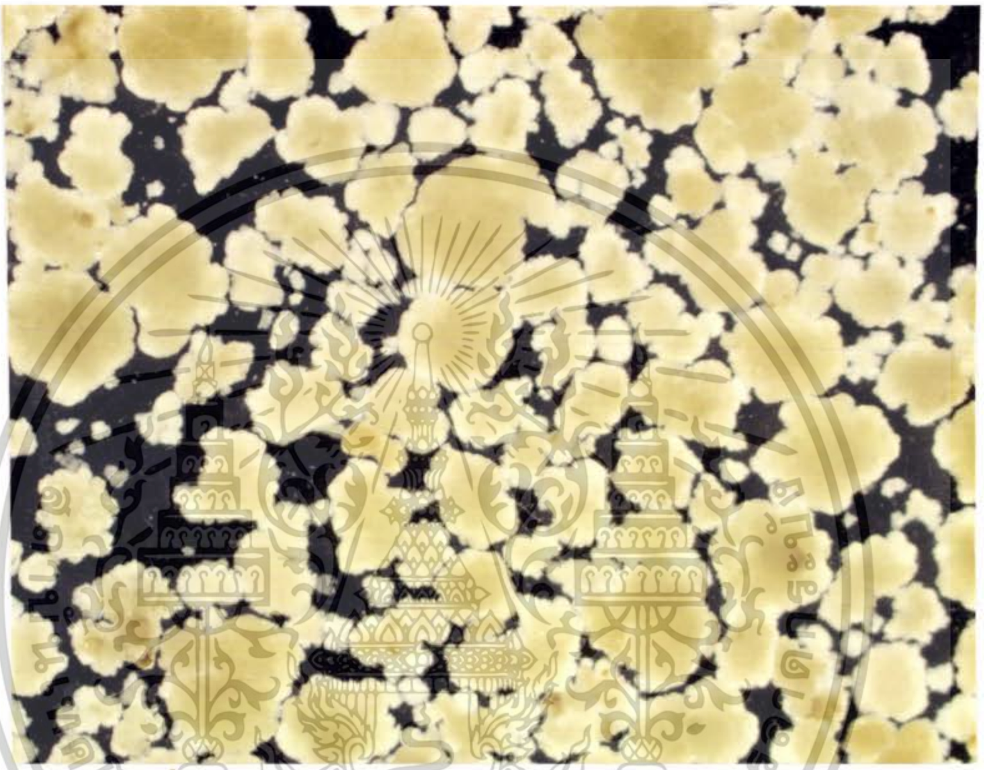
ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนสในการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

cellulase: Pectinase\ Hour	2	3	4	5	6
1.5:0.5	39.16	46.65	72.9	40.82	21.65
1.0:0.5	27.07	34.15	37.9	15.4	20.4
0.5:0.5	19.15	20.4	12.5	10	15

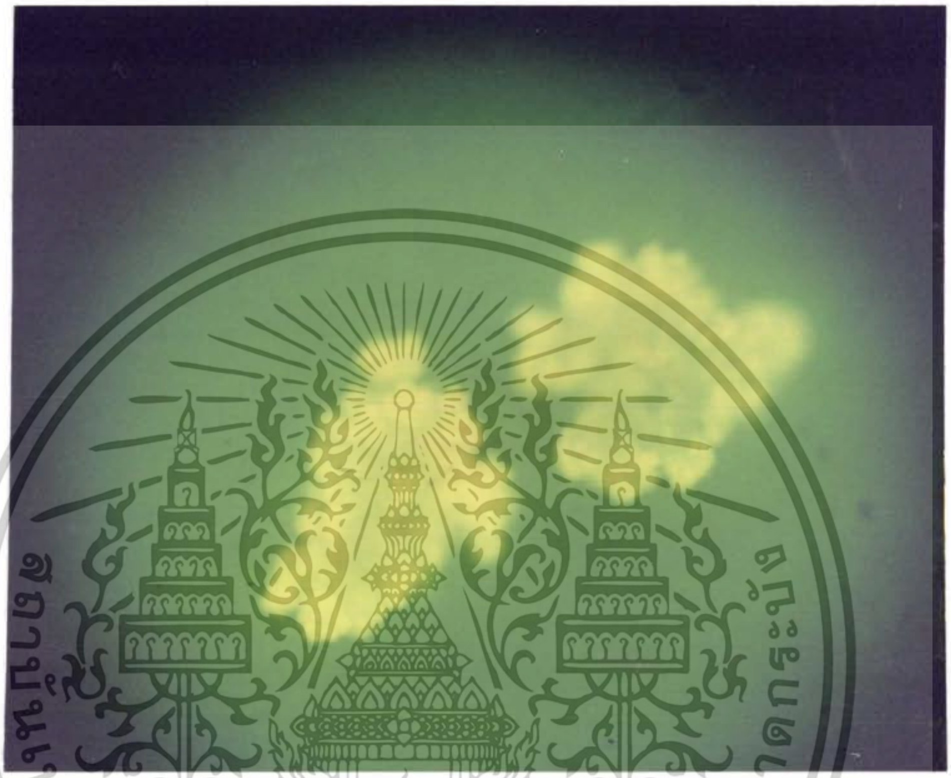
การทดลองที่ 6 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

จากการทดลองทำการแยกโปรโตพลาต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวเหลืองประทิว123 (รูปที่12 13) โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสกับเพคติเนสที่ความเข้มข้น 1.5:0.5 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์เหลืองประทิว123 ซึ่งใช้ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์พบว่า ในความเข้มข้นเอมไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนสที่ความเข้มข้น 1.5:0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดพบว่า เมื่อทำการตรวจดูโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลมสมบูรณ์ มีหลายขนาดในพันธุ์เดียวกัน และมีเศษเซลล์ (รูปที่14) เมื่อนำโปรโตพลาสต์ไปทำให้บริสุทธิ์จะเห็นชั้นของโปรโตพลาสต์อยู่ระหว่างสารละลาย CPW และน้ำตาลซูโครส (รูปที่ 15) นำโปรโตพลาสต์มาย้อมการมีชีวิตโดยสีย้อม Evan blue โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนโปรโตพลาสต์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 16)

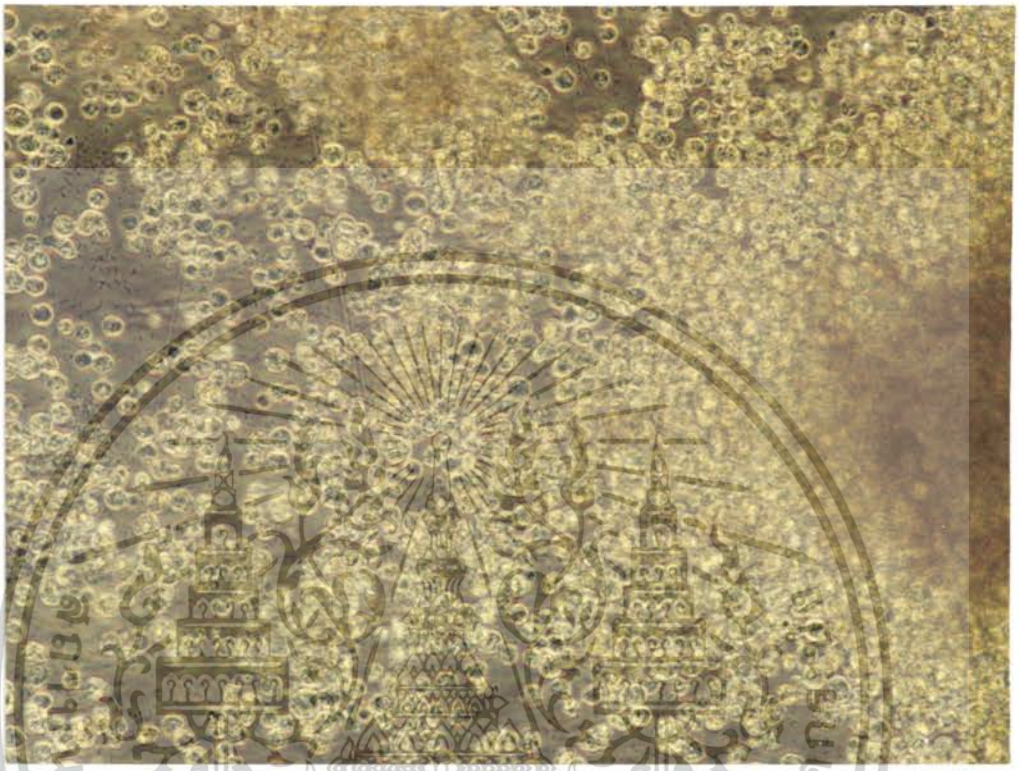
นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยของพันธุ์เหลืองประทิว123 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร (รูปที่17) โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วย แมนนิทอล 0.4 โมลาร์การเลี้ยงในอาหารเหลว โดยทำการเลี้ยงในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิในช่วง 25±2 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไป 1-2 วัน สังเกตพบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ในทุกสูตรอาหาร และเมื่อเปรียบเทียบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ระหว่างสูตรอาหาร 3 สูตร ได้ว่าอาหารทุกสูตรสามารถเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้ใกล้เคียงกัน(รูปที่18 19)



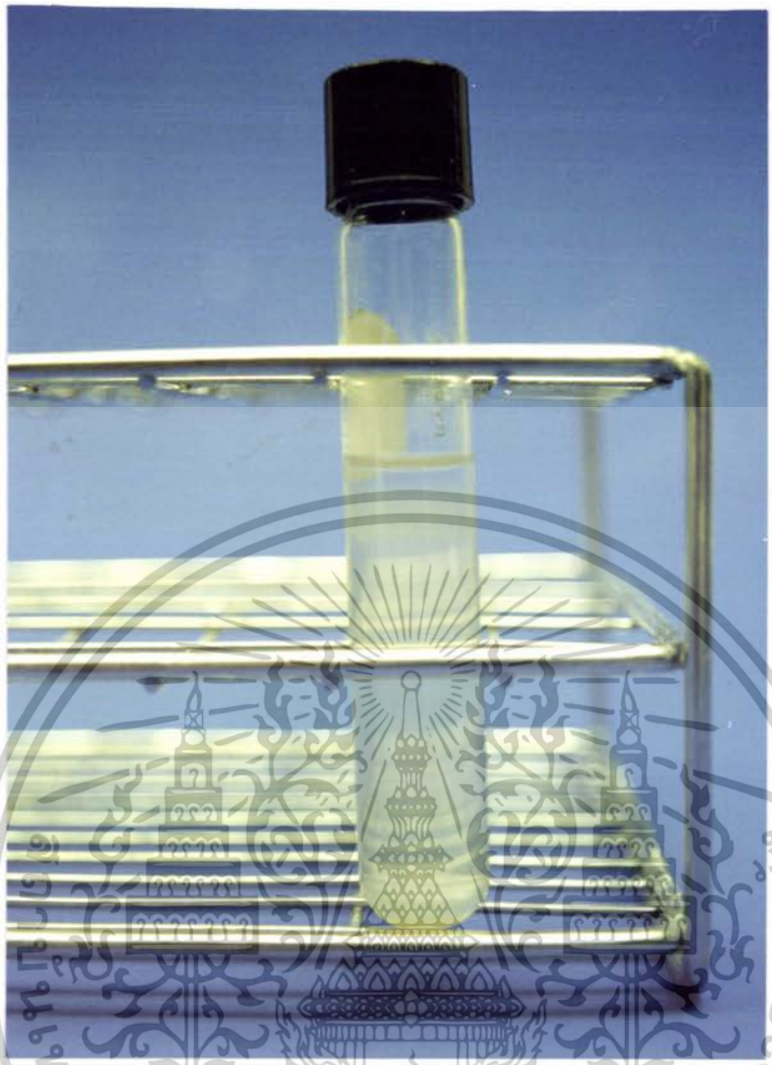
รูปที่12 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ



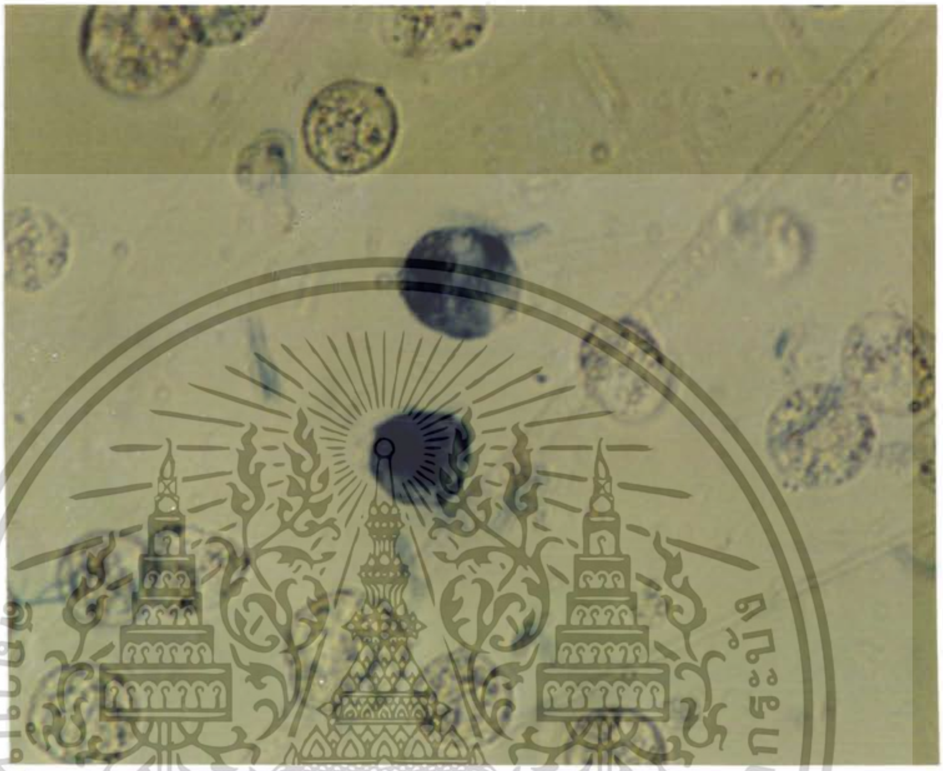
รูปที่ 13 แคลลัสที่ย้อมด้วย ฟลูโอเลสซิน ไดอะซิเตต (FDA)



รูปที่ 14 โปรโตพลาสต์ที่อยู่รวมกับเศษเซลล์

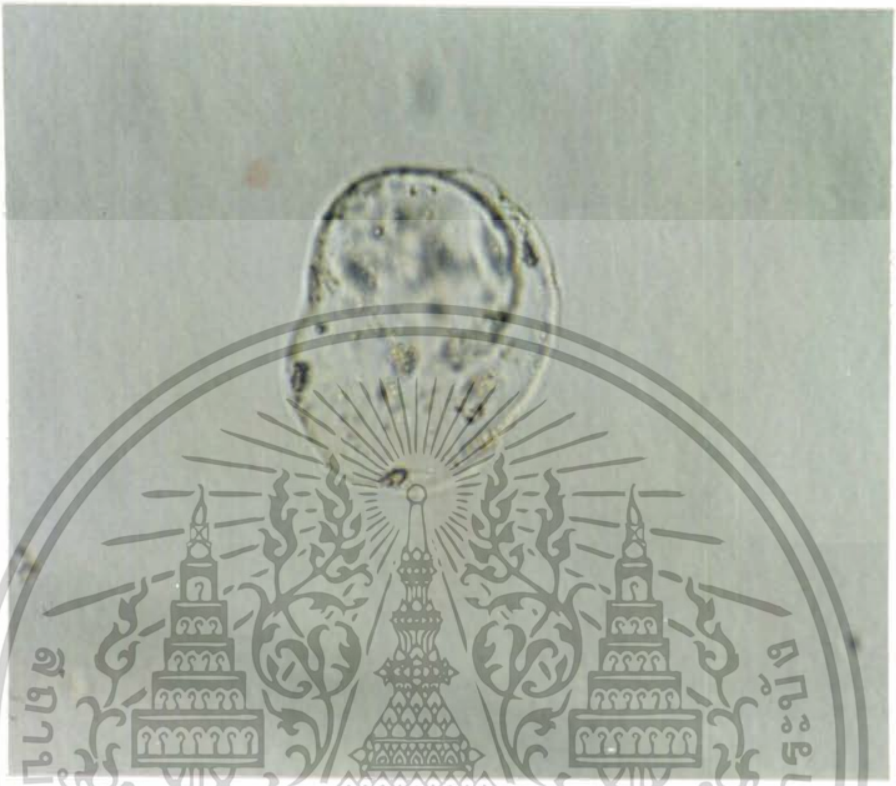


รูปที่ 15 แถบของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกในสารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์

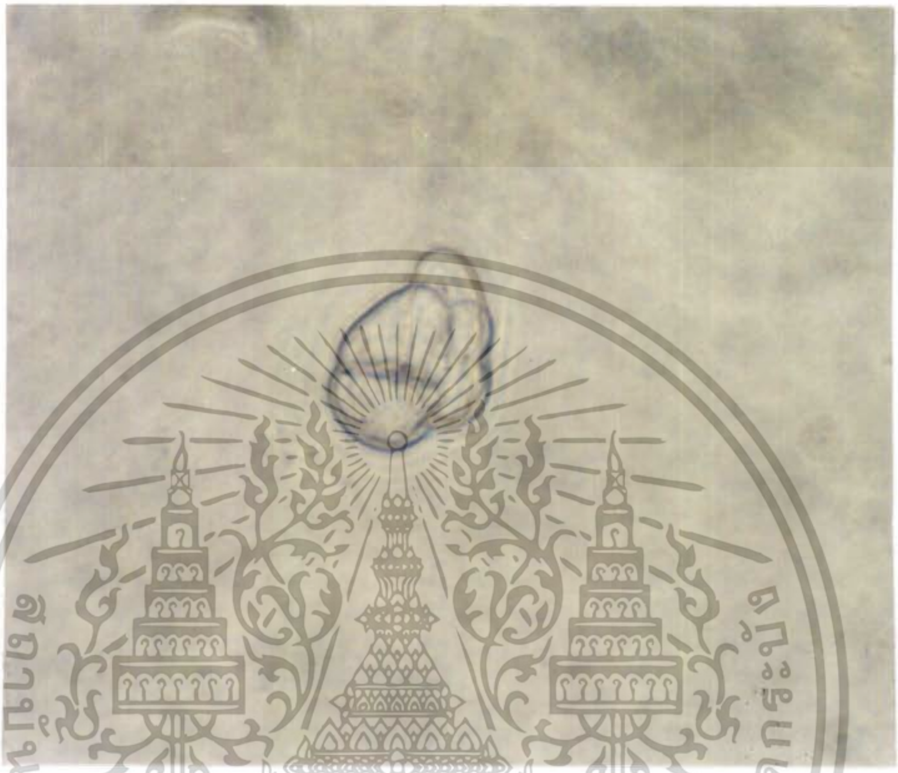


รูปที่ 16 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตย้อมด้วย Evan blue

รูปที่ 17 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์



รูปที่ 18 ลักษณะการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์



รูปที่ 19 ลักษณะการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และหอมมะลิ105 คือ เหลืองประทิว123 และหอมมะลิ 105 เจริญเป็นแคลลัสได้ดังนี้ ในข้าวเหลืองประทิว123 คือ อาหารแข็งสูตร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในข้าวหอมมะลิ 105 คือ อาหารแข็งสูตร NB ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 0.5 1.0และ1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความใกล้เคียงกัน

การทดลองที่ 2

การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N_6ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D ความเข้มข้น2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เซลล์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารใหม่และการนำมาทำการแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 3

ในการหาสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าว 3 พันธุ์ คือ เหลืองประทิว123 บาสมาติก 370 และหอมมะลิ 105 พบว่าอาหารเหลวสูตร N_6ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส N_6 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และ R_2 ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส ซึ่งมีสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซินไฮโดรไลเซส 0.1กรัมต่อลิตร และ แอล-โพลีน 1กรัมต่อลิตร ในอาหารทั้งหมด 4 สูตรพบว่า N_6ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตส เหมาะแก่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยมากที่สุด เนื่องจากเซลล์ที่ได้มีลักษณะเล็กละเอียด

การทดลองที่ 4

ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาบองไมโครแคลลัสให้เป็นต้น ของพันธุ์หอมมะลิ105 อาหารแข็งสูตร NBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะ

เสริมด้วย เคซีน ไฮโดรไลเซส 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร พบว่าสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นต้นคือ NBR ที่ระดับความเข้มข้น NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 5

สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 คือ ที่สภาวะความเข้มข้นของ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เพกติเนสเป็น 1.5 ต่อ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์เหลืองประทิว123ที่เวลา 4 ชั่วโมง

การทดลองที่ 6

เมื่อทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของเหลืองประทิว123 ในสูตรอาหารเหลวNBR ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.1 0.25 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 3 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย เคซินไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วย แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ อาหาร 3 สูตรโดยแต่ละสูตรทำการเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ภายใน 3-4 วัน และพบว่ามีการแบ่งเซลล์ ได้ใกล้เคียงกันในอาหารทุกสูตร

เอกสารอ้างอิง

จตุพร กุลอึ้ง. การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น และการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของข้าวหอมมะลิ 105.วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.(2539)

พรทิทย์ ถิ่นดวงจันทร์. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคให้กับข้าวไทยบางพันธุ์.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.(2539)

วราภรณ์ คำบุญเรือง ความรู้เรื่องข้าวและการทำนา ในเทคโนโลยีการปลูกข้าวที่อาศัยน้ำฝน โครงการพัฒนาข้าวในเขตเกษตรล้าหลัง. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ.(2535)

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

Cho, M.S. and Zapata F.J. "Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L.cv.Taipei 309)" Plant Sci. (1988) 58: 239-244

Jain. R.K., S. Jain andd R. Wu. "Water stress stimulates regeneration. rice biotech.quart" (1996) 28: 14

Jiahua, X., G. Mingwei, C. Qihua, C. Xiongying, S. Yuwei and L. Zhyqing. "Effect of moltose and hormones on callus formation and plant regeneration in isolated microspore culture of japonica rice(Oryza sativa L.)"(1994) IRRN 19 (3) : 7-8

Khana Kishor, P.B. and G.M. Reddy. "Regeneration studies in basmati cultivar kamal local. rice biotech. quart"(1997) 29 : 8

Koma,K.K. and T.K.Hodges. "Estabishment and characterization of embryogenic maize callus and cell suspension culture". Plant Sci. (1986) 45: 111-117.

Raina S.K., P.Satish and K.S.Sarma. "plant regeneration from in vitro culture of anthers and mature seeds of rice (O ryza sativa L.)cv. basmati 370." Plant Cell Report. (1987) 6 : 43-45.

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

Wang, D., P.D. Miller, and M.R. Sondalh. "Plant regeneration from protoplast of indica type rice and cms rice." Plant Cell Report. (1989) 8: 329-332.

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

Yin Y., S. Li, Y. Chen, H. Guo, W. Tian, Y. Chen, and L. Li. " Fertile plant regeneration from suspention culture-derived protoplast of an indica type rice (Oryza sativa L.32)" Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (1993) 32: 61-68.

Zhang, H.M., H. Yang, E.L.Rech, T.J. Gold, A.S. Davis, B.J. Milligan E.C. Cooking, and M.R.Davey. "Trasngenic rice plants produced by electroporation- mediated plasmid uptake into Protoplasts." Plant Cell Report. (1988) 7: 379-384.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่1 สารเคมีในสูตรอาหารChuและคณะ(1975)(N_6)

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

ตารางภาคผนวกที่2 สารเคมีในสูตรอาหารR_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

ตารางผนวกที่3 สารเคมีในสูตรอาหารNBR

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	100
Sucose	20,000
NAA	VARY
BAP	3000
Kinetin	100
Phytagel	2,600
$_{p}H$	5.8

ตารางผนวกที่4 สารเคมีในสูตรอาหารNB

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	100
L-Proline	1000
Sucose	20,000
NAA	VARY
Phytagel	2,600
$_{P}H$	5.8

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
แมนนิทอล	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
แมนนิทอล	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