สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำให้เกิดข้าวทนเค็มโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นายวสันต์ เข็มทองเจริญ 35504338

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีการศึกษา 2539

ปพ.
ว 358ก
2539
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 25401
วัน, เดือน, ปี 9 ก.ค. 2539

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction of Solt Tolerant in Rice *(Oryzy sativa L.)* by Tissue Culture Technique

Wasan Khemthongcharoen 35504338

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

1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง การชักนำให้เกิดข้าวทนเค็มโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induction of Salt Tolerant in Rice (*Oryza sativa L.*)

by Tissue Culture Technique

โดย นายวสันต์ เข็มทองเจริญ รหัสประจำตัว 35504338

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ผศ. ดร. พรรณี ฐีตาพิชิต) ประธานกรรมการ

(อาจารย์พนา โสหะทรัพย์ทวี) กรรมการ

(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำให้เกิดข้าวทนเค็มโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นักศึกษา นายวสันต์ เข็มทองเจริญ 35504338

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 3539

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ในสูตรอาหาร N_6 ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, L-proline 1 กรัมต่อลิตร, casein hydrolysate 0.1 กรัมต่อลิตร และ myo-inositol 0.1 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้คัพภะเกิดเป็นแคลลัส สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสที่ได้ให้เกิดจุดเขียวในข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม IAA 2 : BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 คือ อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 : BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และของพันธุ์บาสมาติ 370 ให้เป็นเซลล์แขวนลอยขนาดสม่ำเสมอทำได้โดยใช้อาหารเหลวที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เวลา 5-6 เดือน และสามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยที่ได้พัฒนาเป็นจุดเขียวได้ในสูตร N_6 IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

จากการศึกษาการทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และพันธุ์บาสมาติ 370 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 สามารถทนเกลือได้ที่ระดับ 0.5 และ 0.75 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และโปรโตพลาสตร์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ,MS ,KM-8P ที่มีเกลือ พบว่ามีชีวิตอยู่ได้ถึง 20 วัน การฉายรังสีแกมมากับแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพื่อให้กลายพันธุ์อยู่ในช่วงรอผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : Induction of Solt Tolerant in rice *(Oryza sativa L.)* by Tissue Culture Technique

Name Wasan Khemthongcharoen 35504338

Special Project Advisor Anurug Poeaim

Department Applied Biology

Academic Year 1996

Abstract

Seeds of rice, varietics Basmati 370 and Koa Dohk Mali 105 were cultured on N_6 medium supplement with 2 mg/l 2,4-D, L-proline 1 g/l, casine-hydrolysate 0.1 g/l and myo-inosital 0.1 g/l for callus induction. The suitable media for green spot formation on calli of the two varieties were N_6 supplemented with IAA and BA in the proportions of 2:6 mg/l and 1:4 mg/l, respectively. the regeneration calli of the two varieties were suspended in 2 mg/l 2,4-D for 5-6 months ,and the development to green spot of the suppended with 2 mg/l each of IAA and NAA for Basmatic 370 ,and 2 mg BA for Kao Dohk Mali 105

Form anylasis the effect of solt NaCl on the 2 varietics of rice, it was found that both calli and suspended cells cound stand up to 0.5 and 0.75 % NaCl, respectively, while protoplasts of the two varieties cound stand up to 20 days. Results about radiation gamma is still under investigation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการ อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี และ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ในความกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน และ สำนักงานปรมัญเพื่อสันติที่ช่วยในการฉายรังสี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และเพื่อนๆน้องๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำปัญหาพิเศษนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	01
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	02
กิตติกรรมประกาศ	03
สารบัญ	04
สารบัญตาราง	05
สารบัญกราฟ	05
สารบัญรูป	06
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	54
บทที่ 4 ผลการทดลอง	71
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	108
เอกสารอ้างอิง	109
ภาคผนวก	113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้าที่
ตารางที่ 1 สูตรอาหาร ชุด A	70
ตารางที่ 2 สูตรอาหาร N_6	70
ตารางที่ 3 เวลาฉายรังสีแกมมา	70
ตารางที่ 4 การเจริญของเซลล์แขวนลอย หอมมะลิ 105	88
ตารางที่ 5 การเจริญของเซลล์แขวนลอย บาสมาติ 370	88

สารบัญกราฟ

	หน้าที่
กราฟที่ 1 การเจริญของเซลล์แขวนลอย หอมมะลิ 105	89
กราฟที่ 2 การเจริญของเซลล์แขวนลอย บาสมาติ 370	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้าที่

วิธีการทดลอง

รูปที่ 1 แคลลัสข้าว อายุ 1-1.5 เดือน 57

รูปที่ 2 แคลลัสข้าว อายุ 0.5 เดือน 57

รูปที่ 3 เซลแขวนลอยข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ที่ได้จาก การชักนำจาก แคลลัส 58

รูปที่ 4 การทำแห้งก่อนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่จะชักนำให้เกิดต้นอ่อน 60

รูปที่ 5 แคลลัสอายุประมาณ 1 เดือน ที่มีลักษณะแบบ friable callus 61

รูปที่ 6 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และ หอมมะลิ 105 ที่มีความสม่ำเสมอ 61

รูปที่ 7 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยสภาพที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75,1.0, 1.25, 1.5, 1.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ รวม 9 ระดับ 63

รูปที่ 8 ชั้นของโปรโตพลาสตร์ (band) 63

รูปที่ 9 การเลี้ยงแบบหยดอาหารเล็กๆ 66

รูปที่ 10 เลี้ยงแบบ bead type ใช้ nurse cell 66

รูปที่ 11 แคลลัสอายุ 1-1.5 เดือน, เซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2 ใช้ในการฉายรังสี 68

รูปที่ 12 ย้ายแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีลงเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยง 69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 13 เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส เป็นระยะเวลา 1 เดือนได้แคลลัส 72

รูปที่ 14 แคลลัสพันธุ์หอมมะลิ 105 มีการพัฒนาไปหลายรูปแบบ เช่น แตกเป็นก้อนเล็กๆ ในสูตรอาหารที่รูปที่ มี Kinetin เป็นองค์ประกอบ,เกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร MS IAA 1:BA 4 , เปลี่ยนเป็นสีส้มเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีดำในสูตรที่มีฮอร์โมนมาก และสามารถเกิดเป็นแคลลัสเล็กๆสีขาวได้ใหม่ 73

รูปที่ 15 แคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 เกิดจุดเขียว 74

รูปที่ 16.1 แคลลัส พันธุ์บาสมาติ 370 อายุ 0.5 เดือน พบการเกิดรากในสูตรอาหาร NAA 3 , พบการเกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร BA 2 75

รูปที่ 16.2 แคลลัสในพันธุ์หอมมะลิ 105 อายุ 1 เดือน มีการเจริญในระยะ 2 สัปดาห์แรกและตายลงโดยเปลี่ยนเป็นสีส้มน้ำตาลและดำ 75

รูปที่ 17 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 จากการทดลองที่ 2 มาวางบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยออร์โมนระดับต่างๆเป็นเวลา 1 เดือนได้ผลดังรูป 76

รูปที่ 18 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์หอมมะลิ105 จากการทดลองที่ 2 มาวางบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยออร์โมนระดับต่างๆเป็นเวลา 1 เดือนได้ผลดังรูป 77

รูปที่ 19 ผลการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ที่ผ่านการทำแห้ง 78

รูปที่ 20 เกิดตุ่มขาวงอกออกจากก้อนแคลลัสที่ดำ 80

รูปที่ 21 เซลล์แขวนลอยในเวลา 3 เดือนมีขนาดสม่ำเสมอ 81

รูปที่ 22 เซลล์แขวนลอยได้จากการทดลองที่ 2 จะมี 2 ส่วน 82

รูปที่ 23 โปรโตคอร์ม 83

รูปที่ 24 ผลของความเป็นพิษของเกลือ 84

รูปที่ 25 เมล็ดพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถกงอกเป็นแคลลัสได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 1.0 เปอร์เซนต์ เมล็ดพันธุ์หอมมะลิ สามารถงอกเป็นแคลลัสได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 0.25 เปอร์เซนต์ 86

รูปที่ 26 ผลการเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสภาพที่มีเกลือ 87

รูปที่ 27 เซลล์แขวนลอยจะเปลี่ยนเป็นสีที่เข้มขึ้น 91

รูปที่ 28 เซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2 จะเปลี่ยนสีเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารมีเกลือ 92

รูปที่ 29 การพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอเป็นไมโครแคลลัส 93

รูปที่ 30 ไม่พบการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ทนเกลือได้แล้วในการเทผสมอาหารแข็ง 94

รูปที่ 31 - 43 ผลการแยกโปรโตพลาสตร์ 96-102

รูปที่ 44 - 53 ผลการพัฒนาของโปรโตพลาสตร์ 102-107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทย ประชากรอย่างน้อย 1 ใน 3 ของไทยมีอาชีพการทำนา และพลังงานที่ได้จากการรับประทานข้าวประมาณ 3 ใน 4 จากอาหารทั้งหมด แต่การปลูกข้าวของชาวนาไทยนั้นจะอาศัยธรรมชาติ ผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จะไม่คงที่ ซึ่งสาเหตุอาจสรุปได้ดังนี้

1. สภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป, น้ำท่วม, ภัยแล้ง
2. ปัญหาในเรื่องคุณภาพของดิน ได้แก่ ดินเค็ม, ดินเปรี้ยว, ดินมีโลหะหนักต่าง ๆ
3. ปัญหาเรื่องศัตรูพืชและโรคต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายแก่ต้นพืชและผลผลิต

ในการทำโครงงานพิเศษนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีอยู่มากในดินเค็ม และทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนเค็ม 2 แบบ คือ

1.การแยกโปรโตพลาสต์แล้วเลี้ยงในสภาพที่มีเกลือ เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันมากขึ้นในปัจจุบัน โดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการถ่ายถอดยีนที่ต้องการเข้าไปในโปรโตพลาสต์ เพื่อให้ได้ลักษณะพันธุ์ที่ดีขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อมนั้น ๆ ให้ผลผลิตในปริมาณที่มากขึ้น ต้านทานต่อโรคพืชและแมลง หรือ อาจจะนำโปรโตพลาสต์ของข้าวที่มีลักษณะดีจากสองแหล่งมาทำการรวมกัน ที่เรียกว่า "protoplast fusion" ก็ได้

2.การนำแคลลัสไปฉายรังสีแกมมาเพื่อให้เกิดความผิดปกติของยีนแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่ทำให้พัฒนาเป็นต้นซึ่งมีเกลืออยู่ด้วย

จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะได้ข้าวที่ทนเค็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของปัญหาพิเศษ

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้น
2. ชักนำแคลลัสให้เป็นเซลล์แขวนลอยโดยเลี้ยงในอาหารเหลว
3. ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยง แคลลัส เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสตร์
4. ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ข้าวเป็นธัญพืชที่จัดอยู่ใน Family Gramineae Genus Oryza Subtrible Oryzineae เป็นพืช diploid มีจำนวนโคโมโซม 2n = 24 เป็นพืชผสมตัวเอง เกือบ 100 เปอร์เซนต์ จึงมีความเป็น homozygus สูง มียีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆมากกว่า 300 ยีน ประกอบด้วย 23 species โดยเป็นข้าวป่า 21 species ข้าวปลูก 2 species ได้แก่ *Oryza sativa* มีปลูกกันทั่วไป และ *Oryza glaberrima* มีปลูกเฉพาะในแอฟริกาเท่านั้น

สำหรับข้าวพวก *Oryza sativa* ซึ่งมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ นั้นได้ยึดถือเอาลักษณะภายนอกของต้น เมล็ด และเปอร์เซนต์เมล็ดลีบของข้าวลูกผสมเป็นหลักในการแบ่งข้าวออกเป็น 3 พวก ได้แก่

1. Japonica เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เป็นต้น
2. Indica เป็นข้าวที่ปลูกในเขตร้อน ได้แก่ ไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น
3. Javanica เป็นข้าวที่ปลูกในอินโดนีเซียเท่านั้น (ประพาส,2531)

นิตย์ศรี (2533) เสนอแนะว่า การแยกโปรโตพลาสตร์สามารถทำได้จากเซลล์ที่มาจากแหล่งต่างๆของพืช ซึ่งวิธีการแยกก็แตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของเซลล์นั้นสำหรับแหล่งที่มาของเซลล์ที่จะเอามาแยกนั้นแบ่งออกเป็น 3 แหล่ง ดังนี้

1. จากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ยอด ตา ราก ลำต้น ข้อ หัว ผล เอมบริโอ เอนโดสเปิร์ม ละอองเรณู กลีบดอก ไฮโปคอททิล เป็นต้น แต่ส่วนที่นิยมมากคือ ใบเพราะว่าแยกง่ายและได้จำนวนมาก
2. จากแคลลัส ซึ่งได้มาจากการเพาะเลี้ยงต่างๆ ของพืช
3. จากเซลล์แขวนลอย ซึ่งได้มาจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว

สุรวิช (2536) กล่าวว่าการที่เซลล์ซึ่งเปลี่ยนรูปร่างไปแล้ว สามารถกลับมาเจริญเติบโตใหม่ได้นี้เอง ทำให้มีผู้สนใจนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงโดยการเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการเจริญเติบโตดีที่สุดนั้น นิยมใช้อาหารเหลวเพราะเซลล์ที่อยู่ในสภาพเซลล์แขวนลอยจะได้รับอาหารอย่างทั่วถึง เซลล์ทุกเซลล์มีการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอย่างถูกวิธีจะทำให้เซลล์เพิ่มปริมาณเร็วที่สุด เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยงอวัยยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มาของเซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของพืช ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะตามที่ต้องการ โดยนำเอาชิ้นส่วนนั้น ไม่ว่าจะเป็น ราก ใบ ดอก หรือ ผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มีเกลือแร่อยู่ในปริมาณมาก เช่น สูตร Murashige และ Skoog (1962) ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินในอัตราค่อนข้างสูง ทั้งนี้สารที่นิยมใช้ คือ 2,4-D การเพาะเลี้ยงในอาหารดังกล่าวจะทำให้เกิดแคลลัสซึ่งเซลล์เกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ เมื่อนำแคลลัสชนิดนี้ลงเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าเซลล์ก็จะหลุดจากกันมาแขวนลอยในอาหาร ทั้งนี้บางกรณีอาจใช้แท่งแก้วบี้ให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ นอกจากนี้ เซลล์แขวนลอยยังอาจได้จากการนำเอาเอมบริโอหรือต้นกล้าซึ่งอยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาย่อยเอาสารเพคตินอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของ middle lamella ออกด้วยเอนไซม์เพคติเนส ทำให้เซลล์ซึ่งเคยถูกยึดติดกันด้วย middle lamella หลุดออกจากกันมาแขวนลอยในสารละลาย เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยม

อนึ่งเซลล์แขวนลอยที่ดีนั้น ควรประกอบด้วยเซลล์กลุ่มเล็ก ๆ และเซลล์เดี่ยว ๆ มีความสม่ำเสมอด้านการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และด้านชีวเคมี

ระบบการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงเซลล์อาจกระทำได้หลายวิธี แต่ปัจจุบันนิยมกันอยู่ 3 วิธี คือ

1. การเลี้ยงใน microchamber

วิธีนี้นิยมเลี้ยงเซลล์แขวนลอยซึ่งประกอบด้วยเซลล์เดี่ยว ๆ วิธีนี้จะกระทำได้โดยหยดเซลล์แขวนลอยเป็นหยดเล็ก ๆ บน cover slide แล้วจึงคว่ำ cover slide นั้นบนสไลด์หลุม เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว ๆ ด้วย hanging drop technique บางกรณีอาจใช้ cover slide 2 แผ่นมาวางบนแผ่น slide ธรรมดาให้ห่างกันพอสมควร แล้วจึงวาง cover slide ที่มีเซลล์เดี่ยว ๆ หยดอยู่คว่ำลงไป วิธีนี้ให้ผลสำเร็จไม่สูงมากนัก จึงใช้เฉพาะกับการเลี้ยงเซลล์ครั้งละเซลล์เท่านั้น

2. การเลี้ยงในขวดบนเครื่องเขย่า

วิธีนี้นิยมใช้เซลล์แขวนลอยในปริมาณไม่มากนัก โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่ขวดทรงชมพู่ (erlenmeyer flasks) ขนาด 50-2000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำขวดนั้นไปวางบนเครื่องเขย่าแบบ obital ซึ่งจะเขย่าขวดในแนวราบด้วยอัตราเร็ว 30-150 รอบต่อนาที โดยเครื่องเขย่าหนศูนย์ราว 1.8-3.7 ซม สำหรับการเขย่านี้จะต้องขึ้นกับปริมาณอาหารในขวดด้วย เนื่องจากการเขย่าด้วยความเร็วเท่ากันเซลล์จะได้รับแรง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระแทกมากกว่า หากปริมาตรอาหารในขวดน้อยลง ปกติขวดขนาด 100 มล.จะใส่อาหารเหลวประมาณ 25 มล. หรือขวดขนาด 250 มล. จะใส่อาหารประมาณ 70 มล.

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้ จะต้องเปลี่ยนอาหารให้เซลล์อยู่เสมอ ทำให้เซลล์ขาดการเติบโตอย่างต่อเนื่อง จึงเหมาะสำหรับเลี้ยงในห้องทดลองเท่านั้น

3. การเลี้ยงในเครื่อง bioreactor

การเลี้ยงเซลล์วิธีนี้เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นปริมาณมากกว่า 1 ลิตรขึ้นไป โดยนำเซลล์แขวนลอยไปเพาะเลี้ยงในถังซึ่งมีการกวนด้วยใบพัดหรือเป่าอากาศให้เซลล์แขวนลอยมีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา เพื่อให้เซลล์ในถังขนาดใหญ่นั้นได้รับอากาศตลอดเวลา เซลล์แขวนลอยจะถูกตรวจสอบตลอดเวลาเพื่อให้มีการเปลี่ยนอาหารปรับปริมาณแก๊สและอุณหภูมิให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่เสมอ นอกจากนี้ระบบการเลี้ยงด้วยถัง bioreactor ยังมีการควบคุมการถ่ายเอาเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ออกมาใช้ประโยชน์ด้วย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยด้วยระบบนี้ นิยมกระทำเพื่อการผลิตสารเคมีจากเซลล์แขวนลอยในลักษณะอุตสาหกรรม เนื่องจากการผลิตเซลล์วิธีนี้สิ้นเปลืองแรงงานน้อย และควบคุมการผลิตได้อย่างสมบูรณ์

<u>ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย</u>

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น เซลล์จะมีการเติบโตแบบต่าง ๆ กันแบ่งได้เป็น 3 ระยะดังนี้

1 **Lag phase** ระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยมากเนื่องจากเซลล์ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพอาหารใหม่หลังจากการเปลี่ยนอาหาร ระยะนี้จะยาวขึ้นหากปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีอยู่น้อย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไปจึงเริ่มต้นด้วยเซลล์แขวนลอยในอัตรา 9,000-15,000 เซลล์/มล. เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตในระยะ Lag phase ไม่ยาวนัก

2 **Exponential phase** ระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก ทำให้ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อัตราการตายของเซลล์ในระยะนี้ไม่ต่างจากระยะ lag phase มากนัก เซลล์จะอยู่ในระยะนี้จนกระทั่งเซลล์แขวนลอยมีอยู่ราว 1-4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะต่อไป

3 **Stationary phase** ระยะนี้อัตราการเพิ่มปริมาณของเซลล์มีค่าใกล้เคียงกับอัตราการตายของเซลล์แขวนลอยคล้ายระยะแรก ปกติเซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ระยะนี้หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 18-25 วัน เซลล์ที่อยู่ในระยะนี้จะเข้าสู่ระยะ lag phase ต่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้างนานหากย้ายลงสู่อาหารใหม่ ดังนั้นระยะนี้จึงเป็นระยะสุดท้ายที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไป เพราะเซลล์จะไม่ถูกปล่อยไว้จนอัตราการเกิดใหม่ต่ำกว่าอัตราการตาย

ลักษณะการเจริญเติบโตข้างต้น การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในขวดบนเครื่องเขย่าจึงต้องมีการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 21-28 วัน แต่หากต้องการเร่งการเจริญเติบโตช่วงเวลาระหว่างการเปลี่ยนอาหารอาจลดลงเพียง 7-10 วัน

การตรวจสอบการเจริญเติบโต

ในเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงไว้นั้น อาหารที่ใช้ไปในช่วงเวลาหนึ่งจะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและซากเซลล์แขวนลอยปะปนกันอยู่ การตรวจนับจำนวนเซลล์เป็นเรื่องที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างมาก เพราะปริมาณเซลล์/หน่วยปริมาตรของอาหารที่ต่ำเกินไปจะทำให้เซลล์ตายได้เมื่อเทเซลล์แขวยลอนนั้นสู่ผิวอาหารวุ้น

การตรวจวัดปริมาณเซลล์อาจกระทำได้โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

1. การหาปริมาณเซลล์ที่อัดแน่น (packed cell volume) วิธีนี้เป็นวิธีวัดปริมาตรเซลล์ที่จะทำได้ง่ายที่สุด โดยเพียงนำเซลล์แขวนลอย 10 มล. มาใส่หลอดวัดปริมาตรสำหรับเครื่องปั่นเหวี่ยง (graduated centrifuge tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 1,000 g นาน 5 นาที ก็จะทราบปริมาตรเซลล์ที่อัดแน่นอยู่ก้นหลอด จากนั้นจึงเทียบปริมาตรเซลล์นั้นเป็นต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มล.

2. การหาน้ำหนักสด วิธีนี้อาจทำโดยนำเซลล์ที่อัดแน่นจากวิธีแรกมาชั่งหาน้ำหนักโดยนำเซลล์ที่ได้ไปวางบนกระดาษกรองเปียกซึ่งทราบน้ำหนัก ล้างเซลล์ด้วยน้ำบนกรวยเคลือบที่ใช้สูญญากาศดูด แล้วจึงนำกระดาษกรองพร้อมเซลล์มาชั่งน้ำหนัก จากนั้นคำนวณหาน้ำหนักสดของเซลล์ การหาน้ำหนักสดนี้จำเป็นต้องใช้เซลล์จำนวนมากจึงจะให้ผลที่แม่นยำ ทั้งนี้การแสดงน้ำหนักสดจะต้องแสดงต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มล

3. การหาน้ำหนักแห้ง วิธีนี้อาจทำโดยนำเซลล์ที่หาน้ำหนักสดแล้วมาอบให้แห้ง ณ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมงในตู้อบไอร้อน หรือ อบจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วรีบนำมาหาน้ำหนัก วิธีนี้ต้องใช้เซลล์จำนวนมากจึงจะมีความคลาดเคลื่อนน้อยลง การแสดงน้ำหนักแห้งก็ต้องแสดงต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มล

4. การนับจำนวนเซลล์ วิธีนี้อาจกระทำโดยนำเซลล์ที่อัดแน่นแล้วมาเติมกรดเกลือเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มล./เซลล์แขวนลอยตั้งต้น 10 มล. เขย่าเซลล์ให้กระจายตัวสัมผัสกับกรด แล้วแช่ไว้ที่ -5 องศาเซลเซียส 16-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายแล้วเติมกรดโครมิคเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มล. เก็บไว้ 3-5 วันที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นจึงเติมสารละลายผสมระหว่างกรดเกลือเข้มข้น 10% กับกรดโครมิคเข้มข้น 10% อัตราส่วน 1:1 แล้วทำให้เซลล์กระจายตัวใหม่ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 5-10 % เพื่อนำมานับจำนวนใต้กล้องจุลทรรศน์บน haemacytometer ทั้งนี้เซลล์ต้องมีจำนวนน้อยกว่า 250 เซลล์ต่อ field เพื่อให้การนับมีความแม่นยำ

5 การหา mitotic index วิธีนี้เป็นการนำเอาเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วยสีย้อมโครโมโซม เช่น aceto-orcein เข้มข้น 1% เพื่อดูการแบ่งเซลล์เนื่องจาก 4 วิธีที่กล่าวข้างต้นไม่สามารถเลือกวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตได้ หากแต่เป็นการวัดรวมทั้งปริมาณเซลล์ทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิต การแสดงค่า mitotic index จะเป็นการแสดงว่าในจำนวนเซลล์แขวนลอย 100 เซลล์มีเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวอยู่กี่เซลล์ โดยตรวจจากเซลล์แขวนลอยจำนวนไม่น้อยกว่า 1,000 เซลล์ วิธีนี้จะทำให้ทราบว่าเซลล์แขวนลอยมีความตื่นตัวมากน้อยเพียงไร

การใช้ประโยชน์

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอาจถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น

1. การศึกษาด้านสรีรวิทยาของเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีความสม่ำเสมอกันทั้งด้านรูปร่างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นจำนวนคราวละมาก ๆ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาพฤติกรรมทางสรีรวิทยาของเซลล์ได้ง่ายขึ้น

2. ใช้ในการผลิตสารเคมี เซลล์พืชบางชนิดเมื่อได้รับการปฏิบัติดูแลอย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เลี้ยงในสภาพแสงหนึ่งอุณหภูมิหนึ่งด้วยอาหาร ซึ่งมีเกลือแร่และสารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะเซลล์เหล่านั้น จะสร้างสารเคมีบางอย่างมากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งสารเหล่านี้จะเป็นพวก secondary matabolite เช่น สาร phenolic, terpnoid, และ alkaloid ดังนั้น บริษัทอุตสาหกรรมจึงได้นำเซลล์แขวนลอยของพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในถัง bioreactor ขนาดใหญ่ เพื่อเก็บเซลล์มาสกัดสารที่ต้องการ เช่น capsaicin จากเซลล์พริก, vanilla จากเซลล์ vanilla, สี betalain จากเซลล์ portulaca เป็นต้น

3. ใช้ในการคัดพันธุ์ ปกติเซลล์แขวนลอยที่เริ่มเลี้ยงไว้ในระยะแรกจะมีความสม่ำเสมออยู่สูง แต่เมื่อเลี้ยงนานขึ้นเซลล์จะมีความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมขึ้น ทำให้เราอาจนำเซลล์เหล่านี้มาคัดพันธุ์หาเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษได้ ซึ่งการคัดเลือกเซลล์นั้นจะทำให้ช่วยประหยัดพื้นที่ได้มากหากเทียบกับการคัดเลือกต้นพืชในแปลงปลูก อย่างไรก็ตามการคัดเลือกเซลล์นั้น เซลล์ที่คัดเลือกได้นั้นอาจมีลักษณะพิเศษตามต้องการ แต่ต้นพืชที่เกิดจากเซลล์นั้น ๆ อาจไม่มีลักษณะพิเศษก็ได้ เพราะการแสดงออกของยีนขณะเซลล์ยังอยู่ในสภาพเซลล์แขวนลอย ต่างจากการแสดงออกของยีนเมื่อเซลล์แต่ละเซลล์พัฒนาไปมีหน้าที่เฉพาะในต้นพืช

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะที่มีการคัดเลือกเซลล์

ก. การทนต่อสภาพเครียดจากสารเคมี

การคัดเลือกจะกระทำโดยเทเซลล์แขวนลอยลงบนอาหารวุ้นซึ่งมีการเพิ่มหรือลดสารเคมีที่สนใจ เซลล์ที่ทนได้ก็จะรอดชีวิตและเติบโตต่อไปได้ สารที่มีการเพิ่มลงในอาหาร ได้แก่ ยากำจัดวัชพืช เพื่อหาพืชที่ทนต่อยากำจัดวัชพืช, **เกลือ เพื่อหาพืชที่ทนดินเค็ม** และอลูมิเนียม เพื่อหาพืชที่ทนต่อสภาพดินที่มีอลูมินัมสูง เป็นต้น

ข. การทนต่อสภาพเครียดด้านน้ำที่เป็นประโยชน์

การคัดเลือกวิธีนี้ ทำง่าย ๆ โดยเพียงทำให้เซลล์พืชดูดน้ำจากวุ้นไปใช้ได้ยากขึ้น ซึ่งอาจทำโดยเพิ่มความแข็งของวุ้นหรือเพิ่มสารพวก manital หรือ PEG เซลล์ที่สามารถดูดนำไปใช้ได้ดีก็จะเจริญเติบโตต่อไปได้

ค. การทนต่อสารพิษจากเชื้อโรค

เชื้อโรคบางชนิดปลดปล่อยสารพิษออกมาทำลายเซลล์พืช เมื่อเชื้อเข้าทำลาย ดังนั้นจึงมีการสกัดเอาสารพิษนั้นมาใส่ในอาหารวุ้นเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ไม่ถูกทำลายมาเพื่อชักนำให้เกิดต้นพันธุ์ต้านทานต่อไป เชื้อที่มีการศึกษา ได้แก่ Pseudomonas syringae, Phoma และ Phytophthora infestans เป็นต้น

นอกจากการคัดพันธุ์เพื่อหาลักษณะต่าง ๆ ที่กล่าวแล้ว ยังมีการนำเซลล์แขวนลอยมาทดลองหาลักษณะอื่น ๆ อีกเช่น ความสามารถพิเศษในการผลิตสารบางอย่าง เป็นต้น การคัดพันธุ์ โดยการปรับแต่งสภาพแวดล้อมด้านเคมีและฟิสิกส์นั้น ผู้คัดพันธุ์จะต้องระมัดระวังเรื่องการปรับตัวทางสรีรวิทยาของเซลล์ โดยปราศจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมด้วย

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

(Plant Tissue Culture Medium)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน ซึ่งเป็นสารประกอบพวกอนินทรีย์ (inoganic compound) และพวกสารประกอบอินทรีย์ (oganic compound) เนื่องจากสารประกอบที่กล่าวมาเป็นสารกลุ่มใหญ่ ในที่นี้จึงขอจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ดังนี้

1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (inoganic compound) ประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ดังนี้

1 1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macro-nutrient) ได้แก่ C, H, N, O, P, K, S, Ca และ Mg

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (micro-nutrient) ได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, B และ Mo

2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (organic compound)

2.1 พวกวิตามิน (vitamin) วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น thiamine, nicotinic acid, pyridoxin, inositol, panthothenic acid, biotin, folic acid, chloline chloride, riboflavin และ ascorbic acid เป็นต้น

2.2 ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant hormons and plant growth regulators) ได้แก่

- สารในกลุ่มพวกออกซิน (auxin) เช่น indole acetic acid, indole butyric acid, naphthalineacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid เป็นต้น
- สารพวกไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น benzyladenine, kinetin, zeatin, isopentenyl adenine เป็นต้น

สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ เช่น gibberellic acid, paclobutrazol, abscissic acid เป็นต้น

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) ได้แก่สารประกอบพวกน้ำตาลต่าง ๆ เช่น glucose, sucrose, fructose, saccharose และ manitol เป็นต้น

2.4 พวกกรดอะมิโน (amino acid) ได้แก่ glutamine, asparagine, adenine, glycine และ casein hydrolysate เป็นต้น

2.5 สารประกอบอนินทรีย์อื่น ๆ ซึ่ง ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว, น้ำต้มมันฝรั่ง, น้ำคั้นมะเขือเทศ, กล้วยหอมบด, สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และจากมอลท์ (malt extract) เป็นต้น

ถึงแม้ว่าพืชทุกชนิดจะต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกันก็จริงอยู่แต่จะต้องการในเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจะมีความแตกต่างผันแปรกันไปอย่างยิ่ง ฉะนั้น ในการที่จะเลือกอาหารเพื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ผู้ทำการเพาะเลี้ยงควรคำนึงถึงเหตุผลต่าง ๆ ดังนี้

1. ความแตกต่างของชนิดหรือสายพันธุ์ (species or cultivar) พืชต่างชนิดกันต้องการธาตุอาหารที่ต่างกัน

2. ความแตกต่างของอายุพืช (age of plant) แม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างอายุกันก็อาจต้องการสารอาหารที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 ความแตกต่างของชิ้นส่วนพืช (explant material) พืชชนิดเดียวกันหรือในต้นเดียวกัน แต่ต่างชิ้นส่วนกัน เช่น ถ้าใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงก็จะใช้อาหารสูตรหนึ่ง แต่ถ้าใช้ส่วนของรากหรือใบก็อาจจะต้องใช้อาหารอีกสูตรหนึ่ง

4 เป้าหมายการเพาะเลี้ยง (target of culture) พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่เป้าหมายของการเพาะเลี้ยงต่างกันก็ต้องใช้อาหารต่างกัน ตัวอย่างเช่น ต้องการเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดก็ใช้อาหารสูตรหนึ่ง หากว่าต้องการเลี้ยงให้เกิดแคลลัส (callus) ก็จะต้องใช้อาหารอีกสูตรหนึ่ง เป็นต้น

5 สถานะของอาหาร (state of medium) พืชชิ้นส่วนเดียวกันที่เลี้ยงในสภาพของอาหารแข็ง (solid medium) และสภาพของอาหารเหลว (liquid medium) ผลที่ได้ออกมาอาจจะไม่เหมือนกัน

<u>การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย</u>

การพัฒนาของเอมบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยว ๆ แบ่งตัวออกเป็น 2, 4 เซลล์และทวีคูณไปเรื่อย ๆ จนได้กลุ่มเซลล์ (cell aggregation) ต่อมาพัฒนาเป็นก้อน (globular shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped, torpedo-shaped และเจริญไปเป็นต้นในที่สุด

<u>ปัจจัยที่ควรคำนึงในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ</u>

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกของตัวอย่างพืช ซึ่งพอสรุปดังนี้

1 ชนิดและชิ้นส่วนของพืช พืช แต่ละชนิดมีความยากง่ายในการเพาะเลี้ยงต่างกันและในพืชชนิดเดียวกัน แต่ต่างอวัยวะกัน การเพาะเลี้ยงก็แตกต่างกัน จริงอยู่แม้ว่าเซลล์พืชที่มีชีวิตอยู่ทุกเซลล์มีโอกาสที่จะเจริญเป็นต้นได้ (totipotency) แต่โอกาสไม่เท่าเทียมกัน

2 ธาตุอาหาร พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละอวัยวะต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ฉะนั้น จึงมีความจำเป็นในการเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสมกับพืชที่จะทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีผู้คิดค้นไว้มากมายหลายสูตร ต่อไปนี้จะขอกล่าวถึงธาตุอาหารที่มีบทบาทอย่างสำคัญในการชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนีซิส เพื่อเป็นแนวทางในการปรับใช้ควบคู่ไปกับการเลือกสูตรอาหาร

- ธาตุโพแทสเซียม (K) ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอมบริโอจีนีซิส
- การลดปริมาณของไนโตรเจน (N) ให้ต่ำกว่าระดับปกติ ในสูตรอาหารช่วยส่งเสริมให้เกิดเอมบริโอจีนีซิสดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- น้ำมะพร้าวส่งเสริมการเกิดเอมบริโอจีนีซิส
- น้ำตาลแซคคาโรส (saccharose) ที่ระดับความเข้มข้น 2-3% ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอมบริโอจีนีซิส
- ธาตุแคลเซียม (Ca)ในปริมาณสูง จะยับยั้งการเกิดเอมบริโอจีนีซิส

3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารเคมีที่พืชสร้างขึ้นเองหรือมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมา ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีทั้งส่งเสริมและยับยั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ขอยกตัวอย่างสารเคมีบางตัวที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนีซิส

- 2,4-D มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนีซิส
- จิบเบอเรลลิค แอซิด (Gibberllic acid) ยับยั้งการเกิดเอมบริโอจีนีซิส
- 7 aza-indole เป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิน จึงมีผลในด้านยับยั้งต่อเอมบริโอจีนีซิส
- เอทธีลีน (ethylene) ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ในระยะแรก
- BAP, IAA, IBA และ kinetin ยับยั้งเอมบริโอจีนีซิส
- Zeatin และ ALAR (succinic acid 2,7-methyl-hydrazide) ส่งเสริมการเกิดเอมบริโอจีนีซิส

4. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Environment factors)

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีบทบาทต่อกระบวนการเอมบริโอจีนีซิสมีดังนี้

4.1 แสง เอมบริโอจีนีซิสต้องการแสงที่ความเข้มค่อนข้างต่ำ ยกเว้นพืชบางชนิดที่ไม่ต้องการแสงในการเพาะเลี้ยง

4.2 อุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป (25 องศาเซลเซียส) เล็กน้อย

4.3 ก๊าซออกซิเจน เซลล์ที่มีกิจกรรมสูงย่อมต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจในปริมาณที่มากด้วย

4.4 <u>รังสี (Irradiation) เป็นตัวการทำให้ออกซิเจนสลายตัว มีผลไปยับยั้งการเกิดเอมบริโอจีนีซิส</u>

4.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีความแปรผันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนังเซลล์ (Cell Wall)

ผนังเซล ทำหน้าที่ป้องกันและให้ความแข็งแรงต่อเซลล์ ทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ ในพืชชั้นสูงทั่ว ๆ ไป ผนังเซลล์ประกอบด้วย 3 ชั้นใหญ่ ๆ ดังนี้

1 **Middle lamella** เป็นชั้นที่เชื่อมยึดระหว่างเซลล์สองเซลล์ให้ติดกัน ประกอบด้วยสารพวกแคลเซียมเปคเตต (calcium pectate) หรือ แมกนีเซียมเปคเตต (magnesium peptate)

2 **Primary wall** ผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิ เป็นผนังที่เกิดขึ้นครั้งแรกในขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตจะมีเส้นใยของเซลลูโลสที่เรียกว่า "ไมโครไฟบริล" (microfibril) เรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบพันกันไปมา พบในพวกพาเรนไคมา ฯลฯ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเพกติน (pectin)

3 **Secondary wall** ผนังเซลล์ชั้นทุติยภูมิ เป็นชั้นที่เกิดขึ้นหลังจากเซลล์หยุดการขยายขนาดแล้ว ดังนั้นจึงเจริญห่อหุ้มผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิเอาไว้ ทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ประกอบด้วยเซลลูโลสแต่ไมโครไฟบริลเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ พบในพวกไฟเบอร์ (fiber) เทรคีด (trachid) เวลเซล (vessel) สเคอเรนไคมา (sclerenchy-ma) ฯลฯ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose), ลิกนิน (lignin), คิวติน (cutin) และไข (wax)

<u>องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์มีหลายชนิด ดังนี้</u>

เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นโพลีแซกคาไรด์ ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอมมาต่อ ๆ กัน เรียกว่า "บีต้า-ดี-กลูโคส" (β -D-glucose) การเรียงต่อของเซลลูโลสในผนังเซลล์ เริ่มจากสายยาวของเซลลูโลสแบบง่าย ๆ แล้วก็ซับซ้อนขึ้นไปตามลำดับจนกลายเป็นไมเซลล์, ไมโครไฟบริลและแมกโครไฟบริล

สารประกอบเปคติค

สารประกอบเปคติคเป็นสารอนุพันธ์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรดกาแลคทูโรนิค (galacturonic acid) หลาย ๆ โมเลกุลมาจับกัน สารประกอบเปคติคที่พบมี 3 ชนิด คือ

- กรดเปคติค (pectic acid) ละลายน้ำได้ดี ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรดกาแลคทูโรนิคประมาณ 100 โมเลกุล

เปคติน (pectin) ละลายได้ดีในน้ำร้อน

- โปรโตเปคติน (protopectin) ไม่ละลายในน้ำร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบพวกเพคติน พบมากในชั้น middle lamella และพบน้อยในชั้นปฐมภูมิ
และทุติยภูมิ

เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายชนิดรวมกัน เช่น กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส กรดกาแลคทูโคนิค เป็นต้น แต่ไม่ได้รวมเป็นโครงสร้างแกนหลักของผนังเซลล์

เฮมิเซลลูโลสไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน dilute acid หรือ dilute alkli

ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารอินทรีย์ที่สำคัญที่ช่วยทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงได้ดี พบในผนังเซลล์ทุกชั้น แต่จะมีมากที่ผนังเซลล์ชั้นทุติยภูมิ

ลิกนินประกอบด้วยพอลิเมอร์ ที่เรียกว่า phynyl propane units การเชื่อมต่อกันเป็นแบบสุ่มเป็นสารเชิงซ้อนขนาดใหญ่ ทำให้ลิกนินในพืชต่างชนิดจะแตกต่างกันไป

สารประเภทไขมัน

สารประเภทไขมันที่พบมากที่ผนังเซลล์ คือ คิวติน (cutin), ซูเบอริน (suberin), และขี้ผึ้ง (waxes) โดยปกติคิวตินและซูเบอรินเป็นสารโมเลกุลใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมันอื่น ๆ คิวตินจะพบเป็นชั้นเคลือบที่ผิวใบและส่วนอื่น ๆ ของพืชเรียกชั้นนี้ว่า "คิวติเคิล"(cuticle) ซูเบอรินจะอยู่รวมกับเซลลูโลส พบมากที่ผนังเซลล์ของคอร์ก ขี้ผึ้งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่ละลายได้ดีในสารที่ละลายไขมัน พบว่าขี้ผึ้งมีการปะปนกับคิวติน หรือซูเบอริน หรืออาจพบว่าเคลือบอยู่ที่ชั้นคิวติเคิล ทำให้เนื้อเยื่อส่วนนี้มีสีขาวนวล

สารประเภทไขมัน จะช่วยลดการระเหยของน้ำ ป้องกันการชะล้างหรือแรงกระทบกระเทือนจากน้ำฝนหรือฝุ่นละออง ป้องกันเนื้อเยื่อต่อการเข้าทำลายของจุลินทรีย์

กัม (Gum) และเมือก (mucilages)

กัมและเมือกเป็นสารที่พบในผนังเซลล์พืชบางชนิดเท่านั้น

กัมเป็นสารที่พองตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับน้ำ

เมือกจะพบเป็นสารที่ห่อหุ้มเซลล์ไว้ มักพบในพืชน้ำและสาหร่ายบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast Culture)

โปรโตพลาสต์ คือ เซลล์เปือยเปล่า (nacked cell) ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (Plastma membrane) แต่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เจริญเติบโต และแบ่งเซลล์ได้ (Vasil, 1976) เซลล์ที่อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มเซลล์หรือ เนื้อเยื่อสามารถแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ได้เมื่ออยู่ในสถาพที่เป็นโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีปนังเซลล์มาห่อหุ้ม ดังนั้นโปรโตพลาสต์จึงเป็นหน่วยของสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทดลองด้านต่าง ๆ ซึ่งเซลล์ปกติที่มีผนังเซลล์ไม่อาจทำได้ เช่น การสอดใส่ออกาเนลล์ (organelle) ต่าง ๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์ พลาสมิด (plasmid) ตลอดจนสารพันธุกรรมจากแหล่งอื่น (forein genetic material) เข้าไปในโปรโตพลาสต์ ทำให้องค์ประกอบทางพันธุกรรมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป (transform cell) นอกจากนี้การรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion) ยังมีประโยชน์ในการผลิตพืชลูกผสม (somatic hybrid) ระหว่างพ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจนไม่สามารถผสมข้ามพันธุ์ตามธรรมชาติได้ ในระยะเวลา 15 ปีที่ผ่านมานี้การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในพืชต่าง ๆ ได้รับความสนใจเป็นอันมาก เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือที่สำคัญยิ่งต่อการจัดการยีน (genetic manipulation) เพื่อเปลี่ยนองค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืชให้แสดงลักษณะตามที่เราต้องการ อย่างไรก็ตามการจัดการยีนดังกล่าวจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับศักยภาพของโปรโตพลาสต์ของพืชนั้น ๆ เช่น ความสามารถในการสกัดหรือแยก (isolation) โปรโตพลาสต์จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้ได้ปริมาณมาก ๆ การเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ สร้างโคโลนี (colony) และพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration)

การสกัดโปรโตพลาสต์ (Protoplast isolation)

การสกัดโปรโตพลาสต์ (Protoplast isolation) จากพืชชั้นสูงจะต้องคำนึงถึงหลักการที่สำคัญ 2 ประการ คือ 1) ในการทำลายผนังเซลล์เพื่อปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกจากเซลล์จะต้องไม่ทำให้เกิดอันตรายกับโปรโตพลาสต์ และ 2) จะต้องรักษาแรงดันออสโมซิส (osmosis pressure) ให้เหมาะสมเพื่อโปรโตพลาสตัวอยู่ได้ ไม่แตกหรือเหี่ยวเฉา (Lal and Lal, 1990)

ชนิดของเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์

เนื้อเยื่อเกือบทุกส่วน ของพืชสามารถใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ได้ เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบ ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และผล แต่เนื้อเยื่อชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll tissue) ของใบและเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยง (culture cell suspention) เป็นเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่นิยมใช้ในการสกัดโปรโตพลาส์ เนื่องจากแหล่งทั้งสองให้ผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโตพลาสต์สูง และโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์แขวนลอย ซึ่งอยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีอายุภายหลังการเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) 2-4 วัน เป็นแหล่งของเซลล์ที่ใช้สกัดโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุด

วิธีการสกัดโปรโตพลาสต์ แบ่งออกได้เป็น 2 วิธี

1 วิธีกล (mechanical isolation) ในระยะแรก ๆ การสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อพืชกระทำโดยวิธีนี้ ซึ่งขั้นตอนแรกของการทำจะต้องชักนำให้เซลล์เกิดการพลาสต์โมไลซิส (plasmolysis) เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์ร่นจากผนังเซลล์ ซึ่งจะทำให้โปรโตพลาสต์มีรูปร่างกลม ๆ อยู่ตรงกลางเซลล์ ต่อจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่มีเซลล์อยู่ในสภาพพลาสโมไลซิสมาตัดให้เป็นแผ่นบาง ๆ นำไปแช่ในสารละลายเพื่อให้โปรโตพลาสต์ดูดน้ำจนเซลล์เต่ง ซึ่งจะมีผลทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออมาจากผนังเซลล์ อย่างไรก็ตามการสกัดโปรโตพลาสต์โดยวิธีนี้มีข้อจำกัด คือโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยและเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้รับความเสียหายจะปลดปล่อยสารบางชนิดออกมาซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์อื่น ๆ นอกจากนั้นวิธีการนั้นใช้ได้ผลดีกับเนื้อเยื่อบางชนิดที่เซลล์มีขนาดใหญ่ และมีช่องว่าง (vacuole) ภายในเซลล์ หรือเซลล์ที่มีรูปร่างยาว เช่น เซลล์ของใบ หัวกลีบ (bulb scale) เนื้อเยื่อชั้นผิวนอกสุด (epidermis) ของผล และเนื้อเยื่อที่มีการสะสมอาหาร (storage tisstue)

2. วิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation)

cocking (1960) เป็นคนแรกที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่สกัดได้จากเชื้อรา Myrothecium verrucaria ย่อยสลายผนังเซลล์ เพื่อสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อรากมะเขือเทศ ต่อมามีการใช้เอนไซม์ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อของพืชชนิดอื่น ๆ อีกมากมาย การสกัดโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์จะให้โปรโตพลาสต์จะให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตในปริมาณสูงโดยไม่ทำอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) ไดรเซลเลส (diselase) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสและเปคติเนส และเปคติเนส (pectinase) มาเซอโรไซม์ (macerozyme) ที่มีเปคติเนสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ เปคติเนสอื่น ๆ และเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จะใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของพืชนั้น ๆ การสกัดโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์กระทำมี 2 วิธี ดังนี้

ก วิธีสองขั้นตอน (sequential method) ทำได้โดยขั้นตอนแรกจะต้องนำเนื้อเยื่อใบที่ลอกผิวใบชั้นล่าง (lower epidermis) ออกไปแล้วมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแช่ในสารละลายมาเซอโรไซม์ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเปคติเนส เอนไซม์นี้จะทำลายมิดเดิล ลาเมลลา (middle lamella) ที่เชื่อมระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์มีโซฟิลล์ (mesophyll cell)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของใบแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ขั้นตอนที่สอง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในสารละลาย เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งจะทำให้โปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยออกมา

ข. วิธีขั้นตอนเดียว (one step method) ทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อพืชแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์ 2 ชนิดอยู่ปนกัน คือ เปคติเนส และเซลลูเลส เอนไซม์ทั้งสองจะย่อยสลายมิดเดิล ลาเมลลา ที่เชื่อมระหว่างเซลล์และผนังเซลล์พร้อมกันไป ทำให้โปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์อย่างรวดเร็ว วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีแรก เนื่องจากทำได้สะดวกกว่า รวดเร็วกว่า และลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์

การสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อพืชชั้นสูงจะประสบผลสำเร็จมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ดังนี้

1. สภาพทางสรีระของเนื้อเยื่อและเซลล์พืชที่เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์

สภาพแวดล้อมที่ปลูกพืชและอายุของพืชเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใส พืชที่ปลูกในเรือนกระจก (green house) ที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม กล่าวคือ มีความเข้มแสงต่ำ (10,000- 20,000 lux) อุณหภูมิ 20 - 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 - 80 % และให้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณสูง จะทำให้การสกัดโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนจะมีความมีชีวิตสูงกว่าโปรโตพลาสต์จากใบแก่ (Kao and Michaylux , 1980) นอกจากนี้การสกัดโปรโตพลาสต์จากใบของยอดที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Binding ,1975 , Schieder ,1978) และยังทำได้ง่ายกว่า เนื่องจากไม่ต้องฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวใบก่อนการสกัด

ในธัญพืชหรือพืชบางชนิดการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยหรือแคลลัสจะทำได้ง่ายกว่าจากใบ แต่ความสำเร็จขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต (growth stage) และอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ของเซลล์ โดยทั่วไปเซลล์ที่อยู่ในระยะลอกาลิซึม (logarithm) ของการเจริญเติบโต และเซลล์ที่มีอายุภายหลังการเปลี่ยนอาหารใหม่ 2 - 4 วัน จะเหมาะสมต่อการสกัดโปรโตพลาสต์มากที่สุด Kao et al., 1971; Uchimiya and Murashige, 1974 , Vasil and Vasil ,1979)

2. เอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์

เอมไซม์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์มีหลายชนิดที่ขายเป็นการค้าและสามารถใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ได้ ชนิดของเอนไซม์ที่จะเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้อาจเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันเพื่อทำลายองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ เช่น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

(hemicellulose) และเปคติน (pectin) เอนไซม์เซลลูเลส อาร์เอส (cellulase RS) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและเป็นเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่แรงที่สุดในทางการค้า นิยมใช้ในการย่อยผนังเซลล์หนา ๆ ของเซลล์แขวนลอย ส่วนไมเซลเลส (meicelase) ซึ่งเป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่อ่อนกว่า แต่ก็เหมาะสมต่อการย่อยผนังเซลล์ที่บางกว่าของเซลล์มีโซฟิลล์ของใบโดยไม่ทำอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเปคติเนสในการสกัดโปรโตพลาสต์แบบขั้นตอนเดียว มาเซอเรส (macerase) เป็นเอนไซม์ที่อ่อนมักใช้ร่วมกับเปคติเนส อย่างไรก็ตามเปคโตไลเอส วาย-23 (pectolyase Y-23) ควรเลือกใช้กับพืชที่สกัดโปรโตพลาสต์ได้ยาก

เอนไซม์ที่ขายเป็นการค้ามักจะมีสารพิษเจือปนอยู่ด้วยไม่มากก็น้อย เช่น นิวคลีเอส (nuclease) ซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ ดังนั้นบริษัทหลายแห่งจึงได้ดึงเกลือออกจาก (desalt) เอนไซม์ก่อนนำไปใช้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเซลลูเลสที่มีความบริสุทธิ์สูง ๆ มีประสิทธภาพในการสกัดโปรโตพลาสต์ต่ำกว่าเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ปานกลาง ซึ่งแสดงว่านอกเหนือจากเซลลูเลสแล้วคงต้องมีสารตัวอื่น ๆ ที่ไม่อาจบ่งบอกได้ ซึ่งจำเป็นในการสกัดโปรโตพลาสต์

3 ออสโมติคัม (osmotum)

ในระหว่างการสกัดโปรโตพลาสต์เอนไซม์จะย่อยผนังเซลล์ซึ่งถือว่าเป็นการทำลายสิ่งค้ำจุนของเซลล์ ดังนั้นแรงดันออสโมซิสของสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ล้อมรอบโปรโตพลาสต์จะต้องอยู่ในสภาพสมดุล ถ้าไม่สมดุลโปรโตพลาสต์จะเหี่ยว (plasmolysis) หรือแตก (burst) ได้ ลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ดีต้องเป็นปุทรงกลม ในระหว่างการสกัดโปรโตพลาสต์เซลล์ควรมีอาการเหี่ยวเล็กน้อย เพราะถ้าแรงดันออสโมซิสมากเกินไปจะทำให้ขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ลดลง และการสร้างผนังเซลล์จะไม่ดี โดยทั่วไปการปรับแรงดันออสโมซิสของสารละลายเอนไซม์กระทำได้โดยการเติมออสโมติคัม (osmoticum) ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลหรือเกลือแคลเซียม คลอไรด์ (CaCl2) ออสโมติคัมที่นิยมใช้มากที่สุด คือน้ำตาลแมนนิทอล (manitol) และซอร์บิทอล (sorbitol) โดยเฉพาะน้ำตาลแมนนิทอลเหมาะสมสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของใบ ส่วนกลูโคส (glucose) นิยมใช้เป็นสารปรับแรงดันออสโมซิสในการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย (Kao and Michayluk, 1974) ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ในการปรับแรงดันออสโมซิสโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 450-800 มิลลิโมลต่อสารละลาย 1 ลิตร (Bhowani and Razdan, 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25401

4. องค์ประกอบของสารประกอบที่มีภายในเซลล์พืช

องค์ประกอบในที่นี้หมายถึง สารประกอบบางอย่างที่พืชสะสมไว้ภายในเซลล์ของพืชเอง ไม่ว่าจะในรูปของผลึกต่าง ๆ หรือในรูปของสารละลายเข้มข้น เพราะจะมีผลต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์หลังจากแยกได้แล้ว ตัวอย่างของพืชที่พบว่ามีผลึกของสารประกอบอยู่ภายในเซลล์ คือ ลำโพง (*Datura spp.*) หรือ (*Chenopodium spp.*) เป็นต้น ผลึกดังกล่าวมักจะทิ่มแทงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาดและเป็นเหตุให้โปรโตพลาสต์แตกได้ง่าย

5. เทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์

เนื่องจากพืชแต่ละกลุ่มต้องการเทคนิคในการแยกโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน เช่น ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเราไม่สามารถลอกเอาเซลล์ชั้นนอกออกได้ต้องใช้วิธีหั่นให้เป็นฝอยด้วยมีดโกนที่คม ๆ แทน ซึ่งพบว่า ถ้าหั่นชิ้นหนาเกินไป จะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์น้อยตามไปด้วย เนื่องจากการแทรกซึมของเอนไซม์ไปยังเซลล์ต่าง ๆ เป็นไปได้น้อย

การแยกโปรโตพลาสต์โดยวิธีอาศัยการเขย่าช่วยก็เช่นกัน ถ้าปรับจำนวนรอบของการเขย่าสูงเกินไปก็จะทำให้โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก ถ้าปรับให้ช้าเกินไป จะเสียเวลานานในการแยก เป็นต้น

6. อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ จากข้อสังเกตปัจจัยข้อนี้ไม่ค่อยมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มากนัก เว้นแต่จะปรับให้อุณหภูมิสูงเกินไปจนทำให้เอนไซม์ที่ใช้เสื่อมคุณสมบัติ หรือทำให้โปรโตพลาสต์ตายหมด อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิสูงประมาณ 30 องศาเซลเซียสจะช่วยทำให้เวลาที่ใช้การแยกโปรโตพลาสต์นั้นสั้นลงกว่าอุณหภูมิต่ำประมาณ 25 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ก็ได้ แต่อุณหภูมิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการประมาณ 28 องศาเซลเซียส

7. บุคคลที่แยกโปรโตพลาสต์

เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์เป็นงานที่ต้องการความละเอียดและความเข้าใจเป็นอย่างยิ่ง ถ้าผู้แยกโปรโตพลาสต์ขาดคุณสมบัติทั้งสองแล้วจะทำการศึกษาให้ได้ดียาก ในระหว่างขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสต์ โดยเฉพาะในช่วงการถ่ายโปรโตพลาสต์หลังจากที่ปั่นให้ตกตะกอนแล้วนั้น ถ้าทำแรงเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้แตกเสียหายได้ง่าย เพราะเยื่อหุ้มเซลล์ในขณะนั้นค่อนข้างบางและฉีกขาดได้ง่าย

การทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์

ภายหลังการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบหรือเซลล์แขวนลอยแล้ว จะต้องมีการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ (purification) ซึ่งจะกระทำได้โดยการกรอง (filtration) การปั่น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยก (centrifuge) และการทำให้โปรโตพลาสต์ลอยตัว (floatation) การกรองซึ่งเป็นขั้นตอนแรกที่จะทำได้โดยการนำสารละลายซึ่งประกอบด้วยโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ และเศษชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ (debris) มากรองผ่านเครื่องกรองหยาบ ๆ ที่มีรูขนาด 40-100 ไมครอน ซึ่งอาจเป็นผ้าหรือในลอน เมช (nylon mesh) เซลล์ที่ไม่ถูกย่อยหรือเศษชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่จะถูกกรองไว้อยู่ด้านบนของเครื่องกรอง ส่วนโปรโตพลาสต์ เศษชิ้นส่วนขอนาดเล็ก และสารละลายเอนไซม์ซึ่งผ่านเครื่องกรองออกไปทางด้านล่างจะถูกนำไปปั่นแยกสาร ที่มีความเร็ว 75-100 * g นาน 2-3 นาที เพื่อทำให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอน (precipitate) ส่วนเศษชิ้นส่วนต่าง ๆ จะลอยอยู่ข้างบน เทชิ้นส่วนต่าง ๆ พร้อมกับสารละลายเอนไซม์ทิ้งไป เติมสารละลายใหม่ที่มีออสโมติคัมลงบนโปรโตพลาสต์ แล้วปั่นที่ความเร็ว 50 * g นาน 3-5 นาที ทำเช่นนี้อีก 2-3 ครั้ง เพื่อล้างทำความสะอาดโปรโตพลาสต์ และขจัดเอนไซม์ที่หลงเหล่ออยู่ หลังจากนั้นจึงนำโปรโตพลาสต์ไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป วิธีนี้เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ เพราะว่าได้ใช้ออสโมติคัมชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ตลอดขั้นตอนการทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์

อย่างไรก็ตามการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ โดยการกรองและปั่นแยกอาจรุนแรงเกินไปสำหรับโปรโตพลาสต์บางชนิดที่บอบบาง (delicate) ดังนั้นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้วิธีการทำให้โปรโตพลาสต์ที่ลอยตัว (floatation purification method) (Gamborg et al., 1981) เนื่องจากโปรโตพลาสต์มีความหนาแน่นต่ำกว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ของเซลล์และเศษชิ้นส่วนผนังเซลล์ วิธีการนี้ทำได้โดยผสมสารสกัดโปรโตพลาสต์ที่ยังไม่ผ่านการกรองกับสารละลายน้ำตาลซูโครสหรือซอร์บิทอลที่เข้มข้น แล้วนำไปปั่น โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์จะลอยตัวขึ้น เศษชิ้นส่วนต่าง ๆ จะตกตะกอนอยู่ด้านล่างแล้วใช้ปิเปต (pipette) ดูดโปรโตพลาสต์ออกมา ทำเช่นเดียวกันนี้ 3 ครั้ง ก็จะได้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงได้ ความเข้มข้นของน้ำตาล (ซูโครส) ที่ใช้สำหรับทำให้โปรโตพลาสต์ลอยตัวผันแปรอยู่ระหว่าง 0.3-0.6 โมลาร์ และความเร็วของการปั่นผันแปรอยู่ระหว่าง 40-80 หรืออาจถึง 350* g (Lai and Lai ,1990) วิธีนี้เหมาะสมสำหรับโปรโตพลาสต์ที่ไม่อาจทนทานต่อการกรอง แต่อย่างไรก็ตามต้องสามารถทนทานต่อการปั่นในขณะที่อยู่ในสารละลายน้ำตาลเข้มข้น

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

1) อาหาร อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป แต่เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์จึงสามารถดูดเกลือแร่ต่าง ๆ จากอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นอาหารที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงควรดัดแปลงให้มีอนินทรีย์สารในปริมาณต่ำ สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร คือ B5 (Gamborg et al., 1968) และ MS (Murashige and Skoog, 1962) ได้รับการดัดแปลงให้เป็นสูตรอาหาร 2 สูตร คือ 8P (Kao and Michayluk, 1975) และ NT (Nagata and Takebe, 1971) ซึ่งทั้งสองเป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มากที่สุด นอกจากนี้อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องใส่สารปรับแรงดันออสโมซิสด้วยเช่นเดียวกับสารละลายเอนไซม์ที่ใช้สกัดโปรโตพลาสต์ ปริมาณน้ำตาลในอาหารซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนก็ได้รับการดัดแปลงอย่างมาก Uchimiya และ Murashige (1976)รายงานว่าโปรโตพลาสต์ของยาสูบเจริญเติบโตดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส กลูโคส หรือเซลโลไบโอส (cellobiose) อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ของหญ้าโบรม (brome grass) ชอบอาหารที่มีซูโครส (Kao et al., 1971) ในขณะที่โปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศเจริญได้ดีบนอาหารที่มีทั้งกลูโคสและซูโครสในอัตรส่วน 2:1 (Morgan and Cocking , 1982)

ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) พวกออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ด้วย สำหรับโปรโตพลาสต์ของพวกธัญพืชต้องการออกซินชนิด 2,4-D (2,4 dichlorophenoxy acetic acid) เพียงอย่างเดียวก็พอ (potrykus et al., 1979) หรือดีกว่าเมื่อใส่ร่วมกับไซโตไคนิน (Vasil and Vasil , 1980) ชนิดและอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินในอาหารซึ่งเหมาะสมต่อการชักนำให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์นั้นผันแปรไปขึ้นอยู่กับชนิดพืช ออกซินที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ 2, 4-D อย่างไรก็ตาม Uchimiya และ Murashige (1976) รายงานว่า เอนเอเอ (NAA : naphthalene acetic acid) ดีกว่า 2- 4 D และ ไอเอเอ (IAA :indole acetic acid) ในการชักนำให้โปรโตพลาสต์ของยาสูบมีการแบ่งเซลล์ ส่วนไซโตไคนินที่นิยมใช้คือ บีเอพี (BAP : benzylamino purine) ไคเนติน (kinetin) และ 2- ip (2- isopentenyl adenine) โปรโตพลาสต์ที่สกัดจากเซลล์แขวนลอยต้องการอัตราส่วนนของออกซินต่อไคเนตินที่สูงเพื่อการแบ่งเซลล์ (Bhowani and Razdan, 1983) ความเป็นกรดด่างของอาหารก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ และมักจะผันแปรไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชเช่นกัน (Nagata and Ishii, 1979, Durand et al., 1973)

2) ออสโมติคัม (osmoticum) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะต้องควบคุมแรงดันออสโมซิสจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ การควบคุมแรงดันออสโมซิสของอาหารทำได้โดยการเติมน้ำตาลแมนนิทอลหรือซอร์บิทอลความเข้มข้น 500-600 มิลลิโมลต่อลิตร ในพืชบางชนิดอาจใช้กลูโคสแทนแมนนิทอลหรือซอร์บิทอลได้ แต่โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบของธัญพืชและถั่วไม่อาจใช้กลูโคสหรือซูโครสแทนแมนนิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือซอร์บิทอลได้ (Scott and Totten, 1977; Bidney and Shepard, 1980; Shahin and Shepard, 1980)

ภายหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปนานประมาณ 7-10 วัน โปรโพลาสต์ที่มีชีวต จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาและมีการแบ่งเซลล์ 2-3 ครั้ง ที่ระยะนี้ควรปรับแรงดันออสโมซิสของอาหารให้ค่อย ๆ ลดลง โดยการเติมอาหารใหม่ที่ไม่มีสารออสโมซิสหรือมีในปริมาณที่น้อยลง เมื่อโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และนร้างโคโลนี (colony) ขนาดใหญ่แล้วจึงย้ายลงสู่อาหารใหม่ที่ไม่มีสารออสโมติคัม

3) ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง (planting density) ในระยะแรก ๆ ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (planting efficiency) โดยทั่วไปโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงควรมีความหนาแน่น 1*10000 ถึง 1*100000 โปรโตพลาสต์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ถ้ามีความหนาแน่นมากเกินไป เมื่อแต่ละโปรโตพลาสต์เจริญเป็นโคโลนีอาจเกิดการลุกล้ำเข้าไปในโคโลนีของกันและกัน ทำให้เกิดเนื้อเยื่อหรือกลุ่มเซลล์ที่เป็นไคเมอรา (chimera) ถ้าหากโปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์มีพันธุกรรมแตกต่างกัน ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นต่ำ ๆ (100-500 โปรโตพลาสต์/ มล) เหมาะต่อการศึกษาและติดตามการเจริญและพัฒนาของเซลล์เดียวแต่ละเซลล์ กรณีนี้มักใช้เพื่อคัดเลือกโปรโตพลาสาต์ลูกผสมที่ได้จากการรวมตัวของโปรโตพลาสต์จากพืชคนละชนิดหรือสกุล (somatic hybridization) ออกจากโปรโตพลาสต์พ่อแม่ ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันโดยวิธีอื่น หรือใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของเซลล์

4) วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ส่วนมากดัดแปลงมาจากวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวและเซลล์แขวนลอย ซึ่งสามารถกระทำได้หลายวิธีดังนี้

4.1) การเลี้ยงเป็นหยด (drop culture) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด ทำได้โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 104-106 โปรโตพลาสต์/ มล. ลงบนจานแก้ว โดยแต่ละหยดมีปริมาณ 0.1-0.2 มล. ปิดผนึกฝาจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อป้องกันนการระเหยน้ำของอาหารและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การตรวจสอบการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงโดยวิธีนี้ สามารถทำได้โดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ(inverted microscope) การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยวิธีนี้มีข้อดี คือ เราสามารถเติมอาหารใหม่ที่ทราบความเข้มข้นให้กับโปรโตพลาสต์ได้ แต่ก็มีข้อเสีย คือ โปรโตพลาสต์มักจะมารวมตัวกันอยู่ตรงกลางหยดอาหาร ซึ่งถ้าโปรโตพลาสต์ปลดปล่อยสารพวกฟีโนลิค (phenolic) หรือสารพิษอื่น ๆ ออกมาในปริมาณมาก ๆ อาจเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ที่อยู่ข้างเคียงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2) การเลี้ยงในอาหารวุ้น (agar culture) ทำได้โดยการนำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลวผสมกับอาหารที่มีวุ้น 1-2 % ในปริมาณที่เท่ากัน แล้วเทอาหารวุ้นที่มีโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ปริมาตร 5 มล. ลงบนจานแก้ว ปิดผนึกฝาจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม การเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยวิธีนี้มีข้อควรระมัดระวัง คือ ชั้นของอาหารวุ้นจะต้องบางเพื่อให้โปรโตพลาสต์ได้รับอากาศเพียงพอ ข้อดีของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยวิธีนี้ คือ โปรโตพลาสต์จะถูกตรึงอยู่ในอาหารที่ตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใด จึงทำให้โปรโตพลาสต์อยู่แยกกัน ซึ่งจะช่วยลดความเป็นพิษของสารฟีโนลิคหรือสารพิษที่โปรโตพลาสต์ปลดปล่อยออกมาที่มีต่อโปรโตพลาสต์อื่น ๆ อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการผสมโปรโตพลาสต์กับอาหารวุ้นที่อุ่น ๆ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยการคนเบา ๆ อาจทำให้โปรโตพลาสต์ได้รับความเสียหายได้

4.3) การเลี้ยงในหลุมเล็ก ๆ (microculture chamber) วิธีนี้ใช้สำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์เดี่ยว ๆ หรือจำนวนน้อย ๆ ในจานที่มีหลุมขนาดเล็ก (0.25-25 ไมโครลิตร) จำนวนมาก ที่เรียกว่า คัพแรค ดิช (cuprak dish) โดยการหยดอาหารเหลวที่มีโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ปริมาตร 0.25-0.50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของจานหลุม แล้วปิดผนึกฝาจานหลุมด้วยพาราฟิล์ม วิธีนี้เหมาะสมสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมที่ได้จากการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์จากพืชต่างสกุลกัน เช่น Nicotiana glauca กับ Clycine max (Kao, 1977) และ Arabidopsis thaliana กับ Brassica campestris (Gleba and Hoffmann, 1978) เป็นต้น

4.4) การเลี้ยงโดยอาศัยชั้นวุ้นพี่เลี้ยง (feeder layer) วิธีการนี้ทำได้โดยนำโปรโตพลาสต์จำนวนมาก (10^5 โปรโตพลาสต์/ มล.) มาฉายด้วยรังสีเอ็กซ์ (X-ray) ในปริมาณรังสี (dose) ทำให้โปรโตพลาสต์หยุดการแบ่งเซลล์แต่ขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ยังดำเนินไปตามปกติ แล้วฝังโปรโตพลาสต์ลงในอาหารวุ้นโดยให้มีความหนาแน่น $2.4*10^4$ โปรโตพลาสต์ / มล ต่อจากนั้นเทอาหารวุ้นอุ่น ๆ ที่มีโปรโตพลาสต์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงผสมอยู่ในความหนาแน่นต่ำ ๆ (5-50 โปรโตพลาสต์/ มล.) ลงบนชั้นของอาหารวุ้นชั้นแรก ชั้นอาหารวุ้นของโปรโตพลาสต์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงจะนิ่มกว่าชั้นอาหารวุ้นของโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งจะทำหน้าที่เป็นพี่เลี้ยงให้กับโปรโตพลาสต์ที่ต้องการเพาะเลี้ยง วิธีการนี้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมซึ่งเพาะยากและต้องเลี้ยงในความหนาแน่นต่ำ ๆ ในส้มชั้นอาหารวุ้นพี่เลี้ยงซึ่งเป็นส้มซึ่งเป็นส้มชนิดหนึ่งซึ่งจะช่วยทำให้โปรโตพลาสต์ของส้มอีกชนิดหนึ่งมีการแบ่งเซลล์ดีขึ้น (Aviv and Galun, 1984)

4.5) การเลี้ยงโดยอาศัยเซลล์พี่เลี้ยง (nurse culture) วิธีนี้คล้ายคลึงกับวิธีที่ 4.4 ทำได้โดยฝังโปรโตพลาสต์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในชั้นอาหารวุ้น แล้วเทเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขวนลอยลงบนชั้นอาหารวุ้นอีกที่หนึ่ง เซลล์แขวนลอยดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cell) ให้กับโปรโตพลาสต์ที่ต้องการเลี้ยง นอกจากนี้เซลล์พี่เลี้ยงของพืชชนิดหนึ่งอาจช่วยให้โปรโตพลาสต์ของพืชอีกชนิดหนึ่งมีการเจริญเติบโตขึ้น (Cella and Galun, 1980)

5 สภาพการเก็บรักษาโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง (storage condition) อาจเก็บรักษาไว้ในที่มืดหรือที่มีแสงสลัว ๆ โปรโตพลาสต์ของพืชบางชนิดไวแสงมาก ดังนั้นจึงต้องเก็บรักษาไว้ในที่มืดสนิทก่อนประมาณ 4-7 วัน พอโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์แล้วและสามารถทนทานต่อแสงได้จึงนำมาเก็บรักษาไว้ที่มีแสง โดยทั่วไปเราจะเก็บรักษาโปรโตพลาสต์ไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส การศึกษาเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์มีน้อยมาก โปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศ (Zapata et al., 1977) และฝ้าย (Bhjwani et al., 1977) ไม่แบ่งเซลล์หรือแบ่งเซลล์ในอัตราที่ช้ามากเมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส จะแบ่งเซลล์ได้เร็วขึ้น

6 พืชทดลอง (plant material) สภาพทางสรีระของพืชหรือเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์มีผลต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบจะให้ผลดี ต้นพืชที่เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์จะต้องปลูกภายใต้สภาพที่ควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้น ใบของพืชที่ปลูกในสภาพแปลงปลูกมักจะให้ผลการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ไม่แน่นอน Shenck และ Hoffmann (1979) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากใบของต้น Brassica campestris และ B. oleracea ที่ปลูกในเรือนกระจกหรือในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (growth cabinet) จะไม่แบ่งเซลล์ แต่โปรโตพลาสต์ที่สกัดจากใบที่ตัดมาจากยอดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเป็นแคลลัสได้ Shepard และคณะ (1980) แนะนำว่าในการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบมันฝรั่ง ควรปลูกต้นมันฝรั่งในสภาพที่ควบคุมธาตุอาหาร อุณหภูมิ ความเข้มของแสงและช่วงแสง มิฉะนั้นโปรโตพลาสต์จะไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ ในพืชบางชนิดโปรโตพลาสต์จะสามารถแบ่งเซลล์ได้เมื่อแช่ใบในอาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 3-7 วัน ก่อนการสกัดโปรโต-พลาสต์ (Kao and Michayluk, 1980)

7 การสร้างผนังเซลล์

โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมจะเริ่มต้นสร้างผนังเซลล์ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง และภายใน 2-4 วัน ก็สามารถสังเกตเห็นผนังเซลล์ได้จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมโปรโตพลาสต์ด้วยสีย้อมคาลโคฟลอร์ (calcofiour)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Nagata and Takebe, 1970) หรือดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope) โดยการย้อมด้วยสีย้อมซิลเวอร์เฮกซามีน (silver hexamine) (Fowke et al., 1978) หรือดูจากกล้องจุลทรรศน์สแคนนิง (scanning microscope) (Burgess et al., 1978) โปรโต-พลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยจะสร้างผนังเซลล์ได้เร็วกว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบหรือเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ (Fowke, 1978) การสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์เกิดจากการสะสมเซลลูโลส ไมโครไฟบิล (cellulose microfibril) ที่ผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์

8. การแบ่งเซลล์และการเจริญเป็นแคลลัส

โปรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์สมบูรณ์แล้วจะไม่มีรูปร่างเป็นทรงกลมอีกต่อไป และจะเริ่มการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) ภายใน 2-7 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากใบหรือเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ที่ไม่เคยผ่านการแบ่งเซลล์มาก่อนเลย จะแบ่งเซลล์ครั้งแรกช้ากว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดจากเซลล์แขวนลอย ซึ่งมีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา (Vasil and Vasil, 1974) ภายในเวลา 1-3 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยงจะสามารถสังเกตุเห็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กหรือโคโลนี (colony) ซึ่งได้จากการแบ่งเซลล์หลาย ๆ ครั้ง โคโลนีที่ได้นี้อาจย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อให้เจริญเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่หรือแคลลัส (callus) หรืออาจย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเซลล์แขวนลอยต่อไป

9. การพัฒนาเป็นต้น

แคลลัสที่เจริญมาจากโปรโตพลาสต์เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสม จะสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (regeneration) และเมื่อชักนำให้ยอดสร้างรากจะได้ต้นที่สมบูรณ์ แต่ในพืชบางชนิด เช่น แครอท ส้ม ยาสูบ Atropa belladnna และ Pennisetum americanum แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะพัฒนาเป็นเอมบริออยด์ (embryoid) ซึ่งจะเจริญเป็นที่มีทั้งยอดและรากต่อไป ต้นพืชที่ได้สามารถย้ายลงปลูกในดินได้ แต่ดินที่ใช้เป็นวัสดุปลูกควรอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อน และในระยะแรก ๆ ควรปลูกในสภาพที่สามารถควบคุมความชื้นได้ เนื่องจากต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจะสร้างคิวติเคิล (cuticle) ที่ใบช้ากว่าปกติ จึงต้องการสภาพที่มีความชื้นสูงเพื่อป้องกันอาการเหี่ยวของใบเพราะการสูญเสียน้ำ ต่อมาจึงค่อย ๆ ลดความชื้นลงในขณะที่พืชมีความแข็งแกร่งขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งสามารถย้ายออกไปปลูกในสภาพเรือนกระจกหรือในสภาพไร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 การใช้ประโยชน์

เราสามารถนำโปรโตพลาสต์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้หลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือที่ดีมาก สำหรับการถ่ายทอดดีเอนเอ (DNA) หรือยีน (gene) ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม หรือออแกนเนลล์ในไซโตพลาสซึม เป็นหน่วยของเซลล์ที่ใช้ในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ และเป็นตัวทดสอบความอ่อนแอหรือทนทานต่อโรค

10.1) การถ่ายทอดยีนให้กับพืชโดยตรง (direct gene transfer) ประมาณ 10 ปีที่ผ่านมานี้นักวิทยาศาสตร์สามารถสกัดและถ่ายทอดยีนจากแหล่งอื่น (foreign gene) ให้กับต้นพืชโดยตรงโดยผ่ายทางโปรโตพลาสต์ เซลล์ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนแล้ว (transform cell)เมื่อชักนำให้พัฒนาเป็นต้น ต้นพืชที่ได้จะมีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปและแสดงลักษณตรงตามที่เราต้องการ (transgenic plant) จริง ๆ โดยไม่มีลักษณะที่ไม่ดีของพืชพันธุ์เดิมให้ติดมาด้วยเหมือนกับการถ่ายทอดยีนโดยการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพืชพันธุ์ให้และพันธุ์รับ วิธีการถ่ายทอดยีนให้กับโปรโตพลาสต์แบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ ดังนี้

10.1.1) การถ่ายทอดยีนโดยอาศัยพาหะ (vector) เช่น พลาสมิด Ti (Ti plasmid) ของแบคทีเรีย Agrobacterium tumefasiens หรือไวรัสบางชนิด เป็นตัวนำยีนหรือดีเอนเอเข้าไปในโปรโตพลาสต์หรือเซลล์พืช

10.1.2) การถ่ายทอดยีนให้กับโปรโตพลาสต์โดยตรง เช่น การฉีด (microinjection) หรือยิง (microprojectile bombardment) ดีเอนเอเข้าไปในโปรโตพลาสต์ การใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) และการใช้สารเคมีพีอีจี (PEG; polyethylene glycol)ชักนำให้ดีเอนเอเข้าไปในโปรโตพลาสต์ เป็นต้น ยีนควบคุมลักษณะที่เราสามารถถ่ายทอดให้กับพืชโดยตรงได้ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น การถ่ายทอดยีน aro A ซึ่งเป็นยีนที่สกัดได้จากแบคทีเรีย Salmonella typimurium เข้าไปในโปรโตพลาสต์ของยาสูบ ทำให้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายทอดยีนมีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (glyphosate) สูงขึ้น (Comai et al , 1985) การถ่ายทอดยีน Bt ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย Bacillus thuringensis เข้าไปในมะเขือเทศ ทำให้มีเขือเทศมีระดับความต้านทานต่อแมลง Lepidoteran สูงขึ้น (Fischhoff et al , 1987) และการสอดใส่ยีนที่ควบคุมการสร้างเกราะโปรตีน (coat protein) จากเชื้อไวรัสทีเอมวี (TMV tobacco mosaic virus) เข้าไปในโปรโตพลาสต์ของมีเขือเทศ ทำให้ต้นมะเขือเทศที่ได้รับยีนนี้มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส TMV (Nelson et al , 1988) เป็นต้น

10.2) การผลิตลูกผสมระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลกัน (somatic hybridization)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเชื่อมหรือรวมโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน (protoplast fusion) เป็นวิธีทางหนึ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำไปใช้ในการผลิตลูกผสมระหว่างพืชต่างชนิด (species) หรือต่างสกุล (genus) ที่ไม่สามารถผสมข้ามพันธุ์กันได้โดยอาศัยเพศ (sexually incompatible) การรวมโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกันอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี (fusogen) บางชนิด เช่น PEG หรือการใช้กระแสไฟฟ้าชักนำให้โปรโตพลาสต์มารวมกัน (electrofusion) การรวมโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกันทำให้ได้พืชลูกผสมชนิดใหม่ที่รวมเอายีนในนิวเคลียสซึ่งควบคุมลักษณะที่ต้องการจากพ่อและ/หรือแม่ เช่น ลูกผสมระหว่าง Solanum tuberosum กับ S. brevgidens (Helgesonet al., 1988) Lycopersicon esculentum กับ L. penellii (O' Connell and Hanson, 1985) และ Citrus sinensis กับ Ponsirus trifoliata (Ohgawara et al., 1985) นอกจากวิธีนี้ยังอาจใช้ในการถ่ายทอดยีนควบคุมลักษณะที่มีตำแหน่งอยู่บนออกาเนลล์บางชนิด เช่น คลอโรพลาสต์ (chloroplast) และไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมของพืชชนิดหนึ่งให้กับพืชอีกชนิดหนึ่ง (cybrid plant) โดยการฉายรังสีของพืชชนิดหนึ่งเพื่อทำลายนิวเคลียสของเซลล์ แล้วจึงรวมโปรโตพลาสต์ดังกล่าวกับโปรโตพลาสต์ปกติของพืชอีกชนิดหนึ่งเข้าด้วยกัน (Asymetric somatic hybridization) ออแกนเนลล์ในไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ที่นิวเคลียสถูกทำลายจะถูกถ่ายทอดให้กับโปรโตพลาสต์ที่มีนิวเคลียสปกติ เช่น Manczel และคณะ (1986) ประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชอะทราซีน (atrazine) ที่มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิด (plasmid) ในไซโตพลาสซึมของยาสูบ Nicotiana plumbaginifolia ไปยังยาสูบพันธุ์ปลูก (N. tabacum) โดยการนำโปรโตพลาสต์ของ N. plumbaginifolia มาฉายรังสีเอกซ์ก่อนการนำให้รวมตัวกับโปรโตพลาสต์ของ N. tabacum มาฉายรังสีเอกซ์ก่อนการชักนำให้รวมกับโปรโตพลาสต์ของ N. tabacum

10.3) การคัดเลือกพืชกลายพันธุ์ (selection of mutant) เป็นที่ทราบกันดีว่าการกลายพันธุ์ (mutation) เกิดขึ้นในระหว่างต้นพืชที่พัฒนามาจากโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง ทำให้เราสามารถคัดเลือกต้นพืชกลายพันธุ์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการออกมาได้ ยิ่งกว่านั้นนักวิทยาศาสตร์บางท่านยังใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) กับโปรโตพลาสต์เพื่อชักนำให้อัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น ทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น Carlson (1973) สามารถคัดเลือกยาสูบ (N tabacum) ต้านทานโรคไฟลามทุ่ง (wildfire disease) ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Psuedomonas tabaci ได้จากโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีอีเอ็มเอส (EMS ethyl methyl sulfonate) Vunsh และคณะ (1982) คัดเลือกกลายพันธุ์ยาสูบ (N tabacum และ N sylvestris) ที่ต้านทาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อสารวาลีน (valine) จากโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการฉายรังสีเอกซ์เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

10.4 การใช้โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโรคพืช (phytotoxin) โปรโตพลาสต์และเซลล์แขวนลอยเป็นเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบ (bioassay) ความเป็นพิษของสารสกัด (filtrate) จากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบว่าต้นพืชที่เราคัดเลือกได้มีความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค เช่น Behnke และ Lonnendonder (1977) พบว่าเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่งถูกฆ่าเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อรา Phytopthora infestans ในความเข้มข้นที่เจือจางเป็น 100 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสซึ่งถูกฆ่า เมื่อสารสกัดมีความเข้มที่เจือจางลงเป็น 25 เท่า เช่นเดียวกับใบจะแสดงอาการเป็นโรคเมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นที่เจือจางเป็น 25 เท่า ในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อรา Helminthosporium maydis ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ (leaf blight) ต่อสารพิษมากกว่ารากหรือใบจากต้นถึง 10-100 เท่า (Earle et al , 1971)

การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีหลายวิธี มีข้อปลีกย่อยแตกต่างกันทั้งเรื่องสูตรอาหาร เอนไซม์ที่ใช้ย่อยและอื่น ๆ แต่ในที่นี้เป็นวิธีที่ดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับระบบที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

การแยกโปรโตพลาสต์

- เตรียม cell protoplast wash solution (CPW) ซึ่งประกอบด้วย manitol 0.35 M
- เตรียม enzym solution โดยละลายใน CPW ที่ประกอบด้วย 2% cellulase และ 1% acerozyme
- ตั้งบน syring plate คนช้า ๆ อย่างน้อย 3 ชั่วโมง นำมากรองด้วย pre-filter paper แล้วใช้ 0.45 um filter unit หรือใช้ syring ไม่จำเป็นต้องปรับ pH เพราะจะอยู่ประมาณ 5.4-5.7 สามารถเก็บใน flask ปิดผนึกให้แน่นและไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อาจเก็บได้นาน 1-2 เดือน หรือแช่แข็งได้นานกว่านี้
- ใช้ pipette ดูด cell suspension หลังจาก subculture 2-4 วัน (ในที่นี้เป็น cell suspension ของข้าวที่มีความละเอียดและเจริญรวดเร็ว) ใส่ใน petri plate ประมาณ 8-10 มล. ใช้ pasteur pipette ดูดอาหารเก่าทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ล้าง cell ด้วย CPW 3 ครั้ง แล้วนำ cell ที่ดูดน้ำออกแล้วใส่ plate ใหม่ 1 กรัม

- เติม enzyme solution 15 ml. ใน plate ขนาด 1.5*10 ซม. ปิดผนึกด้วย parafilm นำไปเขย่าบน shaker ความเร็ว 45-50 rpm (อย่าให้ถูกแสง) เป็นเวลานาน 2-6 ชั่วโมง

- ตรวจดูว่า cell ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม แสดงว่าไม่มีผนังเซลล์แล้ว จึงนำมากรองด้วย nylon mesh ขนาด 74 และ 45 um. ที่บรรจุใน beaker เล็ก

- ใช้ pasteur pipette ดูด protoplast ใส่ใน centrifuge tube นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วประมาณ 700 rpm หรือประมาณ 100*g นาน 10 นาที

- ดูด enzyme solution ทิ้ง (หรือกรองให้สะอาด เก็บไว้ใช้ได้อีก 1-2 ครั้งถ้าจำเป็น)

- เติมสารละลาย 20% sucrose (ละลายในน้ำหรือ CPW) 1 ml เพื่อ resuspend protoplast แล้วค่อย ๆ เติมสารละลายนี้อีก 9 ml. จากก้นหลอด โดยใช้ pasteur pipette สารละลายผสมโปรโตพลาสต์จะถูกดันลอยขึ้นข้างบน

- เติม CPW 1 ml ข้างบนอย่างช้า ๆ จะปรากฏชั้นแขวนลอยตรงกลาง

- นำไป centrifuge ดังกล่าวมาแล้ว จะได้ protoplast ที่ดีชั้นอยู่ระหว่างของเหลวทั้ง 2 พวกที่ตายแล้วจะตกลงก้นหลอด

- ค่อย ๆ ใช้ pasteur pipette ดูดชั้นแขวนลอยออกใส่หลอดใหม่ แล้วล้างด้วย CPW อีก 2 ครั้ง ๆ ละ 8-10 ml. จะได้ protoplast ที่สะอาด หลังจากนั้นนำไป centrifuge ครั้งสุดท้าย

- เติม culture medium 1 ml. (ซึ่งเป็นอาหารสูตร 8p ที่ใช้ manitol 0.35 M) อาจนำตัวอย่างไปนับจำนวน protoplast ที่ได้ เพื่อทำการปรับ density หรือนับ viability ด้วยการย้อมด้วย FDA (fluoresein diacetate) (ดูภาคผนวก)

การปรับ density ตอนนี้ต้องให้หนาแน่นเป็น 2 เท่าที่ต้องการ (คือ 6-8*105 cell/ml.) เพราะตอนเลี้ยงจะต้องเติม 2.4 % agarose ลงไปปริมาณเท่ากับ protoplast suspension

การย้อมด้วย FDA จะต้องเตรียม stock โดยใช้ FDA 5 mg ละลายใน 1 ml acetone แล้วใช้ stock นี้ 0.5 ml ผสมกับ 4.5 ml medium (ในกรณีนี้เป็นสูตรอาหาร 3p) จะได้สารละลาย FDA 0.01% ซึ่งนำไปหยดลงบนตัวอย่างบนสไลด์ 1 หยด จากนั้นอีก 5 นาที จึงนำไปส่องดูด้วยกล้องที่มี ultraviolet light เซลล์ที่มีชีวิตจะติดมีเขียวเรืองแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

วิธีที่ 1 เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (Plating in Agar)

1.1 ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น 2*105 cell/ml ให้อาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์

1.2 หลอม agarose ความเข้มข้น 1.2% และปล่อยให้เย็นประมาณ 45 *C ก่อนที่ agarose จะแข็งตัว

1.3 ดูด protoplast มาประมาณ 1-1.5 cc ใส่ลงใน plate ขนาด 50*9 mm และใส agarose ลงไปในปริมาตรที่เท่ากันไว้คนละด้าน

1.4 เอียง plate เบา ๆ ให้โปรโตพลาสต์และวุ้นไหลมาผสมกันอย่างช้า ๆ ทิ้งไว้สักครู่หนึ่ง

1.5 ปิดด้วย parafilm ตรงขอบ plate แล้วเก็บไว้ในที่มืด หรือแสงอ่อน ๆ อุณหภูมิประมาณ 25*C

วิธีที่ 2 การเลี้ยงแบบหยดอาหารเล็ก ๆ (Hanging Drop Culture)

2.1 ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ให้เป็น 1*105 cell/ml ในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์

2.2 ใช้ pasteur pipette ปลายที่มีขนาดเล็กกว่าปกติ ดูดโปรโตพลาสต์มาแล้วหยดลงบนฝาด้านในหรือตัวของ plate plastic (แต่ละหยดจะมีขนาดประมาณ 20-40 micron)

2.3 คว่ำฝา plate ลงกับตัว plate

2.4 ปิดด้วย parafilm และเก็บไว้ในกล่องที่ควบคุมความชื้น

<u>หมายเหตุ</u> การเลี้ยงด้วยวิธีนี้ต้องหมั่นเติมอาหารลงไปที่หยดโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงไว้บ่อย ๆ

วิธีที่ 3 การฝังลงในอาหารวุ้นแล้วเลี้ยงในอาหารเหลว (Liquid on Agar Culture)

3.1 เตรียม agarose ความเข้มข้น 4.5% นำไป autocleave

3.2 ผสม agarose อาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของปกติ ในอัตราส่วน 1:1

3.3 นำสารละลายวุ้นในข้อ 3.2 ที่ยังไม่แข็งตัว มาผสมกับโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารที่มีความเข้มข้นปกติ (ความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ 2*105/ ml) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ

3.4 เท agarose ที่มีโปรโตพลาสต์ฝังอยู่เป็นส่วน ๆ แล้วเลี้ยงใน flask อาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ ความเข้มข้นปกติ นำไปเขย่าเบา ๆ ด้วยเครื่องเขย่า

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีที่ 4 การเลี้ยงโดยอาศัยเซลล์พี่เลี้ยง (Nurse Cell Culture)

4.1 ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์แล้วใส่ไว้ใน plate ขนาด 20*60 mm จำนวน 1.25 ml แล้วเติม 2.4% agarose culture medium จำนวนเท่ากัน เขย่า plate ค่อย ๆ เพื่อให้ผสมกันสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

4.2 เติมอาหารเหลวชนิดเดียวกันแต่มี nurse cell ผสมอยู่ลงไป 2.5 ml แล้วปิดผนึกด้วย parafilm ใส่ในกล่องปิดทึบวางบน shaker เขย่าด้วยความเร็ว 50 rpm อุณหภูมิ 28°C

หมายเหตุ เตรียม nurse cell โดยเตรียมอาหารสูตร 8p ใช้ manitol ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ผสมกับ cell suspension ในปริมาณเท่ากัน

4.3 หลัง 7 วัน ดูด nurse cell suspension ออก 80% (4 ml) แล้วเติมด้วยอาหารที่มี manitol 4% ปริมาณ 4 ml เลี้ยงต่ออีก 7 วัน

4.4 ดูดเอา nurse cell ออกหมด ล้างด้วยน้ำ 4-5 ครั้ง แล้วเติมด้วยอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เลี้ยงต่ออีก 2 สัปดาห์

4.5 ย้ายแผ่น agarose ที่มี microcolony ลงวางบนอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ใส่ 0.2% gelrite เพื่อให้เจริญเป็นแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดพืชกลายพันธุ์ด้วยรังสี

เซลล์พืชประกอบด้วยชีวโมเลกุลต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเป็นโครงสร้างและการทำหน้าที่ต่างๆภายในเซลล์ ชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์พืช เป็นแหล่งสะสมอาหารได้ใช้ โปรตีนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่แคลททาไลซ์ ในปฏิกิริยาที่สำคัญต่างๆภายในเซลล์ ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนและเป็นแอนติบอดี คอยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในเซลล์ ลิพิดมีหน้าที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างต่างๆ เช่น เป็นเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่อหุ้มออร์แกแนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์ กรดนิวคลีอิกทไหร้ที่เป็นสารพันธุกรรม ภายในเซลล์ยังมีสารอนินทรีย์ต่างๆอยู่ด้วย เช่น โซเดียม แมนิเซียม เป็นต้น และโลกุลที่มีมากที่สุดในเซลล์คือ น้ำมีปริมาณ 70-80 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักเซลล์

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสีต่างๆเช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา หรือรังสีนิวตรอน รังสีถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ ในกระบวนการถ่นพลังงานให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน และ ฟลีแรดดิแคล ต่างๆ ได้โดยตรงเรียกว่า ไดเรคแอคชัน (direct action) หรือส่งผ่านโดยทางอ้อมเรียกว่า อินไดเรคแอคชัน (indirect action)

ในการส่งผ่านโดยทางอ้อม รังสีถ่ายพลังงานให้กับโมเลคุลของน้ำที่มีอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมากทำให้คมเลกุลของน้ำแตกตัวเป็นไอออนและฟลีแรดิคอลต่างๆ เรียกรวมกันว่าเรดิโอไลโปรดัคท์ (radiolytic product) พวกโมเลกุลเหล่านี้สามารถเข้าทำอันตรายกับชีวโมเลกุลในเซลล์ดังกล่าว ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้าง และหน้าที่ของชีวโมเลกุลได้ดั้งนั้น อันตรายที่เกิดจากรังสีของเซลล์จึงเป็นผลมาจากการรับรังสีนั้นโดยทางตรงและทางอ้อม

เนื่องจากชีวโมเลกุลใหญ่ดังกล่าวนี้ มีหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ และมีความสำคัญต่อเซลล์มากน้อยต่างกัน เมื่อคุณสมบัติทางชีวเคมีของโมเลกุลเหล่านั้นเปลี่ยนไปก็จะไปกระทบกระเทือนต่อเซลล์ที่โมเลกุลเหล่านี้ทำหน้าที่อยู่ด้วย ผลที่ออกมาในขั้นสุดท้าย คือ ถ้าไม่รุนแรงนัก เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ แต่ความสามารถในการแบ่งเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงไป เช่น เกิดความล่าช้าในการเข้าสู่การแบ่งเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังเซลล์ลูกหลานได้เรียกว่าเกิดการกลายพันธ์ หรือถ้ารุนแรงมากทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้และตายในที่สุด

ภายในเซลล์มีกระบวนการซึ่งทำหน้าที่ลดอันตรายจากรังสีหรือสารเคมีให้น้อยลง โดยทำการซ่อมแซม DNA ที่ได้รับความเสียหายจากรังสีหรือสิ่งก่อกลายพันธุ์อื่น ๆ ให้กลับคืนเป็นปกติหรือให้ทำหน้าที่เดิมได้ กระบวนการดังกล่าว เรียกว่า กระบวนการซ่อมแซม DNA (DNA repair process) การซ่อมแซม DNA เกิดขึ้นได้ทั้งก่อนที่ DNA มีการจำลองตัวเองแล้ว (pre-replication repair) หรือระหว่างการจำลองตัวเอง และภายหลังที่ DNA เป็นการทำงานของกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ร่วมกัน เช่น กระบวนการซ่อมแซม DNA ที่เรียกว่า เอกซิชัยรีแพร์ (excition repair) มีเอนไซม์เข้าทำงานในขั้นตอนต่าง ๆ ตามลำดับ เช่น เอนไซม์เอนโดนิวคลิเอส ทำงานโดยเริ่มตัดตรงบริเวณที่มีความเสียหายเกิดขึ้น เอกโซนิวคลิเอส ทำการย่อยสลายนิวคลิโอไทด์ หลังจากการทำงานของเอนโดนิวคลิเอส เอนไซม์โรลิเมเรส ทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใหม่ขึ้นทดแทนตรงส่วนที่ตัดออก โดยใช้เส้นเดี่ยวของ DNA ที่ไม่ได้รับความเสียหายเป็นแม่พิมพ์ เอนไซม์ ไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างท่อนของ DNA ที่สร้างใหม่ให้เชื่อมต่อกับอันเดิม

ความเสียหายของ DNA ถ้าไม่ร้ายแรงนัก ก็จะได้รับการซ่อมแซมให้กลับคืนเป็นปกติได้ ส่วนของ DNA ที่มีความเสียหายรุนแรง หรือเป็นความเสียหายชนิดซับซ้อนเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมให้กลับคืนดีได้ เช่น การซ่อมแซมที่นำเอานิวคลิโอไทด์ที่ต่างจากเดิมเข้ามา หรือการเชื่อมต่อผิดพลาดทำให้เกิดการหายไปของ DNA (deletion) หรือเกิดการเชื่อมต่อสลับ (inversion) หรือมีการเชื่อมต่อระหว่างส่วนของ DNA ที่ต่างโมเลกุลกัน (transiocation) ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เรียกว่า การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ เป็นความเสียหายทางชีวเคมีที่สามารถถ่ายทอดได้โดยผ่านเซลล์ที่แบ่งตัว รังสีแกมมา รังสีนิวตรอน และรังสีเอกซ์ ทำให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ ขึ้น กับโคโมโซม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยอาศัยกล้องจุลทัศน์ เช่น การเกิดเบรค (break) บริดจ์ (bridges) อินเวอร์ชัน (invertion) ทรานสโลเคชัน (transiocation) ดิลิชัน (deletion) ไมโครนิวเคลียส (micronucleus) เป็นต้น ผลจากรังสีที่เห็นได้ในลักษณะอื่น ๆ เช่นขัดขวาง การสังเคราะห์ DNA ในระอินเตอร์เฟส ขัดขวางกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน และการทำลายโครงสร้างของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ทำให้เกิดความล่าช้าในการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสรวมทั้งการลิดความอยู่รอดของเซลล์และกระบวนการสืบพันธุ์ของเซลล์ได้

การกลายพันธุ์ที่เกิดโดยการเหนี่ยวนำโดยรังสีก็เช่นเดียวกับที่เกิดตามธรรมชาติ หากการเปลี่ยนแปลงมีของเบตอยู่ในจีน เช่นการหลุดหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของเบส หรือการเข้าแทนที่ของเบสตัวหนึ่งด้วยเบสตัวอื่น เช่น เบสพวรินแทนที่ด้วยไพลิมิดิน เป็นต้น การกลายพันธุ์ดังกล่าวนี้ เรียกว่า การกลายพันธุ์ของจีน ส่วนการเปลี่ยนแปลางเนื่องจากการหลุดหายไปของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมจีน หรือเกิดการเปลี่ยนในลำดับของจีนบนโครโมโซม หรือการเพิ่มเข้สมาของส่วนของโครโมโซม หรือมีการแลกเปลี่ยนส่วน และเชื่อมต่อส่วนของโครโมโซมระหว่าง โครโมโซมสองโครโมโซมหรือมากกว่า ซึ่งทั้งหมดนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม

การเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทพ์เป็นสิ่งบ่งชี้ว่าสิ่งมีชีวิตนั้นมีการหลายพันธุ์เกิดขึ้น ตัวอย่าง เช่ย การกลายพันธุ์ที่เกิดในพืช บางชนิดของการกลายพันธุ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปทรงของต้น เปลี่ยรแปลงในสีของดอก จำนวน และขนาดของผล อายุการเก็บเกี่ยวเร็วขึ้นหรือช้าลง ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้สามารถคัดเลือกนำมาใช้ประโยนช์ได้ง่าย แต่การกลายพันธุ์บาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทพ์เพียงเล็กน้อย ไม่ปรากฏให้เห็นชัดเจนต้องใช้วิธีการเฉพาะในการแยกพันธุ์กลาย และคัดเลือกนำพันธุ์กลายที่ต่องการมาใช้ประโยนช์ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงในลักษณะเชิงปริมาณเช่น องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของพืช ปริมาณโปรตีน ไขมันน้ำตาล ประสิทธิภาพในการปรุงอาหาร การเก็บสะสมอาหารของพืช ผลผลิต ฯลฯ การแยกพันธ์หลายออกมาจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ และวิธีการวิเคราะห์โดยเฉพาะ บางส่วนต้องอาศัยหลักสถิติเข้าช่วยในการวิเคราะห์ และต้องใช้จำนวนพืชหลายต้นในการตรวจสอบ

การกลายพันธุ์ของจีนอาจเป็นลักษณะด้อย คือ (จาก A เป็น a) หรืออาจเป็นลักษณะเด่น (จาก a เป็น A) หากเป็นการกลายพันธุ์ไม่แสดงออกในพืชต้นนั้นทันทีจะตรวจพบการหลายพันธุ์ในรุ่นต่อไป เมื่อนำพืชจากต้นนั้นไปปลูก การกลายพันธุ์เกิดขึ้นเพียงจีนเดียวในพืชที่เป็นโฮโมไซกัส (AA--aa) จีนเด่นยังคงข่มการแสดงออกของจีนด้อยได้ ในพืชที่ผสมตัวเองเมื่อมีการสร้างเมล็ดมีการแยกตัว และการรวมตัวของยีนเกิดขึ้นอย่างไม่เจาะจง ทำให้ได้ต้นพืชเป็นพันธุ์กลาย (aa) เกิดขึ้นในรุนต่อไป โอกาสของการเกิดการกลายพันธุ์ในส่วนคู่จีน (AA--aa) เกิดขึ้นพร้อม ๆ กันมีน้อยมาก หากเกิดขึ้นลักษณะด้อยจะแสดงออกในพืชต้นนั้นทันที ทำให้แยกพันธุ์กลายมาได้ สำหรับการกลายพันธุ์ของจีนด้อยเป็นจีนเด่น (a--A) มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมาก ถ้าเกิดขึ้นก็จะแสดงลักษณะทางฟีโนไทพ์ออกมาตามลักษณะที่จีนเด่นคุมอยู่

แนวทางการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับ
การฉายรังสี เพื่อการคัดเลือกลักษณะทนเค็มในถั่วเหลือง

เนื่องจากได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองมาปรับปรุง และพัฒนาจนสามารถทำให้เกิดต้นถั่วเหลืองได้เป็นจำนวนมาก เทคนิคดังกล่าวเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการโดยเฉพาะเจาะจงได้ เช่น การคัดเลือกลักษณะทนเค็ม ของนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองโดยผ่านกระบวนการโซมาติเอมบริโอเจเนซิส และวิธีการคัดเลือกลักษณะทนเค็มมาเป็นแนวทางเพื่อให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงประกอบด้วย

1. อาหารเพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ สูตร MS ไวตามินตามสูตร B_5 น้ำตาล 3 % วุ้น 0.75 % ใช้ 2,4-D เข้มข้น 40 mg/l เป็นอาหารสูตร MX_{40} เป็นอาหารกึ่งเหลวแข็ง
2. อาหารเพื่อเพิ่มจำนวนโซมาติกเอมบริโอ มี 2 สูตร MX_5 และ MF_5
3. อาหารเพื่อการคัดเลือก เช่นเดียวกัน แต่ใส่ NaCl ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
4. อาหารเพื่อการสุกแก่ของโซมาติกเอมบริโอ MS น้ำตาล 10 % ถ่านกัมมันต์ 0.5 % วุ้น 0.75 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหารเพื่อการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอเป็นต้นถั่วเหลือง สูตร SH น้ำตาล 1 % วุ้น 0.75 %

วิธีการ

นำฝักอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ที่ต้องการคัดเลือกลักษณะทนเค็มซึ่งเป็นฝักอ่อนอายุประมาณ 14 วัน หลังจากที่ได้รับการผสมพันธุ์ มาฉายรังสีปริมาณ 3-20 เกรย์ ภายหลังการฉายรังสี แกะเมล็ดออกจากฝัก เลือกเฉพาะเมล็ดที่มีขนาด 4-6 มิลลิเมตร ฟอกฆ่าเชื้อแล้วใช้สิ่วตัดเฉพาะใบเลี้ยงอ่อน นำมาเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดเอมบริโอ (MX_{40}) โดยให้ด้านโค้ง สัมผัสอาหารเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 25+-2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ช.ม.ต่อวัน

ภายใน 3-4 สัปดาห์ จะเกิดโซมาติกเอมบริโอ บนใบเลี้ยง ลักษณะเป็นโครงสร้างทรงกลม มีสีเหลืองอ่อน เกิดบริเวณของใบเลี้ยง หรือพื้นผิวใบเลี้ยง การเกิดโซมาติกเอมบริโอจะเกิดร่วมกับแคลลัส เป็นโครงสร้างเดี่ยว ๆ หรือเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนก็ได้โครงสร้างที่เหมาะสม คือ โครงสร้างที่เรียกว่า เทมบริโอเจนิกแคลลัส คือ การเกิดโซมาติกเอมบริโอซ้อน ๆ กัน อยู่บนโครงสร้างเดิม เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ย้ายเอมบริโอเจนิกแคลลัสลงเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MX_5 หรือ MS_5 เพื่อเพิ่มจำนวนโซมาติกเทมบริโอเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จึงย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อการคัดเลือกที่มี NaCl อยู่ด้วย การคัดเลือกทำได้ 2 วิธี

1. การคัดเลือกขั้นตอนเดียว ย้ายเอมบริโอแคลลัส ลงเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือ ความเข้มข้นสูงสุดตามต้องการเช่น ต้องการสร้างถั่วเหลืองที่สามารถทนเค็มได้ ถึง 2 % ก็เตรียมอาหารเพื่อการคัดเลือกที่มี เกลือ 2 %

2. การคัดเลือกหลายขั้นตอน การคัดเลือกจะทำตั้งแต่การใช้เกลือระดับต่ำ ค่อย ๆ เพิ่มจนถึงระดับสูงสุดที่ต้องการให้พืชสามารถทนได้โดยแต่ละขั้นตอนจะใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์

อาหารเพื่อการคัดเลือกเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยง เพียงเติมเกลือลงไป เอมบริโอเจนิกแคลลัส ที่คัดเลือกได้นำมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อโซมาติเอมบริโอเปลี่ยนเป็นสีขาว และมีขนาดใหญ่ขึ้นให้ย้ายลงเลี้ยงต่อในสูตร SH เพื่อการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอ

หลังจากเลี้ยง 1-2 สัปดาห์ โซมาติกเอมบริโอ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม มีขนาดใหญ่ขึ้น มีส่วนของไฮโปคอทิลยืดยาว เกิดส่วนของใบเลี้ยงยอดและรากชัดเจน ย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนกว่าจะได้ต้นสมบูรณ์ จึงย้ายลงเลี้ยงในกระถางที่มีเวอร์มิคูไลท์เลี้ยงอยู่ในห้องเพาะเลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์ ก่อนที่จะย้ายลงเลี้ยงในกระถางที่มีดินผสมนำออกมาเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการจนกว่าจะออกดอก ติดฝักต่อไป ต้นที่ได้ เรียกว่า ต้น M_1R_1 เรียกเมล็ดที่เก็บจากต้นนี้ว่าเมล็ด M_2R_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลูกต้น M_2R_2 แปลงหรือในกระบะเพาะชำที่มีดินเค็มในความเข้มข้นที่ต้องการคัดเลือก สายพันธุ์ใดที่ยังคงแสดงลักษณะทนเค็ม นำไปขยายและทดสอบในแปลงขนาดใหญ่ ที่มีสภาะดินเค็มต่อไป

ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (inland saline sail)

ดินมีเกลือละลายในน้ำมากเกินไป มีผลกับการเจริญของพืช วัดความเค็มเป็นค่า การนำไฟฟ้า EC หน่วน มิลลิโมห์ต่อเซนติเมตร หรือสังเกตุจากขุนหรือคราบเกลือบนผิวดิน อปก. เกลือในดินเค็ม เป็นพวกธาตุประจุ + Na Mg รวมกับธาตุประจุ - Cl SO_4 CO_3 NO_3 ทางภาคอีสานเป็น NaCl คล้ายกับดินเค็มชายฝั่ง แบ่งชั้นดินเค็มได้ 5 ชั้น จัด ปานกลาง เล็กน้อย ชั้นเกลือใต้ดิน ไม่เค็ม ตาราง ที่พบขลุยเกลือขึ้นมักเป็นที่ว่างเปล่าไม่การเกษตร หรือมีพืชที่ชอบเกลือขึ้นเช่น หนามแดง ความเค็มจะไม่สม่ำเสมอในพื้นที่เดียวกัน มีน้ำใต้ดินเค็มตื้น ๆ

การจำแนกพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ลักษณะพื้นที่	พื้นที่ ไร่	%
1.ดินเค็มจัด	209,592	0.21
2.ดินเค็มปานกลาง	1,323,779	1.35
3.ดินเค็มเล็กน้อย	4,002,432	4.07
4.ที่ลุ่มมีโอกาศรับผลกระทบจากความเค็ม	16,203,735	16.45
5. ที่ดอนซึ่งมีชั้นของเกลือใต้ดิน	18,708,688	19.02
6.พื้นที่ไม่เค็ม	46,557,700	47.32
7.พื้นทีเขา	10,417,147	10.59
8.ที่อยู่อาศัย	970,506	0.97
รวม	98,393,579	100

ไม่รวมพื้นที่จังหวัดเลย 7,625,000 ไร่

จังหวัด นครราชสีมามีดินเค็มมากที่ทุด ประมาณ 12 ล้านไร่ รองคือ อุดรธานี ขอนแก่น บุรีรัมย์

ที่มา Jermsawatlipongetal (1985)

หนังสือ การศึกษาและวิเคราะห์ปัญกาหลักด้านเทคโนโลยีของข้าวในประเทศไทย โดย บริบูรณ์ สมฤทธิ์ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ม.ค.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vajrabhaya และคณะ (1989) รายงานถึงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเหลืองประทิว เพื่อให้ทนเค็ม โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกเอาเฉพาะ embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารสูตร White ดัดแปลงที่เติม (NH4)2SO4 200 มิลลิตรกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้น เลี้ยงในที่มีแกง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 24 +- 3 องศาเซลเซียล ในการทดสอบความทนเค็มจะใช้แคลลัสที่มีอายุประมาณ 2-4 สัปดาห์ โดยนำไปเลี้ยงในอาหารที่มี NaCl 1 หรือ 2 เปอร์เซนต์ เป็นเวลส 4 สัปดาห์ แลหะเมื่อนำแคลลัสนั้นมาชักนำให้เกิดต้น พบว่าอัตราการเกิดเป็นต้นลดลง 0.08 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 8.3-3.0 เปอร์เซนต์ สำหรับการทดสอบต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กระทำโดยการนำต้นกล้าไปเลี้ยงในน้ำที่มี NaCl 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งผลการทดลองพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเหลืองประทิวในชั่วที่ 3 มีค่าสูงถึง 94.31 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 2 เปอร์เซนต์ และผลการทดลิงใน ชั่วที่ 4 คล้ายคลึงกับในชั่วที่ 3

Dayuan Wang , Paul D Miller และ Maro R. Sondant 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)

เซลล์แขวนลอยเตรียมได้จากเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 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 องศาเซลเซียส ในที่มืด จากนั้นเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 5-7 วัน

การแยกโปรโตพลาสต์จะใช้เซลล์แขวนลอยที่เปลี่ยนอาหารแล้ว 2-3 วัน ย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย Pectolyase Y-23 0.5 % , Cellulase RS 1.0% ,MES 5 มิลลิโมลาร์ และ $CaCl_2.2H_2O$ 7 มิลลิโมลาร์ ในอาหาร N_6 ที่มี กลูโคส 0.5 โมลาร์ pH 5.6 หลังจากบ่มไว้ 1 ชั่วโมง ผนังเซลล์จะถูกย่อยหมด ซึ่งตรวจสอบได้โดยการย้อมด้วย Calcoflour white M2R แล้วส่องดูด้วยแสงไปเพื่อให้โปรโตพลาสต์แตก แยกโปรโตพลาสต์โดยการกรองและล้างด้วยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์แขวนลอย ที่มีกลูโคส 0.5 โมลาร์ 3 ครั้ง นำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 2-5 *10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร N_6 ที่มี 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Zeatin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร Casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 0.5 โมลาร์ และ Agarose 0.3 % ในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และมีการเติมอาหารใหม่ทุก ๆ 7-10 วัน จนเกิดเป็นโคโลนีจากนั้นย้ายลงอาหารที่ชักนำให้สร้างแคลลัส คือ N_6 ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Zeatin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายแคลลัสลงอาหาร N_6 ที่มี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสแข็งขึ้น จากนั้นย้ายลงอาหาร N_6 ที่มี 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้ Embryogenic calli และชักนำให้เป็นต้นในอาหาร N_6 ที่มี Zeatin 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีปัจจัย 2 ประการที่มีผลต่อการสร้างเซลล์แขวนลอยคือ

1 ผลของฮอร์โมนซึ่งมี NAA, IBA ,BA และ 2,4-D พบว่าเฉพาะ 2,4-D เท่านั้นที่มีผลในอาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยง

2 การสร้างเซลล์แขวนลอยจะใช้ระยะเวลานาน 2-9 เดือน

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จะมีขนาด 10-20 ไมโครเมตร และการแยกจากเซลล์แขวนลอยที่มีอายุมากกว่า 7 วันจะแยกได้ยาก การแบ่งเซลล์เกิดหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 5 วันและคำนวณเป็นเปอร์เซนต์เมื่อเลี้ยงได้ 15 วัน ได้ผลคือ B_1 10% ,C_1 5% และ A_1 มากที่สุด 20 % และไม่มีการแยกใน C_3 และมีการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจน ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ในอาหาร โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหาร MS (NH_4^+ มาก NO_3^- ปานกลาง) กับ N_6 (NH_4 ต่ำ NO_3^- สูง) ซึ่งไม่แตกต่างกันและศึกษาสารออสโมติก โดยเปรียบเทียบระหว่าง sorbitol , mannitol และ glucose พบว่า glucose เหมาะที่สุด และการเกิดเป็นต้นใหม่ 6% ใน B_1 และ 1.2 % ใน C_1

Yanhai และคณะ ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของ Oryza sativa L. ซึ่งเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยเลี้ยง immature embryo ในอาหาร C_1 (modified MS) จากนั้นย้ายแคลลัสลงอาหารเหลว S_1 (modified AA) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อสร้างเซลล์แขวนลอย และศึกษาหาอาหารที่เหมาะสำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย โดยใช้อาหาร S_1-S_5 พบว่า AA เหมาะสำหรับข้าวสายพันธุ์ Japonica แต่ Indica อาหารที่เหมาะสมได้แก่ N_6, S_1 และ AA ซึ่งใช้ในการทดลอง แต่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จะไม่พัฒนา ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของเซลล์แขวนลอย ประสิทธิภาพในการแยกและการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ (S_1-S_5) ซึ่งสรุปได้ดังนี้

- KNO_3 ในอาหารจะเพิ่มความหนาแน่นของ cytoplasmic และทำให้เกิด clamp ขนาดใหญ่ ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้ยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- NH_4NO_3 ให้ผลตรงกันข้ามกับ KNO_3 โดยจะทำให้เซลล์แขวยลอยแตกกระจายเพิ่มขึ้น และทำให้ประสิทธิภาพปละความหนาแน่นของ cytoplasmic เพิ่มขึ้น แต่ NH_4^+ ที่สูงจะเป็นอันตรายต่อเซลล์

- สัดส่วนของ KNO_3/ NH_4NO_3 เป็นตัวจำกัดในด้านคุณภาพของเซลล์แขวนลอย ในการทดลอง อาหาร S_2 ที่ใช้ร่วมกับ S_1 เหมาะสมที่สุดสำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในการแยกโปรโตพลาสต์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จะใช้วิธีการที่มี 2 ขั้นตอน คือ

1 ใช้สารละลายเอนไซม์ 0.2 % PectolyaseY-23 , 0.5 mM MES , 1000 mg/l $CaCl_2$ H_2O, 100 mg/l KH_2PO_4 และ 10 % manntol pH 5.8 บ่มไว้ 4-5 ชั่วโมง

2 จากนั้นใช้สารละลายเอนไซม์ที่มี 3% Cellulose Onozuka RS ส่วนประกอบอื่นเหมือนสารละลายเอนไซม์แรกบ่มไว้ 12 ชั่วโมง

จากนั้นกรองด้วย nylon mesh จากนั้นนำไปเหวี่ยง 80g 5 นาที และล้างโปรโตพลาสต์ออกด้วย CPW ที่มี 1000 mg/l $CaCl_2.H_2O$, 100 mg/l KH_2PO_4, 0.5 mM MES และ manntol 10% pH 5.8 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยมี 3 วิธีคือ

1 นำโปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $5 * 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรฝังลงในอาหาร PM_1 (modified KM-8P)

2. จากวิธีที่ 1 ตัดเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนมาเลี้ยงในอาหารเหลว PM_2 1 ml

3 จากวิธีที่ 1 ตัดเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนมาเลี้ยงในอาหารเหลว PM_3 1 ml

ทั้งหมดเลี้ยงในที่มืด ที่ 26 องศาเซลเซียส จากอาหาร 3 ชนิดที่ใช้เลี้ยงเซลล์แขวนลอย S_1, S_2, S_3 ที่ประกอบด้วย ABA 0.5 mg/l พบว่า S_2 + ABA 0.5 mg/l มีผลกระทบต่อการเกิดแคลลัสมากที่สุด ตามมาด้วย S_2 และ S_1 น้อยที่สุด สรุปได้ว่า อาหารที่มีสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนดีกว่าอาหารที่มีอะมิโนแอซิดเป็นแหล่งไนโตรเจน และ 3 วิธี ที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์

วิธีที่ 1 แบ่งตัวประมาณ 0.8% แต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโคโลนีของเซลล์

วิธีที่ 2 มีการแบ่งตัวและมีการพัฒนาไปเป็นโคโลนีของเซลล์ แต่เกิดเป็น proto callus เท่านั้น 0.6%

วิธีที่ 3 มีการแบ่งตัว 4.3% และการเกิดเป็น protocallus เป็น 1.2 % ซึ่งดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีที่ 1 แคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร D_4 (N_6 modified)

วิธีที่ 2 เลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว D_1 และอาหารแข็ง D_2 จากนั้นย้ายลงอาหาร D_4

วิธีที่ 3 เลี้ยงแคลลัสในอาหาร D_3 จากนั้นย้ายลงอาหาร D_4

พบว่าการชักนำให้เกิดต้นโดยวิธีที่ 3 ให้ผลมากที่สุดคือ 14%

Zhang และคณะ ศึกษาข้าวแปลงพันธุ์โดยใส่พลาสมิด (plasmid) ไปเป็นโปรโตพลาสต์ โดยวิธี electroporation ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่ใช้จะแยกจากเซลล์แขวนลอย ซึ่งได้มาจากแคลลัสจากใบ จากนั้นนำไปทำ heat- shocked ที่ 45 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง 10 วินาที เพื่อใช้ในการ electroporation ส่วนพลาสมิดที่ใช้ได้จากการรวมกันของ 35S promotor ของ CaMV กับปลาย 5 ของ EcoRV ของ PABDI ซึ่งมี NPT II และ 19S promotor ซึ่งพลาสมิดขนาดใหญ่ที่ได้จะแยกจาก E. coli โดยวิธี alkali lysis และพลาสมิดที่ได้จะฆ่าเชื้อโดยใช้เอทานอลและละลายใน TE buffer. Electroporation จะใช้ 1 ml ของโปรโตพลาสต์ผสมกับ 20 ไมโครกรัมของ p CaMVNEO ใน 20 ไมโครลิตรของ TE buffer หลังจาก Eletroporation โปรโตพลาสต์บ่มในน้ำแข็ง 10 นาที และที่ อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส 20 นาที โปรโตพลาสต์ถูกเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว KPR ที่มี agarose 1.2% w/v บ่มที่มืดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียา ตัดอาหารที่มีโปรโตพลาสต์เป็น 4 ส่วน เมื่อเลี้ยงได้ 7 วัน เลี้ยงแต่ละส่วนในอาหารเหลว KPR เมื่อเลี้ยงได้ 14 วัน คัดเลือกโปรโตพลาสต์ที่ได้รับพลาสมิดโดยเลี้ยงในอาหาร KPR ที่มี 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ kanamycin เมื่อได้โคโลนีของเซลล์ที่ได้จากการคัดเลือกโดย kanmycin นำไปเลี้ยงในอาหาร N_6 ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีน้ำตาล 8% w/v และ agarose 0.4% w/v จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร N_6 ที่มี kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส 2-3 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายสู่ที่มีแสงและ plantlet ที่ได้ย้ายลงอาหาร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาวะเดียวกัน เพื่อให้เกิดรากและยอด จากนั้นจึงย้ายสู่กระถางและเลี้ยงในเรือนเพาะชำให้พัฒนาเป็นต้น พบว่าในอาหาร N_6 ที่มี kanamycin มี 2 plantlet เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นต้น ได้จากโคโลนีที่ต้านทาน kanamycin 400 โคโลนี แต่ถ้าย้ายโคโลนีที่ทนต่อ kanamycin ใน N_6 ที่ไม่มี kanamycin พบว่ามีการเจริญเป็นต้นได้ดีกว่า จากนั้นนำต้นที่ชักนำให้เกิดขึ้นและดคโลนีที่ทนต่อ kanamycin มาวิเคราะห์ว่ามี NPTII gene และมีการแสดงออกหรือไม่ ซึ่งพบว่าโคโลนีมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแสดงออกแต่ในต้นไม่มีการแสดงออก ทั้ง ๆ ที่มี NPTII gene และในต้นที่ไม่มีการใส่พลาสมิดไม่มีการยับยั้งกัจกรรมของ NPTII gene

Constance และคณะได้ศึกษาผลของ L- proline และ L- tryptophan ในการเกิด embyogenesis callus และเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นของข้าวโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ Oryza sativa L. cv Pusa 169 ซึ่งมีโปรตีนสูง (9.8%) และทนต่อโรคและแมลงปานกลาง เมล็ดจะทำการฆ่าเชื้อใน 2.5% Sodium hypochloride นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้อาหาร MS ที่มี 2,4-D 10 ไมโครโมล ซูโครส 2% และ agar 0.8% pH 5.8 หลังจากฆ่าเชื้อแล้วเติม L- proline ที่มีความเข้มข้น 3, 6, 9, 12, และ 15 mM และ L- tryptophan ที่มีความเข้มข้น 20, 40, 90, 240 และ 480 ไมโครโมล ซึ่งผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงในที่แสงน้อย อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส แล้วจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้ลงในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้นคือ MS ที่มี IAA 2.8 ไมโครโมล kinetin 23 ไมโครโมล และน้ำมะพร้าว 10% เก็บในที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง เปลี่ยนลงอาหารชนิดเดิมหลังจากนั้น 30 วัน และได้ผลว่า L-proline และ L-tryptophan ที่ใส่ลงในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้กลายเป็นต้นให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามการทดลองก็ได้ผลถึงปริมาณ L-proline และ L-tryptophan ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสคือ 12 และ 240 ไมโครโมล ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มจากอาหารที่ไม่มีการเติม L-proline และ L-tryptophan

Man-Si Wang, F.J. Zapata และ D.C. Castro ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจาก somatic embryogenesis ที่ได้จากเมล็ดแก่และดอกอ่อนของ *Oryza perennis* Moench ซึ่งเมล็ดและดอกผ่านการฆ่าเชื้อด้วย เอทานอล 70% 2-3 นาที จากนั้นแช่ใน mercuric chloride 10-15 นาที พร้อมทั้งคนไปด้วย สุดท้ายล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อ 5-6 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , BAP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3% และวุ้น 0.8% pH 5.8 บ่มที่ 26-27 องศาเซลเซียส ในที่มืด เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 อาทิตย์ ซึ่งผลการทดลองพบว่า ปริมาณแคลลัสที่ได้จากเมล็ด (44%) ต่ำกว่าจากดอกอ่อน (62%) และลักษณะของแคลลัสพบว่ามี 2 แบบ

1. Non-embryogenic callus มีลักษณะนุ่ม เป็น friable โปร่งแสงและมีสีเหลือง
2. Embryogenic callus มีลักษณะสีขาวเป็น compact เป็นกลุ่มก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชักนำให้เกิดต้นใช้ embryogenic callus น้ำหนัก 4-6 มิลลิกรัม เลี้ยงในอาหาร MS ที่มี IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 4 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrohysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 % และ Difco Bacto agar 0.8% ปรับ pH 5.8 บ่มภายใต้แสง 3000 lux. เมื่อเจริญเป็นต้นสูง 3-4 เซนติเมตร ย้ายสู่อาหาร MS และเมื่อสูง 10-15 เซนติเมตร ย้ายลงอาหารเหลว (Yoshida 1976) สำหรับพัฒนาระบบราก จากนั้นเลี้ยงในกระถางที่ควบคุมสภาวะตามต้องการ ความสามารถในการเจริญเป็นต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเมล็ดและดอกอ่อน แต่ในการใช้เมล็ดแก่สะดวกกว่า เพราะสามารถเก็บได้ง่าย และเก็บได้ทั้งปี และช่อดอกหนึ่งสามารถให้เมล็ด 100-200 เมล็ด

MS CHO และ F. J. ZAPATA ศึกษาการเกิดแคลลัสและการเกิดเป็นต้นใน Pollen ของข้าว (*Oryza sativa* L. cv TAIPEA 309) ข้าวที่ใช้คือสายพันธุ์ Tapea 309 (japonica) โดยช่อดอกจะเก็บที่ 8 องศาเซลเซียส จากนั้นฆ่าเชื้อโดยใช้ chlorox 20 % v/v 20 นาที แยก pollen เลี้ยงในอาหาร B_5 ดัดแปลง (E 10) 7 วัน จากนั้นย้ายลงอาหารเดิม แต่กวนให้ pollen grain ออกมากรองด้วย nylon sieve (100 ไมโครเมตร) นำของเหลวไปเหวี่ยงที่ 100 g 5 นาที ล้าง pollen ด้วยอาหารสูตรเดิม 2 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในอาหาร 4 ชนิด โดยมีความหนาแน่น $4*10^3$ grain/ml ดังนี้

1. E10 (B_5 ดัดแปลง)
2. E10 + alanine 1 mM (E10A)
3. E10 + glutamine 1mM (E10G)
4. E10 + proline 1mM (E10P)

เลี้ยงในที่มืด 27 องศาเซลเซียส ให้เกิดแคลลัสซึ่ง pollen ที่แยกได้มี 2 ชนิด

1. ขนาดใหญ่ ไม่มีแป้ง ขนาด 50-58 ไมโครเมตร มีผนังบาง มีสีชมพูสว่าง และไม่ทนต่อ acetocarmine

2. ขนาดเล็ก ขนาด 40 ไมโครเมตร มีผนังเซลล์หนา และพบมากกว่าขนาดใหญ่

ในการศึกษาใช้ขนาดใหญ่เนื่องจากดูดซับอาหารดีกว่า หลังจากเลี้ยงได้ 3 วันจะแบ่งเซลล์และ 10 วัน จะได้ pollen ที่มีหลายๆเซลล์ และผลของอาหาร E10 P และ E10 G มีการแบ่งตัวสูงกว่าอาหารชนิดอื่นๆ คือ 3.9% และ 3.0% ตามลำดับ และ E10 P ให้แคลลัสสูงที่สุดในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดต้นโดยย้ายแคลลัสลงอาหารเหลว MS ที่มี kinetin 1 mg/l ,NAA 1 mg/l , ABA 20 mg/l ในที่มีแสง 1000 lux. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 4 อาทิตย์ย้ายไปยังอาหารกึ่งแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กึ่งเหลว MS ที่มี kinetin 1 mg/l NAA 1 mg/l ในที่มีแสงตลอด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงอาหารเหลว Yoshida (พัฒนาระบบราก) ที่สภาพธรรมชาติ จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางในเรือนเพาะชำพบว่า

- แคลลัสขนาดเล็กกว่า 1 mm จะมีสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด
- การเกิดเป็นต้นจะเกิดเมื่อใช้อาหาร MSYo และเกิดมากในอาหาร E10 P และ E10 G
- อัตราส่วนของต้นเขียว : ต้นเผือก ใน E10 P และ E10 G น้อย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประภา ในการศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรย์และปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการชักนำให้คัพภะข้าวหอม พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้น พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มล./ล. ร่วมกับ casine hydrolysate 300 มล./ล. ในสภาพที่มีแสงสามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูง 96.3 % และแคลลัสมีขราดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด 9.4 มม. แคลลัสเมื่อถูกทำให้แห้งโดยพักไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วัน จึงย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรชำนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าย้ายลงโดยไม่ทำแห้งก่อน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นมี 2 สูตร คือ MS IAA 1: BA 4 ซึ่งสามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดสูงสุด 45.8 % และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลบี่ย 7.9 ยอด และสูตร MS IAA 1 : BA 4 และ yeast extract 1 g/l ซึ่งสามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด 45.5 % และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.7 ยอด

เผดิม การทดลองเพื่อหาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว 6 พันธุ์พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในสภาพที่ได้รับแสงจะดีกว่าในสภาพมือ สูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าพันขาวดอดมะลิ 105,บาสมาติ 370,กข.15 ได้แก่ MS NAA5:Kin1 ส่วนพันธุ์ นางมล S4 และประดู่แดง ได้แก่ MS NAA4:Kin1 และพันธุ์ปทุมธานี 60 คือ MS NAA5:Kin 0.5 อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เป็นต้นอ่อนสำหรับพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และ นางมล S4 ได้แก่ MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ พันธุ์ปทุมธานี 60 ใช้ MS Kin1 ในขนะที่พันธุ์ กข.15 ใช้ MS Kin 2 ส่วนบาสมาติ 370 และประดู่แดง ใช้ MS Kin 3

P.Sathish การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของข้าว โดยชักนำให้เกิดแคลลัสและทำให้เกิดแปรผันด้านพันธุกรรมของ androclonal ในต้นของรุ่นลูกหลาน อับละอองเรณูของข้าว japonica สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้มากกว่า indica หรือ indica*japonica ในการเพิ่มความสามารถการเกิดเป็นแคลลัสสามารถทำได้โดยใช้ความกดดันแบบอ่อนๆ ซึ่งทำได้โดยการลดความชื้นลงอย่างช้าๆ หรือการทำ neat shock ก่อนที่จะนำอับละอองเรณูไปเพาะเลี้ยงการลดความชื้นลงอย่างช้าๆ จะช่วยให้อับละอองเรณูของ japonica สามารถเกิดเป็นแคลลัสในอาหารที่มีเกลือได้มากขึ้น ซึ่งความสามารถในการเกิดเป็นแคลลัสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือในอาหารเพิ่มขึ้น ในต้นข้าวที่เจริญเป็นต้นขึ้นมาจะเป็นต้นเผือก (albino) 2.5 % และจะเป็นต้น haploid 2 % สามารถสังเกตการแปรผันทางพันธุ์กรรมของ androclonal ได้จากจำนวนการแตกหน่อ,ความสูงของปลายยอด,น้ำหนังแห้ง และการออกดอกของต้นข้าวในรุ่นลูกหลาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R.K. Jain การดำเนินการเพื่อเพิ่มการเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสตร์ข้าวพันธุ์ indica,japonica การเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์จากโปรโตพลาสตร์ของข้าว indica พันธุ์ Pusa Basmatic I และ Jaya ทำโดยเลี้ยงโปรโตพลาสตร์บน filter membrame มีการใช้ Lolium multiflorum และ Oriyza ridleyi เป็น feeder cells (nurse cell) embryogenic cell suspention ของ Pusa Basmatic และ jaya เตรียมจากการใช้เมล็ดแก่ซึ่งให้ calli ในอาหารเหลว R2 ที่มีการเติม proline 560 mg/l และ maltose 1% (w/v) ในทั้งสองสายพันธุ์ให้ประสิทธิภาพสูงขึ้น 0.4 % เมื่อใช้ feeder cell เมื่อ *L.multiflorum* เป็น feeder cell จะให้ผลดีกว่าใช้ Oryza แต่การใช้ร่วมกันทั้ง 2 ชนิดจะส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น colonies ที่เกิดจาก Protoplast จะเกิดขึ้นเฉพาะที่มี feeder cell ด้วยเท่านั้น พบว่าในการเลี้ยง protoplast ด้วย feeder cell ในอาหาร MS เติม Kinetin 2.0 mg/l และ 2 naplithaleneacetic acid 0.5 mg/l และ sucrose,maltose อย่างละ 1.5 % (w/v) เพื่อชักนำให้เกิดยอดสีเขียว (green spot) ใน 44 % ของ protoplast derived tissues ในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่า เมื่อให้ *O.ridily* เป็น feeder cell เนื้อเยื่อจะมี morplogenic มากกว่าการใช้ *L.multiflorum* อย่างเดียวหรือการใช้ร่วมกัน ในข้าว japonica พันธุ์ Taipei 309 พบว่า วิธีนี้ให้ผลการ regenerate สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีแบบเดิม

Ann Moons ข้าว Indica พันธุ์ Pakkali และ Nona Bokra ที่รู้จักกรดีว่าทนเค็มในการคัดเลือกผสมพันธุ์มาในความพยายามเข้าใจระดับโมเลกุลพื้นฐานของความทนเค็ม (tolerance),กายะภาพ (physiological) และ ศึกษาการแสดงของยีนในระยะเริ่มต้น ผลของ abscisic acid (ABA) กับ โปรตีนรวมในรากจากต้นกล้าอายุ 12 วัน ของ Pakkali ,Nona Bokra และพันธุ์ว่องไวต่อเกลือ พันธุ์ Taichung N1 วิเคราะห์ โดย two-dimensional gels ความอุดมสมบูรณ์ของ ABA โปรตีนช้านำมีสูงมากสุดในพันธุ์ทนเกลือที่สุด Pokkali ทั้ง 3 พันธุ์ตอบสนอง ABA protein , รายงานระดับความแตกต่าง ในรากจากพันธุ์ทนเกลือและว่องไวต่อเกลือ,เสริมคุลักษณะโดยวิเคราะห์ amino acid แต่เพียงบางส่วน แบบใหม่ histidine-rich protein และ2 ชนิดของอัตรา embryogenesis (LEA) โปรตีน ในการพิสูจน์ โปรตีนภูมิคุ้มกัน แสดงว่า ระดับ dehydrins และ 3 กลุ่ม โปรตีน 3 LEA ซึ่งสำคัญสูงกว่าในรากจากกรเปรียบเทียบ ทนเกลือด้วย พันธุ์ว่องไวเกลือ ระดับ endrogenous ABA แสดงชั่วคราว ๆ เพิ่มในราก แสดงถึง osmotic shock (150 mM NaCl) peak ความเข้มข้น ABA สูงกว่า 30 เท่า จาก Nona Bokra และสูงกว่า 6 เท่า Pokkali เปรียงเทียบด้วย Taichung N1 ทั้งคู่ชักนำเกลือระดับ endogenous ABA และ โมเลกุลใหญ่กว่า ตอบสนองของเนื้อเยื่อรากที่ ABA จะมีผลกับพวกต่าง ๆด้วยความแตกต่างของพันธุ์ทนเค็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hiroyuki Fukuoka จัดจำแนก DNA ของ callus จำเพาะ ในข้าว แยกโดย ในเจลสังเคราะห์ใหม่ วิธีดำเนินการ Southern hybridization การทดลอง แสดงผลว่า บางโคโลนีขยายใหญ่ใน callus แรกเริ่มแรก ชักนำจาก srutellum tissue การขยายเติบโตของ โคโลนีเหล่านี้สังเกตุภายใน 2 วัน หลังการเพาะเมล็ดชักนำให้เป็น callus ในอาหารประกอบด้วย 2,4-D, NAA ไม่มีความสำคัญต่อผลเหตุการณ์ DNA ขยายเติบโต (amplification) กระบวนการ from colony จากการแยก protoplast และการบวนการ regenerate เป็นต้นจาก callus แสดงถึง การจำเพาะโคโลนีและ ความจำเพาะกระบวนการ ความขึ้นลงแบบฉบับของ copy number การวิเคราะห์ระดับของโคโลนี เสนอแนะว่า ส่วนมากของโคโลนีกำเนิดจาก organelle DNA การเปรียบเทียบของ copy number แบบขึ้นๆลงๆ ของ organell การกระทำ gene ด้วย เสนอโคโลนีมีหลายชนิดและ/ หรือ ความจำเพาะการสร้างการขยายเติบโตของ organelle DNA

Yuichi Takeuchi ตัดส่วนใบเลี้ยง (Colyledon) จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในที่มืดของ แตงกว่า (Cucumber) (*Cucumis Sativus L.*) เพาะเลี้ยงในขวด (vitro) ภายใต้การฉายรังสี UV ที่ความแตกต่างความยาวคลื่น, ได้รับโดย การฉายผ่านแผ่นกรองแสง (filter) ด้วยความแตกต่าง คุณสมบัติการส่งผ่าน การเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ของ chlorophyll(chl) ในใบเลี้ยงเป็นการยับยั้ง (inhibite) และ malondialdehyde ซึ่งการสะสมขึ้นอยู่กับรังสีที่ความยาวคลื่นต่ำส่วนล่าง 320 nm อนุภาคอิสระผันกลับชักนำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตโดย UV-B การวัดด้วย fluoresence ของ Chl เสนอว่าการขนย้ายอิเล็กตรอนในระบบสังเคราะห์แสง เป็นผลโดยรังสี UV-B บนพื้นฐานของผลเหล่านี้เป็นสมบัติอยู่ร่วมกันของการเร่งจำเพาะของออกซิเจนในความเสียหายที่ thylakoid membranes และการยับยั้งการเจริญที่ชักนำโดยรังสี UV-B

S.Sabbah เกลือดัดแปลงให้เหมาะสม และ เซลล์ควบคุมของการเพาะเลี้ยงมันฝรั่ง (potato) *(salanum tuberosum)* สายพันธุ์ Russet Burband แล้ว Untred หรือ treat ด้วย 5-azacytidine (ตัวยับยั้งของ DNA methylation) เปรียบเทียบด้วยความเกี่ยวข้องที่

a. % ของ cytosine methylation ใน totol nuclear DNA,แสดงผลโดย HPLC

b. น้ำหนังสดและแห้ง ดัดแปลงและควบคุมเซลล์เปรียบเทียบอีกด้วย ความเกี่ยวข้องที่ %ของ cytosine methylation ใน DNA, ซึ่งทำบริสุทธุ์จาก DNase I ย่อย chromatin เพียงส่วนเดียวและขนาดเศษส่วนโดย electrophoresis ใน agarose gel การเจริญเติบโต (การทำย้ำด้วย น้ำหนังแห้ง) ของเซลล์ NaCl ดัดแปลง ในอาหารที่มีเกลือปน (saline) ที่ขาด 5-azacytidine และทำคล้ายกันกับเซลล์ควบคุมในอาหารมาตราฐาน การดัดแปลงของเซลล์ทำให้เกี่ยวพันกันด้วยบางการเพิ่ม (+16%) ของ methylation ใน total DNA และด้วย การเพิ่มที่สำคัญมากกว่าเศษส่วน DNA น้ำหนังโมเลกุลต่ำๆ ซึ่งได้รับจากน่าเป็นไปได้มากกว่า active chromatin หวังไว้การเลี้ยง

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ cell ด้วยยับยั้ง methylation ชักนำลดน้อยลงในระดับของ metylation การลดลงของ methylation อย่างไรก็ตาม,ความสำคัญมากในเซลล์ดัดแปลง,น้ำหนักแห้งของใคร,ผิดกันกับในตวควบคุม ไม่มีผลโดยการเลี้ยงนี้

Clyde Wilson Plasma membrane และ tonoplast vesiceles แยกจากรากพันธุ์ทั้งคู่พันธุ์มะเขือเทศ glcophytic,*Lycopersicon cheesmanii* และพันธุ์ holophytic พื้นเมืองที่เกี่ยวข้อง *lycopersicon cheesmanii* เจริญภายใต้การควบคุมและสภาพมีเกลือปน การขนย้าย MgATP วัดโดยการแสดงผลอัตราระดับของ quinacrine fluorescence อัตราของระงับและ hydrolysis ATP สูงสำหรับทั้งสองพันธุ์ PM และ TV จากทั้งสอง specie เมื่อเติบโตภายใต้สภาพมีเกลือปนเมื่อ ATPase ทำงานวัดระดับของการกระตุ้นของ ATPhydrolysis ในการอยู่ที่นั้นของ KCl,Nacl และ Choline Chloride คล้ายคลึงกันสำหรับ plasma membrane จากควบคุมและการเลี้ยงปนเกลืออย่างไรก็ตาม NaCl ให้อัตราต่ำของการขันย้ายโปรตอน KCl หรือ Choline Chloride สำหรับ Plasma membrane ของทั้งสองพันธุ์ เจริญภายใต้มีเกลือปน นี้อาจจะแปลความหมายดังหลักฐานของ Na^+/H^+ antiport PH gradint (ชั้นในกรด) เป็น from ใน vesicel โดยการเพิ่ม MgATP หลังจากการตั้งของ proton gradient ผลของ cation บน proton เป็นผลประมาณโดยการเพิ่ม EDTA ที่ chelate Mg^{2+} อัตราค้นพบ fluoresene ใช้การแสดงของอัตรา proton efflux การเพิ่มของ Na^+ ค้นหา fluoresence เปรียบเทียบที่ K^+ ใน plasma membrane จากทั้งสองชนิดโดยในสภาพมีเกลือ การเพิ่ม K^+ และ valinomycin ที่ อาหารตรวจสอบไม่มีผลแลกเปลี่ยน Na^+/H^+ การเพิ่มของ amiloride ไม่เป็นหลักฐานพบสำหรับ Na^+/H^+ antiport mechanism ใน tonoplast ของไม่พันธุ์ใดก็พันธุ์หนึ่งของสภาพเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของข้าว Indica จนแพร่นธุ์ได้ จาก Protoplast ที่แยกจากเนื้อเยื่อ Scutellar ของ Immature Embryos

บทนำ

โปรโตพลาสตร์ คือ เซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ ใช้ปรับปรุงพันธุ์ได้ โดยวิธี Somatic hybridization และ ใส่ DNA โดยตรงเข้าเซลล์ สามารถแยกจากส่วนต่างๆของพืช เช่น เซลล์ mesophyll ที่ใบและอื่นๆ ข้าว *Oryza Sativa L.* มีการศึกษามากในพันธุ์ Japanica และ Intica โดยแยกจาก embryogenic cell suspention ซึ่งจะเลี้ยงให้เจริญได้ง่ายกว่าใช้ส่วนอื่นๆของพืชมาแยก การทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อ Scutella (ใบเลี้ยงพืชใบเลี้ยงเดียว) ของ Immature Embryo ในการแยกโพรโตพลาสตร์และเลี้ยงจนได้ต้นพืชสมบูรณ์แพร่พันธุ์ได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการแยกโปรโตพลาสตร์ของข้าวและเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นได้โดยเลือกใช้เซลล์จากชิ้นส่วนพืชที่น่าจะแยกได้โปรโตพลาสตร์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เจริญกลับมาเป็นต้นได้ ในการทดลองนี้ชิ้นส่วนพืชที่คาดว่าจะทำได้คือ เนื้อเยื่อ Scutella ของ Immature Embryos

ทฤษฎีโดยย่อ

การสกัดโปรโตพลาสตร์ คำนึงถึง การทำลายผนังเซลล์ต้องไม่ทำอันตรายกับโปรโตพลาสตร์ และรักษาแรงดันออสโมซิส ไม่ให้เซลล์แตกหรือเหี่ยว นิยมใช้สารละลาย CMP ที่มี mannital มีวิธีการแยก 2 วิธี คือ วิธีกล และ ใช้เอนไซม์

การทำให้โปรโตพลาสตร์บริสุทธ์ โดยการกรอง และ ปั่นแยกด้วย centrifuge หรือจะปั่นแล้วทิ้งไว้ให้โปรโตพลาสตร์ลอยตัวแทนการกรอง สำหรับชนิดที่อ่อนแอ

การเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ ขึ้นกับ

- อาหารเลี้ยง
- ออสโมติคัม
- ความหนาแน่นของโปรโตพลาสตร์ที่เพาะเลี้ยง
- วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ เช่น nurse cell
- สภาพการเก็บรักษา

อื่นๆ ดูในทฤษฎีละเอียด

วิธีการทดลอง

1. **plant material**

- เม็ดข้าว Intica (*Oryza Sativa L*) พันธุ์ CV IR43 และ Basmatic 370 เอามาจาก International Rice Institue Philipines ปลูกในเรือนกระจก 29 c 12h กลางวัน และ 21c กลางคืน เพื่อเอารวงข้าวอ่อนๆมาเพาะ
- cell suspention line -OC- ได้จาก Dr K. Syono มหาลัย Tokyo ใช้ทำ Nurse culture เลี้ยงใน อาหารเหลว MS เสริมด้วย 1.0 mg/l 2,4-D และ 30 g/l sucrose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียม Immature embryo

- ฟอกฆ่าเชื้อ นำรวงข้าว 10 -15 วันหลังผสมเกสร แช่ 70 % (v/v) ethanol 1 นาที แล้ว ฆ่าเชื้อ 25 นาที ใน 50% (v/v) Chlorox ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง คัดเม็ดที่ดีๆออกมา พวกขาวขีด เม็ดรีบไม่ใช้

- ทำ Preculture เพื่อขยายเนื้อเยื่อ Scutellar ในอาหาร MS,AA,N6 เสริม 1.0 mg/l 2,4-D, 30 g/l maltose และ 5 g/l agarose type-1 PH 5-8 3 วัน จะงอกหน่อ ตัดและขยาย เนื้อเยื่อไปเรื่อยๆ

3. แยก โปรโตพลาสตร์

- ตัดเนื้อเยื่อ Scutellar 50 ชิ้นเป็นแผ่นบางๆ เล็กๆใส่ใน CPW solt solution ปกต. 150 g/l mannitol (CPW 15 M) 1 ชั่วโมง เกิด Preplasmolysis คือการปรับสภาพเซลล์ก่อนย่อยผนังเซลล์

- แทนที่ด้วย 10 ml สลล. enzyme ปกต. 2.0 % (w/v) cellulase RS , 0.2 (w/v) pectolylase Y-23 , 5 mM MES (2(N-morpholine) ethane Sulfonic acid) ใน CMP solt 130 g/l mannitol (CPW 13M) PH 5.6 ทำใน Sterilin plastic petridish 50 mm บ่มได้ตามเวลาในที่มืดไม่เขย่า ที่ 27c 4-5 h

- ผ่านตะแกรงร่อน 50 และ 25 um ให้มีการสะสมตะกอนที่ 100 g/ 5 นาที

- ล้าง 3 ครั้ง Resuspention-sediumtation ใน CPW 13 M โดยการ centrifuge

- ตรวจเซลล์ที่ย่อยแล้วด้วยสี Calcofluor white ย้อมติด ผนังเซลล์ ถ้าย่อยผนังเซลล์แล้วก็ไม่ติดสีขาว

4. การเลี้ยง โปรโตพลาสตร์ และการเจริญเป็นต้น

- เลี้ยงด้วยวิธี bead type ใช้ nurse cell คือการนำ protoplast ฝังในชั้นวุ้นอาหาร แล้วนำไปแช่ในสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cell) ให้กับ protoplast ซึ่ง เซลล์พี่เลี้ยงนี้จะไม่ morphogenic คือการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไม่ให้เจริญเด่นมากกว่า protoplast

- นำ purified scutellum-protoplast เลี้ยงใน อาหารแข็ง N6,MS,R2 เสริม 1.0 mg/l 2,4-D , 144 g/l maltose และ 8 g/l seaplaque agarose (มีคุณสมบัติดีกว่าวุ้นธรรมดา จุดแข็งตัวต่ำ ที่ 32 c protoplast ที่ผสมลงไปก็ไม่ตาย และ มีรูพรุนมากๆเล็กๆ สารอาหารเข้าไปถึง protoplast ได้ง่าย) ที่ PH 8

- วิธี คือ ปิเปตก้อนหลมโปรโตพลาสตร์ เบาๆ 0.5 ml (10^6 protoplast/ml) ลงตรงกลางของอาหารใน plate (60*15 mm) เขย่าให้รวมกันจะแข็งอย่างรวดเร็ว

- นำแผ่นแข็งใส่ใน สลล. เซลล์ ให้ได้ 6 ml แผ่นแข็ง ต่อ 100 ml สลล. OC nurse cell ล้อมอยู่ (ความเข้มข้นเซลล์ของพี่เลี้ยงต้องมากๆ แต่ความเข้มข้น protoplast ในแผ่นวุ้นน้อยกว่ามาก) บ่มในที่มืดไม่เขย่า 25c เปลี่ยนอาหารใหม่ครึ่งหนึ่งทุก 7 วัน จนจบระยะ nurse protoplast จะแข็งแรงขึ้นและเริ่มเห็นการเจริญเติบโต

- นำแผ่น agarose มาล้างด้วยอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง

- วางบนอาหารสดใหม่ 1.5-2.0 ml 2-3 สัปดาห์

- ความถี่การเกิด โคโลนี เกิด proliferation คือการแบ่งตัวขยายตัว เป็น microcalli หลังจากชุบ 4-5 สัปดาห์ ตัวอย่างการพัฒนา

- ตัดชิ้นส่วน agarose เป็น ส่วนๆ และใสในอาหารสด N6 ไม่ ต้องรักษาความดัน เสริม 30 g/l , maltose , 2.0 mg/l 2,4-D,5.0 g/l agarose ทำ subculture ใหม่ทุก 2 สัปดาห์ จนได้ nodular ,calli ผิวเรียบ

- ย้ายลงอาหารเจริญเพื่อให้ได้ plantlet คืออาหาร R2/MS เสริม 30 g/l maltose , 3.0 g/l agarose , 3.0 mg/l kinetin และ 1 mg/l NAA ใน plastic plate 50 mm 3-4 calli ต่อ plate ปกต. 10 mg ของอาหารเจริญ เก็บไว้ใต้แสง fluorescence 40 uE $^{-2}$ s^{-1} 16-18 h มีแสง 21c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ย้ายลง MS ไม่มีออร์โมน เสริม 15 g/l sucrose 2 g/l gelrite ในขวดอาหาร 68*110 บรรจุ 20 ml ปล่อยรากพัฒนา แล้วลงสารละลายเลี้ยง 2-3 สัปดาห์ก่อนลงดิน ปลูกในเรือนกระจกจนเจริญเต็มที่

ผลการทดลอง

1.ผลผลิต protoplast

- เป็นไปได้ยากที่จะได้จำนวน protoplast เทากับจำนวน cell ที่นำมาแยก รวมถึงจำนวน protoplast ที่เลี้ยงรอดด้วย
- ขึ้นกับ วิธีขยายเนื้อเยื่อ Scutellar และการ treatment enzyme
- ชนิดอาหารในการ preculture ไม่มีผลจึงใช้ MS เป็นมาตราฐาน
- preculture 3 วัน ของ embryo
- treat enzyme 4-5 h 27c ความเข้มข้น RS 4% Y-23 0.4 % ให้ผลผลิตมากที่สุด ได้ $3.5*10^5$ protoplast สำหรับ พันธุ์ 370 ,$2.8*10^5$ protoplast สำหรับพันธุ์ IR43
- protoplast เป็นทรงกลม ปกค. cytoplasm แน่นทึบ
- จะเหลือเศษเซลล์เล็กๆและตะกอนเซลล์อยู่มาก จากการตรวจการสีย้อม

2. เพาะเลี้ยง protoplast

- เลี้ยงด้วย 0.4 M maltose ช่วยรักษาความดันดีกว่า น้ำตาลชนิดอื่นๆ
- 3-5 วัน protoplast แบ่งตัว รูปที่ 3 และ 12 วันเกิด colonie
- colonie ที่ได้มี 2 แบบ
  1. compact cullus ปกค. cytoplasmic จะ form macroscopically มักได้จาก B370
  2. coloni ปกค. ที่ว่างเปล่า เซลล์ยาว จะไม่เจริญมักได้จาก IR43

- 3 สูตรอาหารพื้นฐาน N6 ให้ colonei มากสุด อาจเป็นผลจาก Nitrogen source ซึ่งใช้แบ่งเซลล์และส่งเสริมการเจริญ ดังตารางที่ 1 ความถี่การเกิด โคโรนี จาก โปรโตพลาสตรในอาหารต่างๆ

Cnotype	Cuture medium	No. of colonies at 4 week
Basmatic 370	R2	98
	N6	146
	MS	66
IR43	R2	22
	N6	39
	MS	18

- 4-5 สัปดาห์ ใส่ N6 ที่ยกระดับ 2,4 D จะทำให้ compact ได้ nodular ผิวเรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.เจริญเป็นต้นและแพร่พันธุ์

- ย้ายลง R2 จะได้จุดเขียวภายใน 1 สัปดาห์ หน่อยาว 10 mm ภายใน 3 สัปดาห์
- ได้หลายหน่อต่อ callus แต่สังเกตุว่าเพียง 1 หน่อที่จะเจริญเป็นต้น
- R2 ทำให้เจริญ กว่า MS R2 มี maltose สูงจึงได้ carbohdrate ทำให้เกิดหน่อ

ดังตารางที่ 2 ความถี่การเจริญเป็นต้นจาก protoplast

Genotype	Regeneration medium	No.of selected calli plant	No.of calli regenerating shoot
Basmatic	R2	40	24(60%)
	MS	40	13(32%)
IR43	R2	10	5(50%)
	MS	10	2(20%)

Regeneration medium contained 30 g/l maltose , 3 mg/l kinetin and 1 mg/l NAA

- ความถี่การเกิดต้น 60% B370 ,50 % IR43
- ได้ plantlet ราว 5 cm ย้ายลง MS 2 สัปดาห์ รากแข็งแรง
- ย้ายลงดินปลูกในเรือนกระจก รอดชีวิตทั้งหมดและเจริญจนแพร่พันธุ์ได้เมล็ด

สรุปผลและวิจารณ์

1. จำนวนโคโรนีที่ได้รับต่ำมากเมื่อเทียบกับจำนวนโปรโตพลาสตร์ที่แยกได้มากมายจึงต้องทำการทดลองหาวิธีปรับปรุงต่อไป เพื่อให้ได้ต้นไม้จำนวนมาก ๆคุ้มกับการลงทุนแยกโปรโตพลาสตร์

2. การเลือกชนิดอาหารเลี้ยง โปรโตพลาสตร์ ที่เหมาะสมทำให้เจริญได้ รวมถึงการยกระดับ 2,4 D จาก 1 mg/l เป็น 2mg/l ก็มีส่วนเพิ่มการเจริญ

3. การเลือกชนิดเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม ที่ทนต่อการแยกย่อยได้ และเลี้ยงให้เจริญง่าย สร้างผนังเซลล์ แบ่งเซลล์ เจริญเป็น callus และ ต้นพืชได้ เนื้อเยื่อทุกส่วนสามารถแยกได้แต่มักจะเลี้ยงให้เจริญได้ยากมาก มีบางส่วนที่ทำได้บ้าง เนื้อเยื่อ Scutella ก็เป็นชนิดหนึ่งที่ทำได้ในการทดลองนี้ อาจเนื่องจากใบเลี้ยงเป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัชรี,วิมลมาศ และ แสงทอง เมื่อนำเซลล์แขวนลอยข้าวหอมมะลิ 105 และ บาสมาติ 370 ที่เจริญอย่างเร็ว ทำการแยกโปรโตพลาสต์ โดยศึกษาหาความเข้มข้นของแมนนิทอลและอัตราส่วนของความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์มาเซอร์โรไซม์ที่เหมาะสม พบว่า บาสมาติ 370 ที่ความเข้มข้นแมนนิทอล 0.35 โมลาร์ อัตราส่วนความเข้มข้นเทนไซม์ 3:1 ที่เวลา 4 ชั่วโมง และหอมมะลิ 105 แมนนิทอลเหมาะสม 0.35 โมลาร์ เอนไซม์ 1:0.5 ที่ 4 ชั่วโมง เมื่อนำโปรโตพลาสต์ทั้งสองสายพันธุ์ที่แยกได้เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KM-8P,MS,N_6 และภายหลังจากเลี้ยงไป 3 สัปดาห์ยังพบว่ามีการแบ่งเซลล์อยู่ และมีชีวิต

พรรณี นำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ไปอาบรังสีแกมมาในอัตราต่าง ๆ กัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เป็นต้น พบว่าแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการเปลี่ยนอาหารสามารถเจริญไปเป็นต้นได้ดีกว่าแคลลัสผ่ารการเปลี่ยนอาหาร ต้นใหม่ที่ได้จากแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการเปลี่ยนอาหารนำออกปลูกในธรรมชาติและทำการศึกษาลักษณะต่าง ๆ 9 ลักษณะ พบว่าต้นชั่ว M1R1 ที่ผ่านการอาบรังสีกับที่ไม่ได้อาบรังสีมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันน้อย ในลักษณะอายุวันออกดอก ความยาวรวง น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ขนาดเมล็ด การร่วงของเมล็ดและลักษณะใบธง แต่แตกต่างกันมากในลักษณะความสูง จำนวนต้นที่ออกรวงต่อกอ และเปอร์เซนต์เมล็ดดี และพบว่าความแตกต่างระหว่างต้นภายในแต่ละกลุ่มที่ได้รับการอาบรังสีจะมากกว่าความแตกต่างระหว่างต้นภายในกลุ่มที่ไม่ได้รับการอาบรังสีส่วนความแตกต่างระหว่างต้นภายในกลุ่มของลูกชั่ว M2R2 ที่ได้รับการคัดเลือกจะแตกต่างกันน้อยกว่าในชั่ว M1R1

ชาญวิทย์ การเพาะเลี้ยงม้วนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ Q83 บนอาหารสูตร MS 2,4-D 3 mg/l เคซินไฮโดไลเซท 400 mg/l น้ำมะพร้าว 10 % และเกลือ NaCl 0,0.5,1,1.5,2,2.5 และ 3 % พบว่าม้วนใบอ่อนสามารถเจริญเป็นแคลลัสบนอาหารที่มีเกลือ 0-1.5 % แต่แคลลัสที่ได้ไม่มีเกลือและ 0.5 % เท่านั้นที่มีชีวิตและเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนเมื่อเลี้ยง MS NAA 1 mg/l :Kin 1 mg/l (ชักนำเป็นต้น) ที่มีเกลือ 0 ,0.5, 1 % การเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ผ่านการอาบรังสีแกมมา 0,1,2,3,4,5 และ 6 กิโลแรด บนอาหารที่มี NaCl 0-3 % พบว่าอาบรังสี 1 กิโลแรด เพาะเลี้ยงบน 0.5 % เกลือพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้สูงเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มของแคลลัสที่อาบรังสี และคะแนนไม่ต่างจากที่ไม่ได้อาบรังสีทีเพาะเลี้ยง 1 %เกลือ การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่ผ่านรังสี 0,1,5,10 และ 15 กิโลแรดบนอาหารเติม เกลือ 0,0.5,1,1.5,2,2.5 และ 3 % พบว่าต้นอ่อนที่ผ่านรังสี 1 กิโลแรดอยู่รอดได้ในอัตราสูงถึง 100 %เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเกลือ 0.5% เมื่ออัตรารังสีแกมมาและความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นจำนวนหน่อและรากต่อต้นจะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความหมายของดินเค็ม

ดินเค็มเป็นดินที่มีเกลือซึ่งละลายน้ำได้ดีอยู่หลายชนิด ในปริมาณมากจนเป็นอันตรายต่อพืชปลูกโดยใช้มาตราฐานว่ามีเกลือมากพอที่จะทำให้ผลผลิตลดลง 50% และกำหนดปริมาณประจุบวกของ Na ที่เกาะรอบเม็ดดินเป็นหลัก คือถ้ามากกว่า 15% ของความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวกลบของดินโซดิก และถ้ามีปริมาณประจุบวกของโซเดียมน้อยกว่า 15% เป็นดินเค็ม (saline soil) เมื่อเทียบกับ cation exchange capacity (CEC) จพพบว่าดินพวกนี้มี PH ค่อนข้างสูงคือประมาณ 7.1-8.5 วิธีการตรวจสอบที่เร็วที่สุดคือการวัดค่านำไฟฟ้า EC ของสารละลายที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ที่ 25 c ถ้าสูงกว่า 2 mM ต่อเซนติเมตร จัดว่าเป็นดินเค็ม ส่วนกรมที่ดินรายงานว่าดินเค็มมีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 4 mM ต่อเซนติเมตร ที่ 25 c

การเกิดดินเค็ม 2 สาเหตุใหญ่คือ

1. ธรรมชาติ ได้แก่ หินหรือแร่ผุผัง เปลี่ยนคุณสมบัติไปโดยกระบวนการทางเคมีและกายภาพ ซึ่งจะทำให้มีเกลือต่าง ๆ เกิดขึ้นมา น้ำใต้ดินเค็มอยู่ระดับพื้นใกล้ผิวดินเมื่อน้ำซึมขึ้นมาก็นำเกลือขึ้นมาด้วย

2. มนุษย์ ทำนาเกลือ สร้างอ่างเก็นน้ำบนดินเค็มหรือมีน้ำใต้ดินเค็มจะทำให้อ่างเก็บน้ำและพื้นที่รอบ ๆ อ่างกลายเป็นดินเค็ม การทำลายป่า น้ำชลประทานซึ่งย่อมมีเกลือละลายอยู่เป็นจำนวนมากน้อยต่างกัน

ความสามารถในการทนเค็มของพืช

ความเค็มมีผลกระทบต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของพืช และยังมีผลให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายวิภาคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนเค็มต่างกันไปตามระยะการเจริญเติบโตจากความทนเค็มของพืชเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.พืชทนเค็ม (halophyte) หมายถึง พืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่มีเกลือในปริมาณสูง พืชเหล่านี้สามารถปรับตัวได้อย่างรวดเร็วตลอดช่วงการเจริญเติบโต

2.พืชไม่ทนเค็ม (glycophyte หรือ nonhalophyte) หมายถึง พืชที่เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งที่อยู่ไม่มีเกลือ แต่สามารถปรับตัวได้บ้างในบางสภาพดินเค็ม

เชื่อว่าพืชมีกลไกในการบรรเทาความเป็นพิษของเกลือในลักษณะต่าง ๆ เช่น

1.กลไกการหลีกเลี่ยง(avoidance mechanism) โดยเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโตพลาสในระดับที่เป็นพิษ พืชจะมีต่อมเกลือ gland หรือ vesiculates hair เป็นแหล่งสะสมเกลือหรือโดยการที่พืชเคลื่อนย้ายไปสะสมในแวคิวโอล

2.กลไกการทนทาน (tolerance mechanism) พืชสามารถป้องกันหรือสร้างระบบเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการทนเค็มเกลือสูง โดยการที่เอนไซม์บางชนิดยังคงมีกิจกรรมได้เป็นปกติแม้จะได้รับอิทธิพลจากความเค็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การดูดซึมและการเคลื่อนย้าย (absorption and translocation) โดยดูดเกลือเข้าสะสมในบริเวณรากหรือลำต้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกลือไปสะสมที่ใบหรือยอด

4.กลไกการอวบน้ำ (succulence) โดยการเพิ่มปริมาณน้ำภายในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของเกลือในเซลล์ลดลง

5.เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำโดยการที่พืชลดความต้านทานของเซลล์ชั้น mesophyll ต่อคาร์บอนไดออกไซด์หรือเพิ่มความต้านทานของปากใบ อย่างไรก็ตามในพืชทนเค็มบางชนิด ไม่ปรากฏว่ามีการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำในตัวเอง

6.มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ภายในพืชเพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ที่มีเกลือ

7.รากพืชสามารถดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำไปใช้ได้โดยไม่ดูดส่วนที่เป็นเกลือ

8.สร้างสารเคลือบในสร้างใบให้หนาขึ้นเพื่อเก็บน้ำไว้

รายงานอ้อยทนทานต่อความเค็มมีลักษณะดังนี้

1.สามารถปลดปล่อยไอออนของโซเดียมคลอไรด์ออกจากต้นพืชได้

2.มีระบบลำเลียงธาตุอาหารที่ดี

3.มีการสร้างสารเพื่อป้องกันแรงดันออสโมติกในเซลล์เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวได้แก่ เมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และเมล็ดข้างพันธุ์หอมมะลิ 105
2. สารเคมี
   - 2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร N_6, MS
   - 2.2 สารเคมีสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ KM-8P
   - 2.3 เอนไซม์สำหรับแยกโปรโตพลาสต์ (Cellulase Onosuka R-10, Macerozyme)
   - 2.4 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ clorox, tween-20 (สารเปียกใบ)
   - 2.5 สารเคมีสำหรับใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ CPW
   - 2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D, Kinetin, NAA
   - 2.7 กรดอะมิโน ได้แก่ proline, casein hydrolysate
   - 2.8 myo-inosital
   - 2.9 แอลกอฮอล์ 70%,90%
   - 2.10 น้ำกลั่น
   - 2.11 สีย้อม ได้แก่ FDA (fluorescein diacetate), Evan blue, Colcofluor white
3. ภาชนะเครื่องแก้ว
   - 3.1 บีกเกอร์
   - 3.2 ขวดรูปชมพู่
   - 3.3 ปิเปต
   - 3.4 พาสเจอร์ปิเปต
   - 3.5 แท่งแก้วคน
   - 3.6 จานแก้ว
   - 3.7 กรวยกรอง
   - 3.8 หลอดเซนตริฟิวจ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 เดซิเคเตอร์

3.10 ไซริงจ์

3.11 ที่นับจำนวนเซลล์

3.12 สไลด์หลุม

3.13 กระจกปิดสไลด์

4. เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร

4.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด

4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ

4.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

4.4 หม้อนึ่งความดัน

5. มีดผ่าตัด

6. ปากคีบ

7. ลูกยางขนิดทนร้อน

8. อะลูมิเนียมฟอยล์

9. ตะเกียงแอลกอฮอล์

10. เครื่องเขย่า

11. กระดาษกรอง Whatman No.1, 5

12. ไนลอนกรองเซลล์

13. จานพลาสติก

14. ตู้ปลอดเชื้อ

15. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

16. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

17. กล้องฟลูออเรสเซนต์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

18. ปั๊มดูดอากาศสำหรับกรองเซลล์

19. ตู้อบ

20. เครื่องเซนตริฟิวจ์

21 ที่ตั้งหลอดเซนตริฟิวจ์

22. เครื่องฉายรังสีแกมมา ของ สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ถ. วิภาวดีรังสิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลัสและเซลล์แขวนลอย ข้าวสองพันธุ์ที่ได้จากเมล็ดให้เกิดเป็นต้น

1.1 การชักนำให้เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส

นำเมล็ดข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 มาแกะเอาเปลือกออกนำไปล้างโดยผ่านน้ำไหลและล้างด้วย teepol จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ นาน 3 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอร็อก 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปลียกใน (tween 20)จำนวน 3-4 หยด เขย่าเป็นครั้งคราว นาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมด้วย เคซีนไฮโดไลลเซต(casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร, โพรลีน(proline) 1 กรัมต่อลิตร, ไมโออินโอซิทอล (myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน

1.2 หาสูตรอาหารที่ชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้น

ชุด A นำแคลลัสข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 อายุ 1-1.5 เดือน (รูปที่ 1) ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 และ MS ที่ประกอบด้วย IAA,Kinetin และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตาม (ตารางที่ 1) รวม 14 สูตร บันทึกผลการทดลองในเวลา 1 เดือน

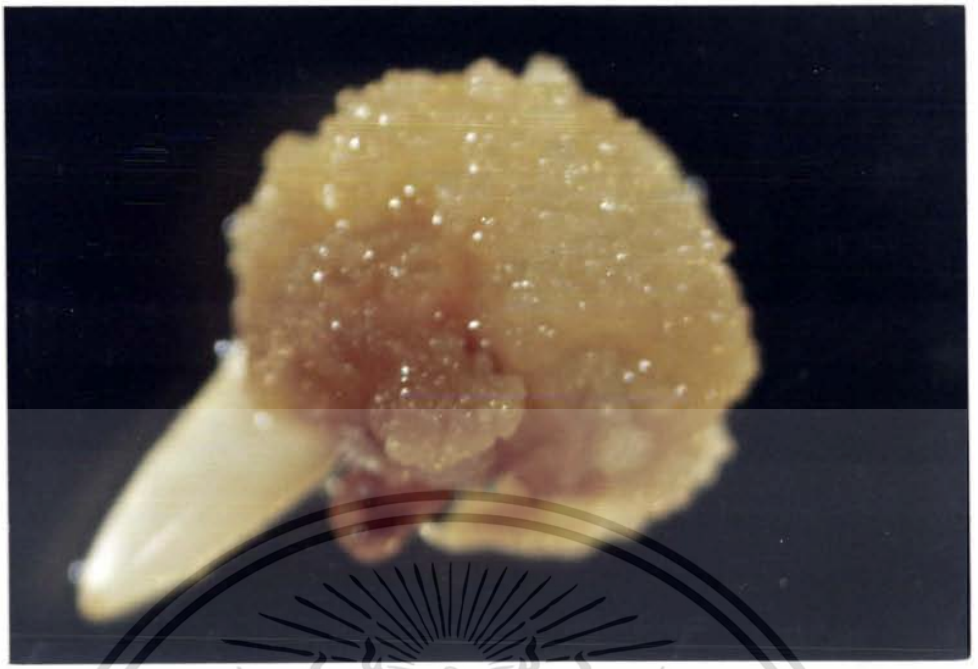
ชุด B นำแคลลัสข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 อายุ 0.5 เดือน (รูปที่ 2) ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย IAA 1 : BA 4 , NAA 3 , Kinetin 2 และ BA 2 รวม 4 สูตร บันทึกผลการทดลองในเวลา 1 เดือน

ชุด C นำแคลลัสข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 อายุ 1 เดือน ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย IAA 2 : BA 6 , BA 2 : Kinetin 3 และ NAA 5 : Kintin 1 รวม 4 สูตร บันทึกผลการทดลองในเวลา 1 เดือน

1.3 หาสูตรอาหารที่ชักนำเซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2 ให้เกิดเป็นต้น

นำเซลแขวนลอยข้าว 2 พันธุ์คือบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการชักนำจาก แคลลัส (รูปที่ 3) ย้ายลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย IAA,NAA,Kinetin และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แคลลัสข้าว อายุ 1-1.5 เดือน

รูปที่ 2 แคลลัสข้าว อายุ 0.5 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 เซลแขวนลอยข้าว 2 พันธุ์คือซ้ายบาสมาติ 370 และขวาหอมมะลิ 105
ที่ได้จากการชักนำจากเลี้ยง แคลลัสในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตาม (ตารางที่ 2) รวม 10 สูตร บันทึกผลการทดลองในเวลา 1 เดือน

การทำแห้งก่อนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่จะชักนำให้เกิดต้นอ่อน โดยการนำแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยใสใน plate และ flask เป็นเวลา 3-7 วันให้น้ำระเหยออกดูสภาพความแห้งไม่ให้ถึงเหี่ยวตาย จึงย้ายลงเลี้ยงต่อจะสามารถดูดเอาสารอาหารได้ดีขึ้น (รูปที่ 4)

การทดลองที่ 2 ชักนำแคลลัสให้เป็นเซลล์แขวนลอยโดยการเลี้ยงในอาหารเหลว

นำแคลลัสอายุประมาณ 1 เดือน ที่มีลักษณะแบบ friable callus (รูปที่ 5) ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมด้วย เคซีนไฮโดไลลเซต (casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร,โพรลีน(proline) 1 กรัมต่อลิตร ,ไมโออินโอซิทอล (myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ในฟลาส 125 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียล เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7-15 วัน

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงแคลลัส, เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสตร์

3.1 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

3.1.1 นำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และ หอมมะลิ 105 ที่ชักนำจากเมล็ดอายุประมาณ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมด้วย เคซีนไฮโดไลลเซต(casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร,โพรลีน(proline) 1 กรัมต่อลิตร ,ไมโออินโอซิทอล (myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซนต์ ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ บันทึกผลในเวลา 1 เดือน

3.1.2 เพาะเลี้ยงเมล็ดที่งอกแล้วเป็นเวลา 3 วันเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับ 0, 0.25, 0.5, 0.75 1.0 1.25 1.5 1.75 และ 2.0 เปอร์เซนต์ บันทึกผลในเวลา 1 เดือน

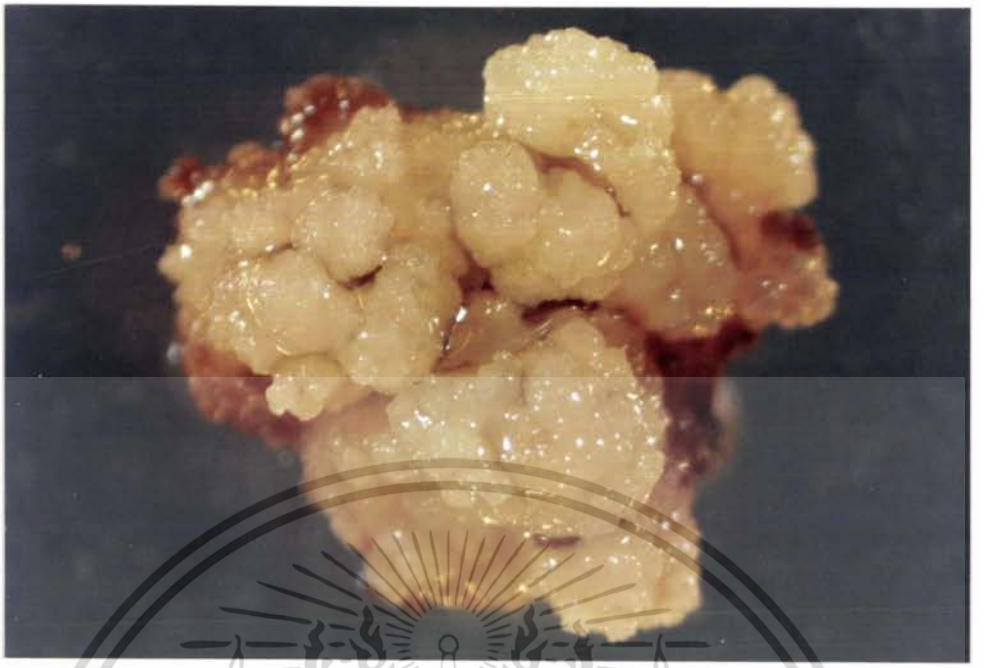
3.2 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และ หอมมะลิ 105 ที่มีความสม่ำเสมอ (รูปที่ 6) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมด้วย เคซีนไฮโดไลลเซต(casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร,โพรลีน(proline) 1 กรัมต่อลิตร ,ไมโออินโอซิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 การทำแห้งก่อนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่จะชักนำให้เกิดต้นอ่อน บน เซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2 ล่างแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แคลลัสอายุประมาณ 1 เดือน ที่มีลักษณะแบบ friable callus

รูปที่ 6 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์ซ้ายบาสมาติ 370 และขาวหอมมะลิ 105 ที่มีความสม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซนต์ ได้รับการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 7 วัน ย้ายไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ รวม 9 ระดับ (รูปที่ 7)โดยใช้เซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่ออาหารเหลวที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตรบันทึกผลในเวลา 1 เดือน โดยตรวจการมีชีวิตด้วยสีย้อม FDA และวัดปริมาตรเซลล์ แล้ว เพาะเลี้ยงต่อโดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 7-15 วัน บันทึกผล นำเซลล์แขวนลอยที่ทนเกลือได้แล้วเทผสมอาหารแข็งลง plate ให้พัฒนาเป็นไมโครแคลลัส

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการทดลองที่ 2 นำมาวางเลี้ยงบนอาหาร N_6 ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับ 0,0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์

3.3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสตร์

3.3.1 การแยกโปรโตพลาสตร์ จากเซลล์แขวนลอยของข้าว 2 สายพันธุ์

มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์แขวนลอยของข้าวน้ำหนัก 0.3 กรัมของข้าวพันธุ์ บาสมาติ 370 และ หอมมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมด้วย เคซีนไฮโดไลเสต(casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร,โพรลีน(proline) 1 กรัมต่อลิตร ,ไมโออินโอซิทอล (myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซนต์ ได้รับการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 7-15 วัน

2. นำเซลล์แขวนลอย ตรวจดูการมีชีวิตโดยใช้สีย้อม Fluorescien diacetate

3. นำเซลล์แขวนลอยแช่ในสารละลาย CPW ใน plate ที่มี mannital 0.35 M 30 นาที

4. ดูดสารละลาย CPW ออก แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ เซลลูเลส กับมาเซอโรไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 3:1 และ 2:1 ในข้าวพันธุ์ บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ตามลำดับ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น mannital 0.35 M ปิดด้วย parafilm

5. นำไปวางในที่มืดบนเครื่องเขย่า 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

6. ดูดสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสตร์ แยกออกมากรองผ่านที่กรอง ขนาด 80 ไมโครเมตร ที่บรรจุในหลอดทดลอง นำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

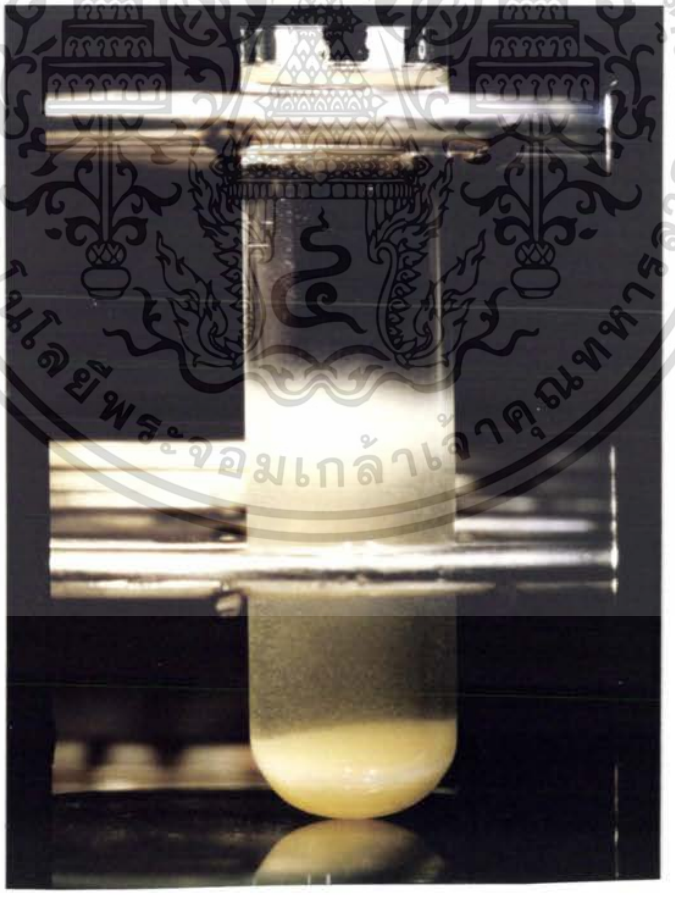
7. ดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้ง

8. ทำการล้างด้วยสารละลาย CPW 2-3 ครั้ง แต่ละครั้งแยกโปรโตพลาสออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายเอนไซม์ออก

9. แยกโปรโตพลาสตร์ออกจากเศษเซลล์ โดยใส่สารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และสารละลาย CPW 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยสภาพที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75,1.0, 1.25, 1.5, 1.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ รวม 9 ระดับ



รูปที่ 8 ชั้นของโปรโตพลาสตร์ (band)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 10 นาที จะได้ชั้นของโปรโตพลาสตร์ (band) (รูปที่ 8) อยู่ระหว่างชั้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสและสารละลาย CPW ส่วนเศษเซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดโปรโตพลาสตร์ออกมาโดยใช้ไมโครปิเปต

10. ล้างโปรโตพลาสตร์ออกด้วยสารละลาย CPW 1-2 ครั้ง เพื่อทำให้โปรโตรพลาสตร์สะอาด แยกโปรโตรพลาสตร์โดยนำไปเหวี่ยงที่ 750-800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลาย CPW ออก

11. ดูการมีชีวิตของโปรโตพลาสตร์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Fluorescien diacetate และ สีย้อม evan blue

12. ใสอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ 3 สูตรได้แก่ KM-8P, MS และ N_6 ลงไปในแต่ละกรณี ปรับปริมาตรของโปรโตพลาสตร์ เป็น 1 มิลลิตร สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจนับ ปรับปริมาตรอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้ได้โปรโตพลาสตร์ ที่มีความหนาแน่น $2* 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรนำไปเลี้ยงต่อไป

3.3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตรพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอยของข้าว 2 พันธุ์ ในสภาพที่ มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

มีวิธีการเลี้ยง 4 แบบ

วิธีที่ 1. การเลี้ยงในอาหารเหลว

1.1 โปรโตพลาสตร์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ที่ปรับความหนาแน่นเรียบร้อยแล้ว

1.2 ใช้ pasteur pipette ดูดโปรโตพลาสตร์ มาเลี้ยงใน plate plastic

1.3 ปิดด้วย parafilm และเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

วิธีที่ 2. การเลี้ยงแบบหยดอาหารเล็กๆ (รูปที่ 9)

2.1 โปรโตพลาสตร์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ที่ปรับความหนาแน่นเรียบร้อยแล้ว

2.2 ใช้ pasteur pipette ปลายที่มีขนาดเล็กกว่าปกติ ดูดโปรโตพลาสตร์มาแล้วหยดลงบนฝาด้านในหรือตัวของ plate plastic

2.3 ครำฝา plate ลงกับตัว plate

2.4 ปิดด้วย parafilm และเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีที่ 3 การเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง

3.1 โปรโตพลาสตร์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ที่ปรับความหนาแน่นเรียบร้อยแล้ว

3.2 หลอม agarose หรือ plytagel ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45 องศาเซลเซียส ก่อนแข็งตัว

3.3 ดูดโปรโตพลาสตร์มาในปริมาณพอกับอาหารหยดลงไปเบาให้เข้ากับอาหารทั่ว plate ทิ้งไว้สักครู่หนึ่ง

3.4 ปิดด้วย parafilm และเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

วิธีที่ 4 เลี้ยงแบบ bead type ใช้ nurse cell (รูปที่ 10)

คือการนำโปรดตพลาสตร์ ฝังในชั้นวุ้นอาหารแล้วนำไปแช่ในสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cell) ให้กับโปโตพลาสตร์ ซึ่งเซลล์พี่เลี้ยงนี้จะไม่เจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไม่ให้เจริญแทนโปรโตพลาสตร์

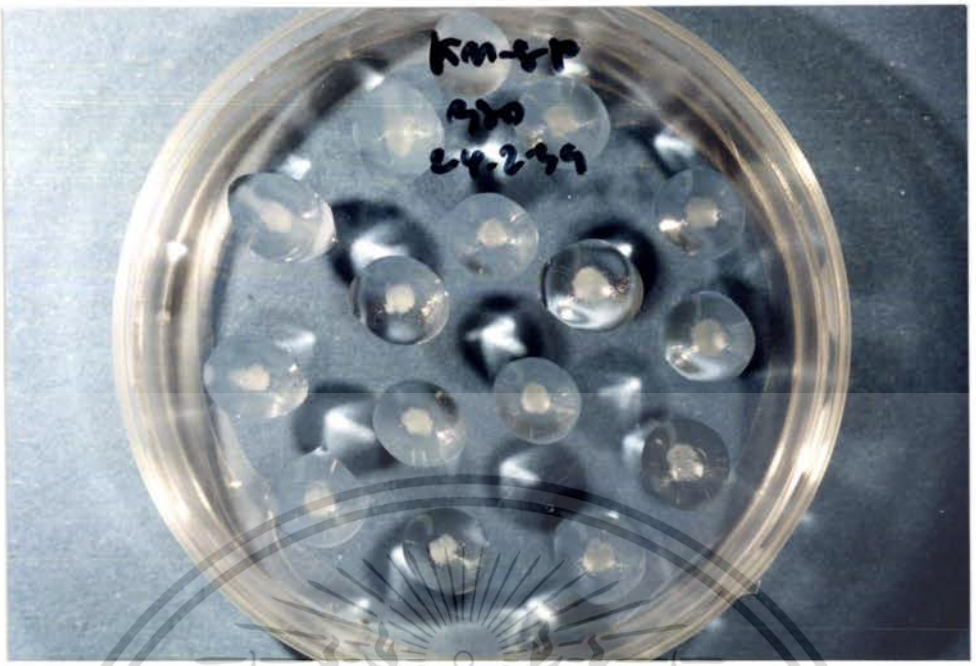
ใช้อาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตรอาหาร

1. สูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เสริมด้วย เคซีนไฮโดไลลเซต (casein hydrolysate) 0.1 กรัมต่อลิตร,โพรลีน(proline) 1 กรัมต่อลิตร, ไมโออินโอซิทอล (myo-inositol) 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล sucrose 3 เปอร์เซนต์ ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ1.0 เปอร์เซนต์ โดยใช้วิธีเลี้ยงในอาหารเหลว และ การเลี้ยงแบบหยดอาหารเล็กๆ

2. สูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร , น้ำตาล maltose 144 กรัมต่อลิตร และ agarose 8 กรัมต่อลิตร โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ bead type ใช้ nurse cell , เลี้ยงแบบหยดอาหารเล็กๆ และ เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง

3. สูตร KM-8P (ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหาร KM-8P คัดแปลง) ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ,น้ำตาล glucose 68.4 กรัมต่อลิตร และ phytagel 0.3 กรัมต่อลิตร โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ bead type ใช้ nurse cell และ เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 การเลี้ยงแบบหยดอาหารเล็กๆ

รูปที่ 10 เลี้ยงแบบ bead type ใช้ nurse cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของแคลลัสและเซลแขวนลอย

นำแคลลัสอายุ 1-1.5 เดือน, เซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2 (รูปที่ 11)ที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้ว คัดเฉพาะที่เป็นก้อนโปรโตคอร์ม และ เซลแขวนลอยที่ละเอียดสม่ำเสมอ ของข้าวบาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ใสใน plate เล็กนำไปฉายรังสีแกมมา 4 อัตราคือ 0 4 6 และ 8 กิโลแรด ใช้เวลาฉายตามตารางที่ 3 หลังจากฉายพักไว้ในห้องเพาะเลี้ยง 1 วัน ย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยง (รูปที่ 12)

โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยฮอร์โมนตามการทดลองที่ 1 ดังนี้

1. แคลลัส พันธุ์หอมมะลิ 105 ใช้ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IAA 1 : BA 4
2. แคลลัส พันธุ์บาสมาติ 370 ใช้ สูตรอาหาร N_6 ที่ประกอบด้วย IAA 2 : BA 6
3. เซลล์แขวนลอยพันธุ์หอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 2

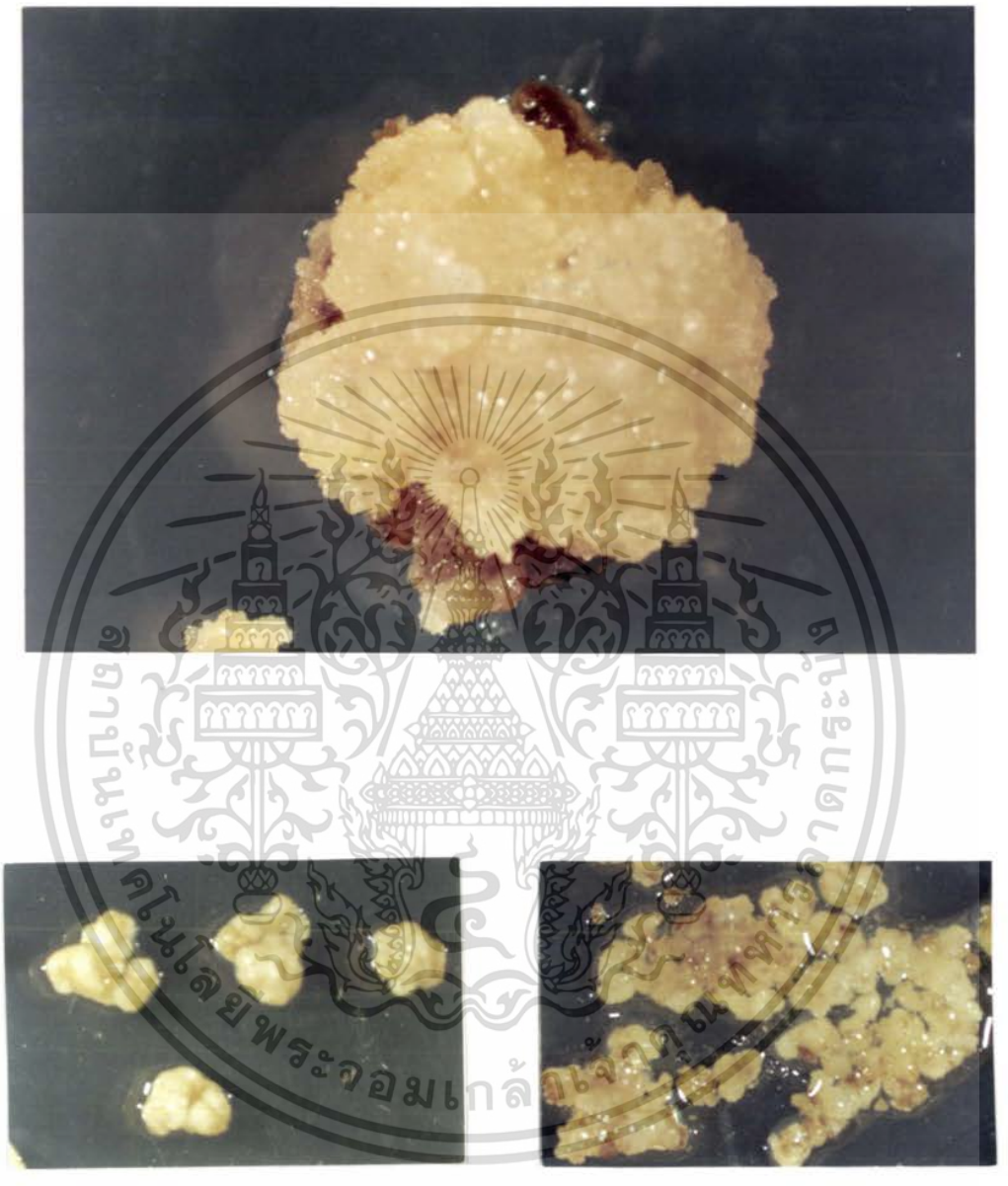
ใช้ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย NAA 2 : BA 2 ที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์

4. เซลล์แขวนลอยพันธุ์บาสมาติ 370 จากการทดลองที่ 2

ใช้ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 ที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์

และ 5. เซลล์แขวนลอยที่ละเอียดและเซลลีแขวนลอยจากการทดลองที่ 2 ที่เหลืออยู่ ลงใน flask และเซลล์แขวนลอยที่ละเอียดลงใน flask อาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 บนแคลลัสอายุ 1-1.5 เดือน, ล่างเซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2

ซ้ายหอมมะลิ 105 ขวาบาสมาติ 370 ใช้ในการฉายรังสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 12 ย้ายแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี
ลงเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1. แสดงสูตรอาหาร ชุด A

		BA2	BA3	BA4	BA5	BA6
MS	IAA1	A	B	C	D	-
	IAA2	-	-	E	F	G
N_6	IAA1	H	I	J	K	-
	IAA2	-	-	L	M	N

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหาร N_6

1.IAA2	2.NAA2	3.BA2	4.Kin
5.IAA2: NAA2	6.IAA2: BA2	7.IAA2: Kin2	-
8.NAA2: BA2	9.NAA: Kin2	-	10.BA2 Kin2

ตารางที่ 3 แสดงเวลาฉายรังสีแกมมา

ปริมาณรังสี (กิโลแรด)	เวลา (วินาที)
0	0
4	9
6	22
8	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้นอ่อน

1.1 จารชักนำให้เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส เป็นระยะเวลา 1 เดือนได้แคลลัส (รูปที่ 13)

1.2 จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้พัฒนาในอาหารสูตรต่างๆ

ชุด A เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 1-1.5 เดือน ในพันธุ์หอมมะลิ 105 มีการพัฒนาไปหลายรูปแบบ เช่น แตกเป็นก้อนเล็กๆในสูตรอาหารที่มี Kinetin เป็นองค์ประกอบ,เกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร MS IAA 1 : BA 4 , เปลี่ยนเป็นสีส้มเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีดำในสูตรที่มีฮอร์โมนมาก และสามารถเกิดเป็นแคลลัสเล็กๆสีขาวได้ใหม่ (รูปที่ 14) ส่วนในพันธุ์บาสมาติ 370 มีการพัฒนาเป็นจุดเขียว (รูปที่ 15) ที่ผิวของก้อนแคลลัสในสูตรอาหาร N_6 IAA 2 : BA 6 และในทุกสูตรอาหารมีการเจริญเป็นก้อนใหญ่ขึ้น มีการดำน้อยกว่าพันธุ์ หอมมะลิ 105

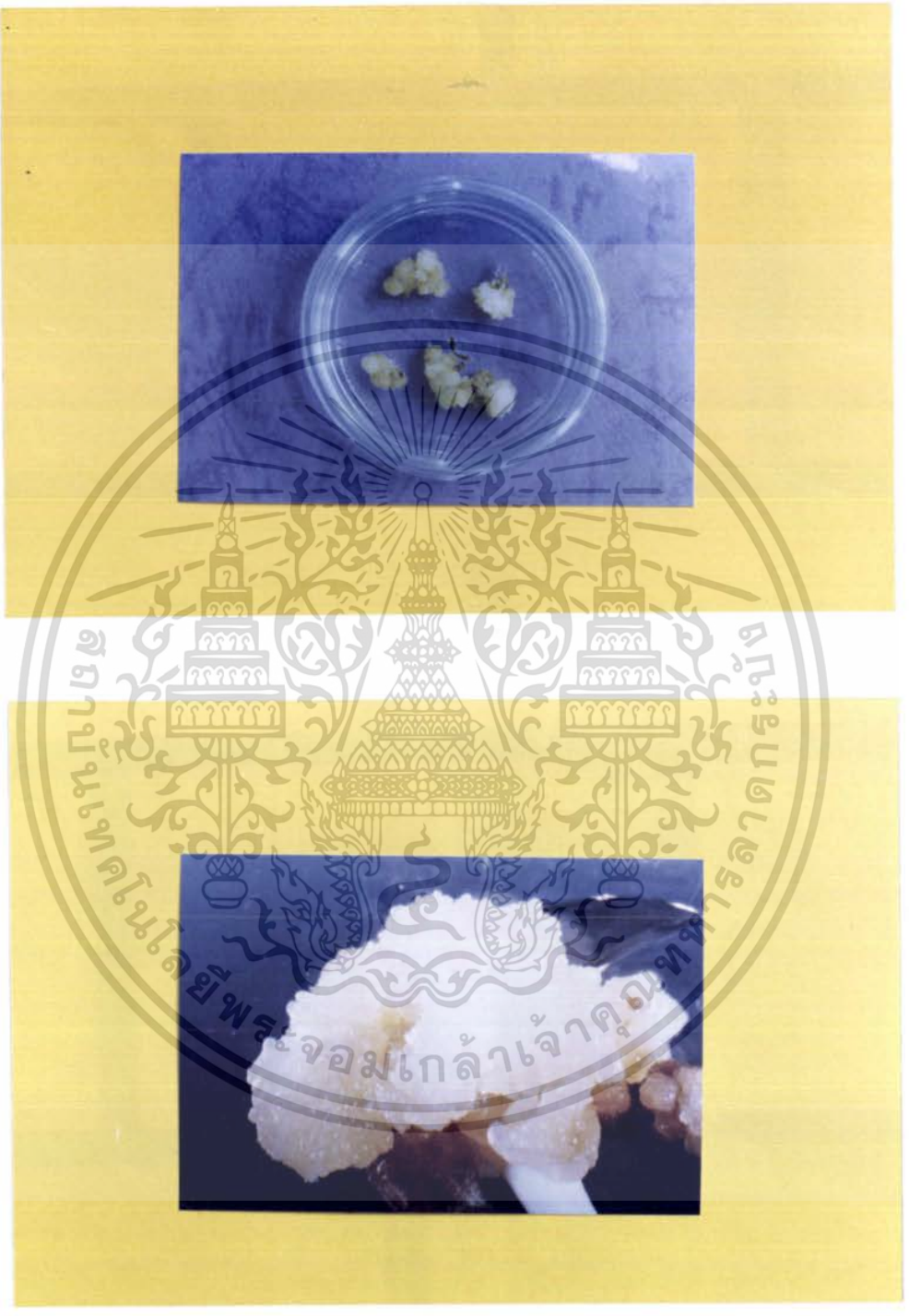
ชุด B เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 0.5 เดือน ในพันธุ์หอมมะลิ 105 มีตุ่มเขียวในสูตร IAA 1 : BA 4 เป็นที่แน่นอนส่วนพันธุ์บาสมาติ 370 พบการเกิดรากในสูตรอาหาร NAA 3 ,พบการเกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร BA 2 (รูปที่ 16.1)

ชุด C เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสอายุ 1 เดือนในพันธุ์หอมมะลิ 105 มีการเจริญในระยะ 2 สัปดาห์แรกและตายลงโดยเปลี่ยนเป็นสีส้มน้ำตาลและดำ (รูปที่ 16.2) ส่วนพันธุ์บาสมาติ 370 พบการเกิดจุดเขียวที่ผิวแคลลัสในสูตรอาหาร IAA 2 : BA6 เป็นที่แน่นอนส่วนสูตรอื่นไม่เกิดจุดเขียว

1.3 เมื่อนำ เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 2 มาวางบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยออร์โมนระดับต่างๆเป็นเวลา 1 เดือนได้ผล (รูปที่ 17) และ (รูปที่ 18) ตามลำดับ พบว่าเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 เกิดตุ่มเขียวได้ในหลายสูตรอาหารแต่เกิดได้มากสุดในสูตร N_6 BA 2 ประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของโปรโตคอมทั้งหมด ส่วนเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่มีลักษณะอ่อนนิ่มเกิดพัฒนาเป็นรากได้ในอัตราส่วนที่น้อย ในสูตรอาหาร N_6 IAA 2 : NAA 2 และเกิดเป็นตุ่มเขียวในสูตรอาหาร N_6 NAA 2 : BA 2 ได้ดี

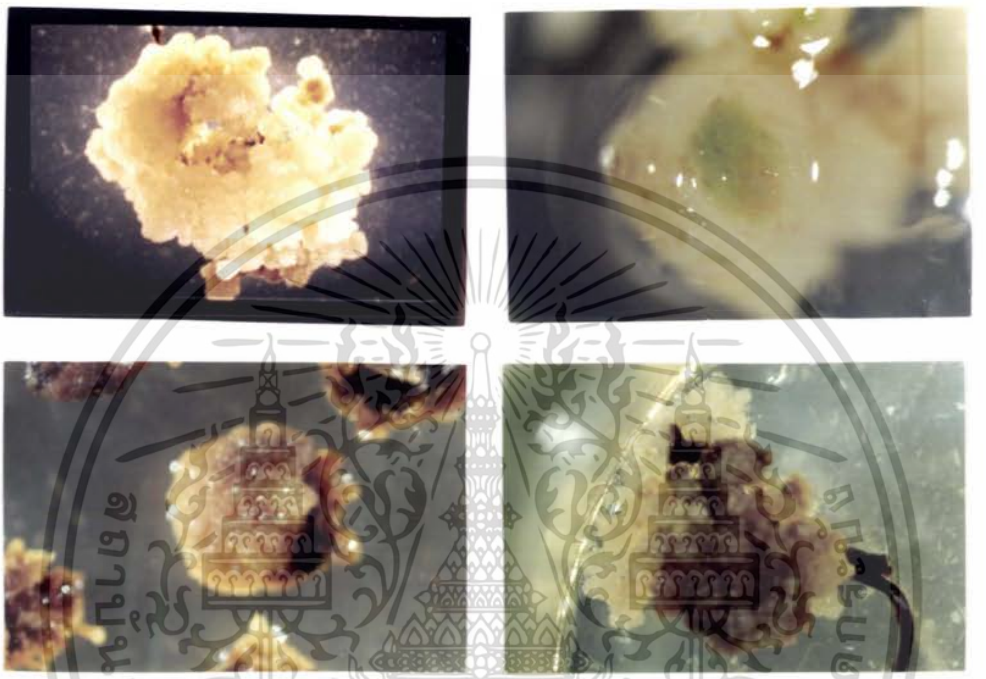
ในการทำแห้งเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 จากการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 5 วัน พอให้แห้งหมาดๆได้ผล (รูปที่ 19) พบว่าเกิดรากสั้นๆได้ในเวลา 3 วันหลังวางบนอาหาร และเกิดตุ่มเขียวได้เร็วขึ้นในเวลาเพียง 10 วันในปริมาณการเกิดที่มากว่าการไม่ทำแห้ง และในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 เมล็ดเกิดเป็นแคลลัส เป็นระยะเวลา 1 เดือนได้แคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 แคลลัสพันธุ์หอมมะลิ 105 มีการพัฒนาไปหลายรูปแบบ เช่น

1.แตกเป็นก้อนเล็กๆในสูตรอาหารที่รูปที่ มี Kinetin เป็นองค์ประกอบ

2.เกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร MS IAA 1 : BA 4

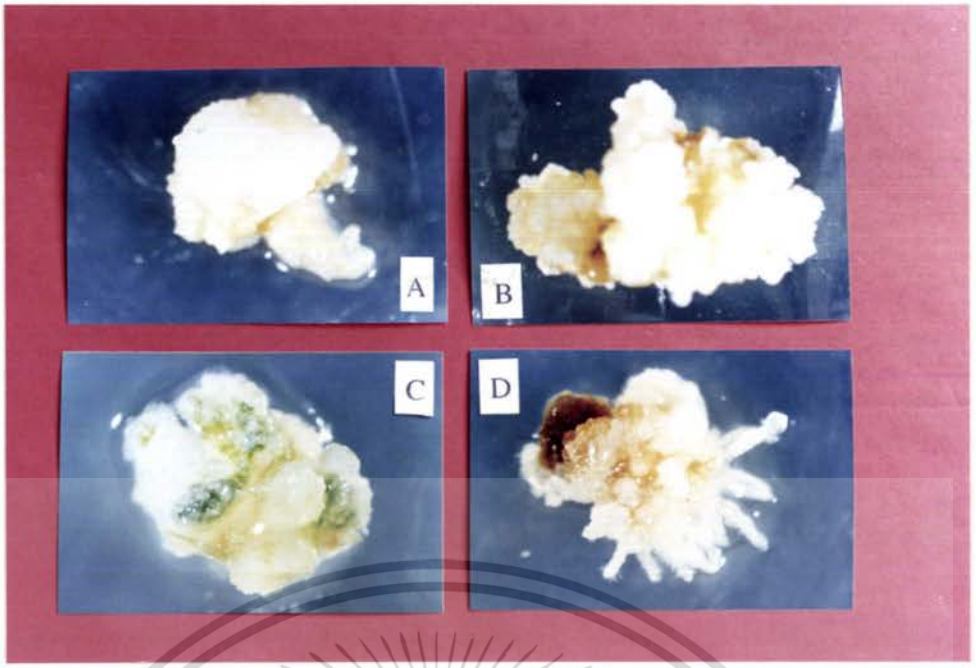
3. เปลี่ยนเป็นสีส้มเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีดำในสูตรที่มีฮอร์โมนมาก

4.และสามารถเกิดเป็นแคลลัสเล็กๆสีขาวได้ใหม่

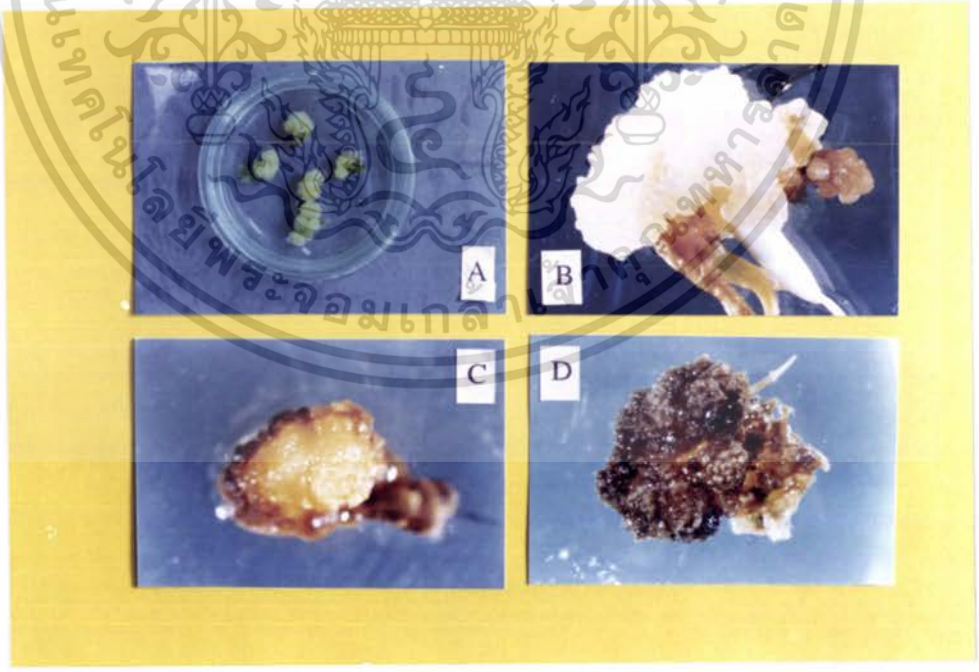
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 15 แคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 เกิดจุดเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16.1 A แคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 0.5 เดือน
B เจริญใหญ่ขึ้นในสูตร Kinetin 2
C พบการเกิดรากในสูตรอาหาร NAA 3
D พบการเกิดตุ่มเขียวในสูตรอาหาร BA 2



รูปที่ 16.2 A-B แคลลัสในพันธุ์หอมมะลิ 105 อายุ 1 เดือน
C-D เจริญได้ในระยะ 2 สัปดาห์แรกและตายลงโดยเปลี่ยนเป็นสีส้มน้ำตาลและดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 17 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 จากการทดลองที่ 2 มาวางบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยออร์โมนระดับต่างๆเป็นเวลา 1 เดือนได้ผล

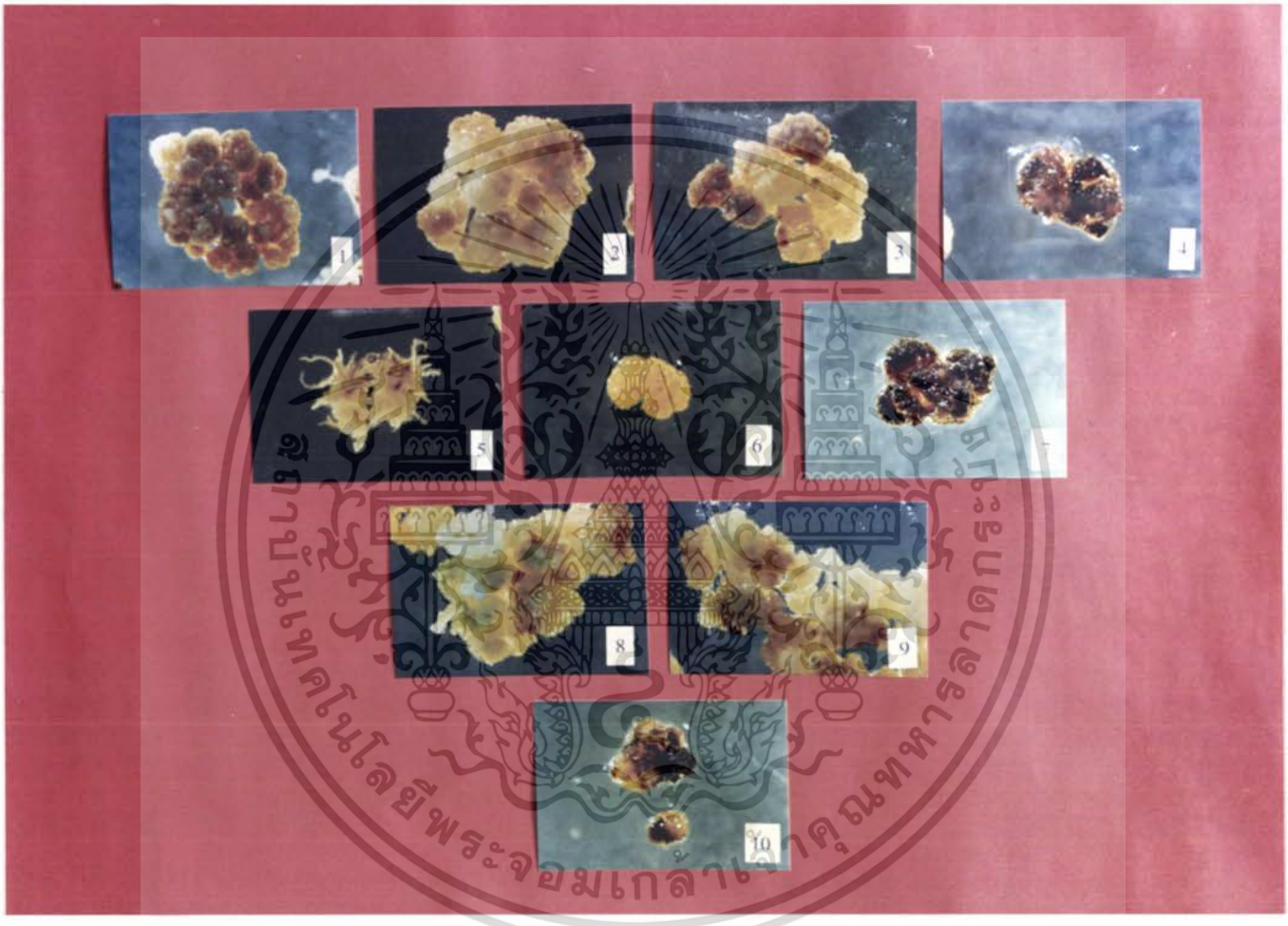
1.IAA2 2.NAA2 3.BA2 4.Kin2

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

8.NAA2:BA2 9. NAA2:Kin2

10.BA2:Kin2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 เซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์หอมมะลิ105 จากการทดลองที่ 2 มาวางบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยออร์โมนระดับต่างๆเป็นเวลา 1 เดือนได้ผล

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

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

8.NAA2:BA2 9. NAA2:Kin2

10.BA2:Kin2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 19 ผลการทำแห้งเซลล์แขวนลอยข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 จากการทดลองที่ 2

A-B เกิดรากภายใน 2-3 วันหลังจากวางเซลล์แขวนลอยแห้งเลี้ยงบนอาหารแข็ง

C เกิดตุ่มเขียวชัดเจน D เกิดรากชัดเจน

E-F บางก้อนโปรโตคอร์ม เกิดทั้งตุ่มเขียวและรากในก้อนเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขวนลอยหอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 2 การทำแห้งคิดว่ามีผลบ้างเล็กน้อย(เพราะตรวจผลได้ยากเนื่องจากมีลักษณะของโปรโตคอร์มซึ่งเจริญได้ดีมีอยู่น้อยมาก ส่วนแคลลัสไม่มีผลและอาจทำให้ตายได้

การทดลองที่ 2 ชักนำแคลลัสให้เป็นเซลล์แขวนลอยโดยเลี้ยงในอาหารเหลว

friable callus ที่มีขนาดเล็กๆจะกลายเป็นสีดำในเวลา 1 เดือน และ แคลลัสใหญ่ๆจะเปลี่ยนเป็นสีดำในเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นจะเกิดตุ่มขาวงอกออกจากก้อนแคลลัสที่ดำ (รูปที่ 20) เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยในเวลา 3 เดือน และมีขนาดสม่ำเสมอเมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงต่อไปเรื่อนเป็นเวลา 5 เดือนสามารถเพิ่มจำนวนได้มากและรวดเร็ว (รูปที่ 21)

เซลล์แขวนลอยที่ได้จะมี 2 ส่วน (รูปที่ 22)

1. Micro callus จะมีขนาดใหญ่ประมาณ 1-5 มิลลิเมตร จะเป็น compact ในพันธุ์หอมมะลิ 105 และเป็น แบบ friabla ขนาด 1-3 มิลลิเมตรรวมทั้งเกิดเป็น โปรโตคอร์ม (รูปที่**23**) ขนาน 5 มิลลิเมตร ในพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถเกิดตุ่มเขียวได้

2. cell suspention มีลักษณะเป็นท่อน เล็ก 0.1 มิลลิเมตร ไม่สามารถ เจริญเป็นได้เมื่อเทผสมกับอาหารแข็ง ในพันธุ์บาสมาติ 370 มันเป็นสาเหตุความขุ่นและความหนืดข้นของอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง ส่วนหอมมะลิ 105 cell suspention นี้มีอยู่น้อยไม่ข้น

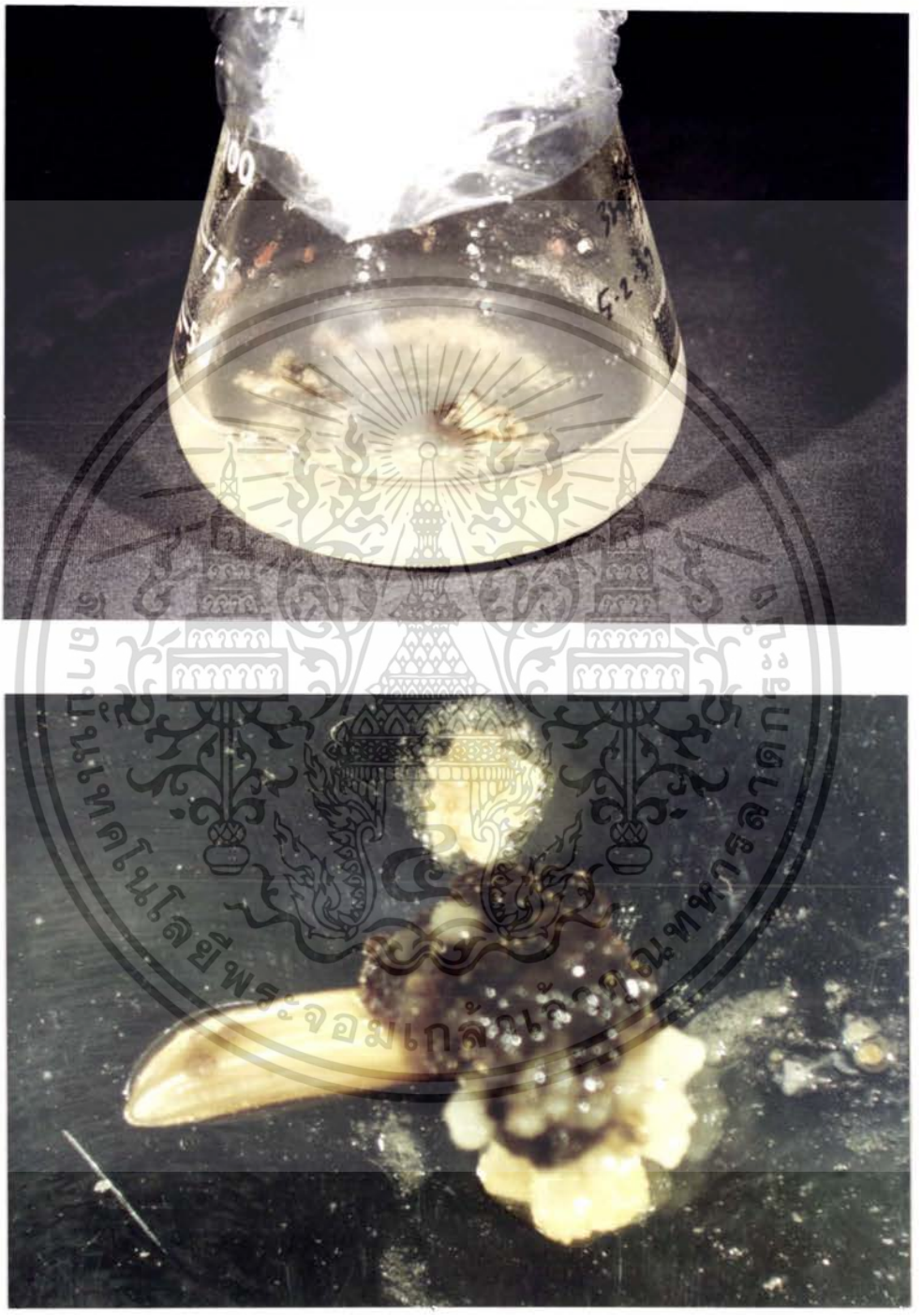
ทั้ง 2 ส่วนสามารถขยายจำนวนเพิ่มได้เมื่อเปลี่ยนอาหาร

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงแคลลัส, เซลล์แขวนลอย และ โปรโตพลาสตร์

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

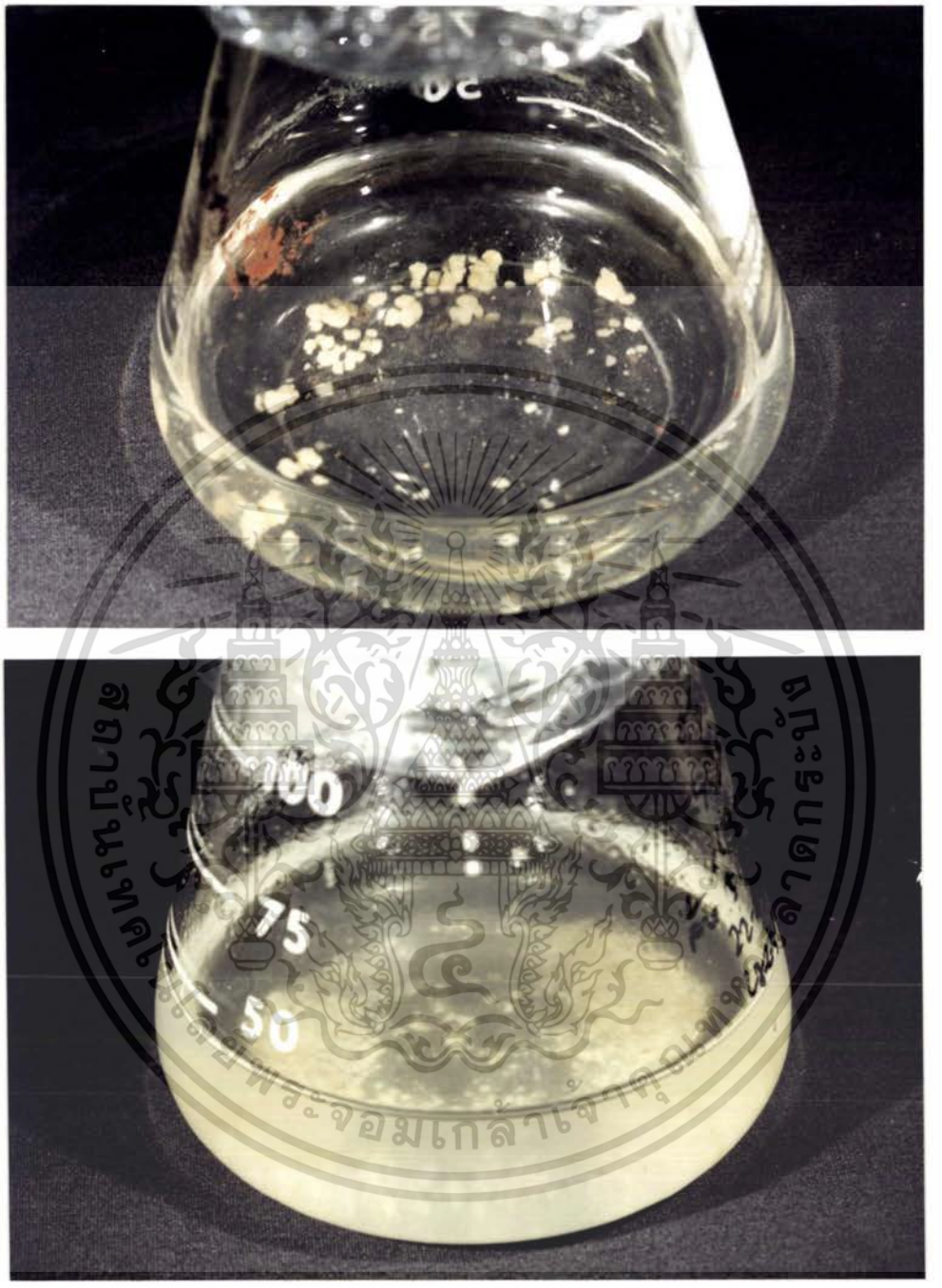
แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยเกลือ จะทำให้เกิดความเค้นสามารถดึงนำมาใช้ได้น้อยลงและตายเนื่องจากความเป็นพิษของเกลือ (รูปที่ 24)คลลัสพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 0.75 เปอร์เซนต์ แคลลัสพันธุ์หอมมะลิ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 0.5 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 เกิดตุ่มขาวงอกออกจากก้อนแคลลัสที่ดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

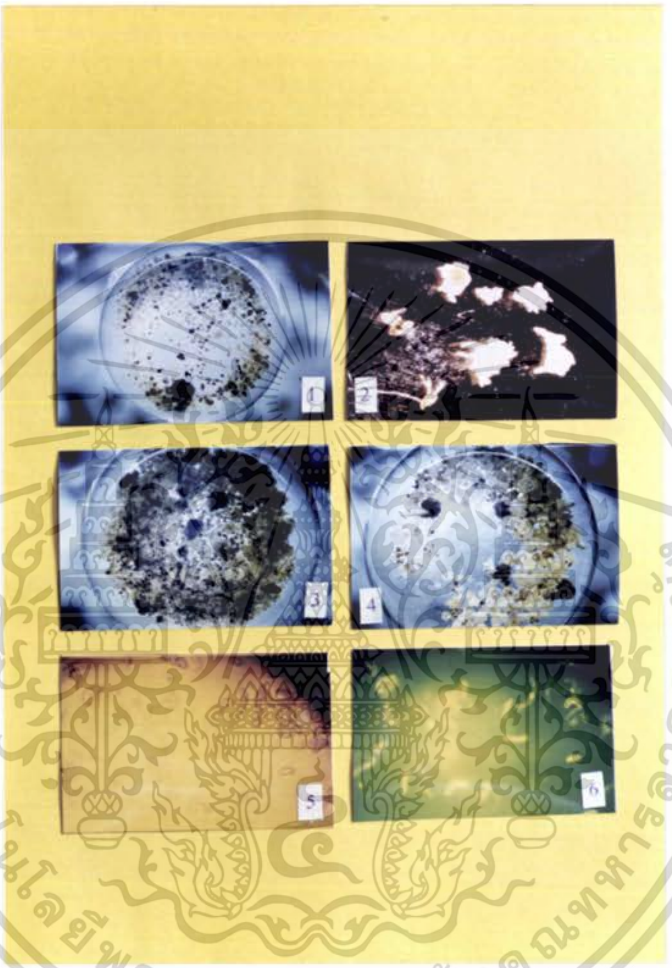


รูปที่ 21 เซลล์แขวนลอยในเวลา 3 เดือนมีขนาดสม่ำเสมอ

บน หอมมะลิ 105

ล่าง บาสมาติ 370

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 เซลล์แขวนลอยที่ได้จะมี 2 ส่วน

1. Micro callus (1) และดูจากกล้องสเตริโอ (2)

เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยในเวลา 3 เดือน

พันธุ์ บาสมาติ 370 ซ้าย (3) หอมมะลิ 105 ขวา (4)

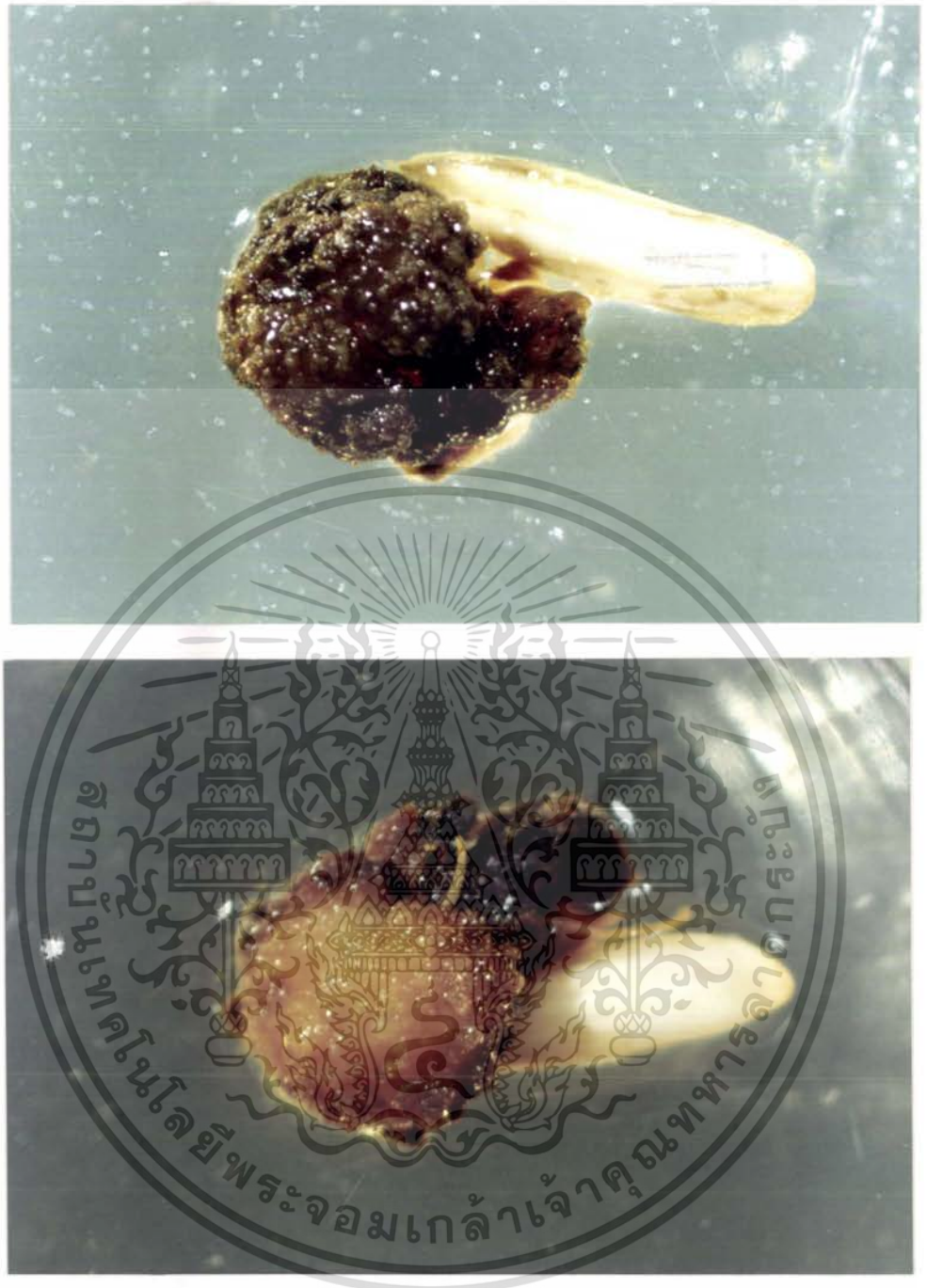
2. Cell suspention เล็กมาก 0.1 mm (5)

ตรวจสอบการมีชีวิตด้วย FDA (6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 23 โปรโตคอร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 ผลของความเป็นพิษของเกลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส เมล็ดพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถกงอกเป็นแคลลัสได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 1.0 เปอร์เซนต์ เมล็ดพันธุ์หอมมะลิ สามารถงอกเป็นแคลลัสได้ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 0.25 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 25)

การทอลองที่ 3.2 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยง

เซลล์แขวนลอย

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือนตรวจผลพบว่า พันธุ์บาสมาติ 370 ยังมีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้น 1.50 เปอร์เซนต์ ส่วนพันธุ์หอมมะลิ 105 ยังมีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์ ที่ระดับความเข้มข้นมากจะมีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่น้อยกว่า ที่ระดับ 2.0 เปอร์เซนต์ ไม่มีเซลล์มีชีวิตเหลือ ผลการเจริญ ดัง (กราฟที่ 1 และ 2) และ (รูปที่ 26) และเมื่อเปลี่ยนอาหารเหลวที่มีเกลือ ทุก 7-15 วัน เป็นระยะเวลา 3 เดือนพบว่าสามารถมีชีวิตและขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้นได้ในระดับความเข้มข้น 0.75 และ 0.50 เปอร์เซนต์ ในพันธุ์บาสมาติ 370 และ หอมมะลิ 105 ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยจะเปลี่ยนเป็นสีที่เข้มขึ้น (รูปที่ 27) เซลล์แขวนลอยในความเข้มข้นเกลือมากๆเมื่อยังเลี้ยงต่อไปเลยๆเป็นเวลา 2-3 เดือนสามารถเกิดเซลล์แขวนลอยก้อนใหญ่ที่มีชีวิตขึ้นใหม่ แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนขยายไม่ได้ และจะเกิดลักษณะแบบนี้เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในความเข้มข้นเกลือต่ำที่ยังมีชีวิตอยู่เปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้นกว่าเดิม 0.25 เปอร์เซนต์

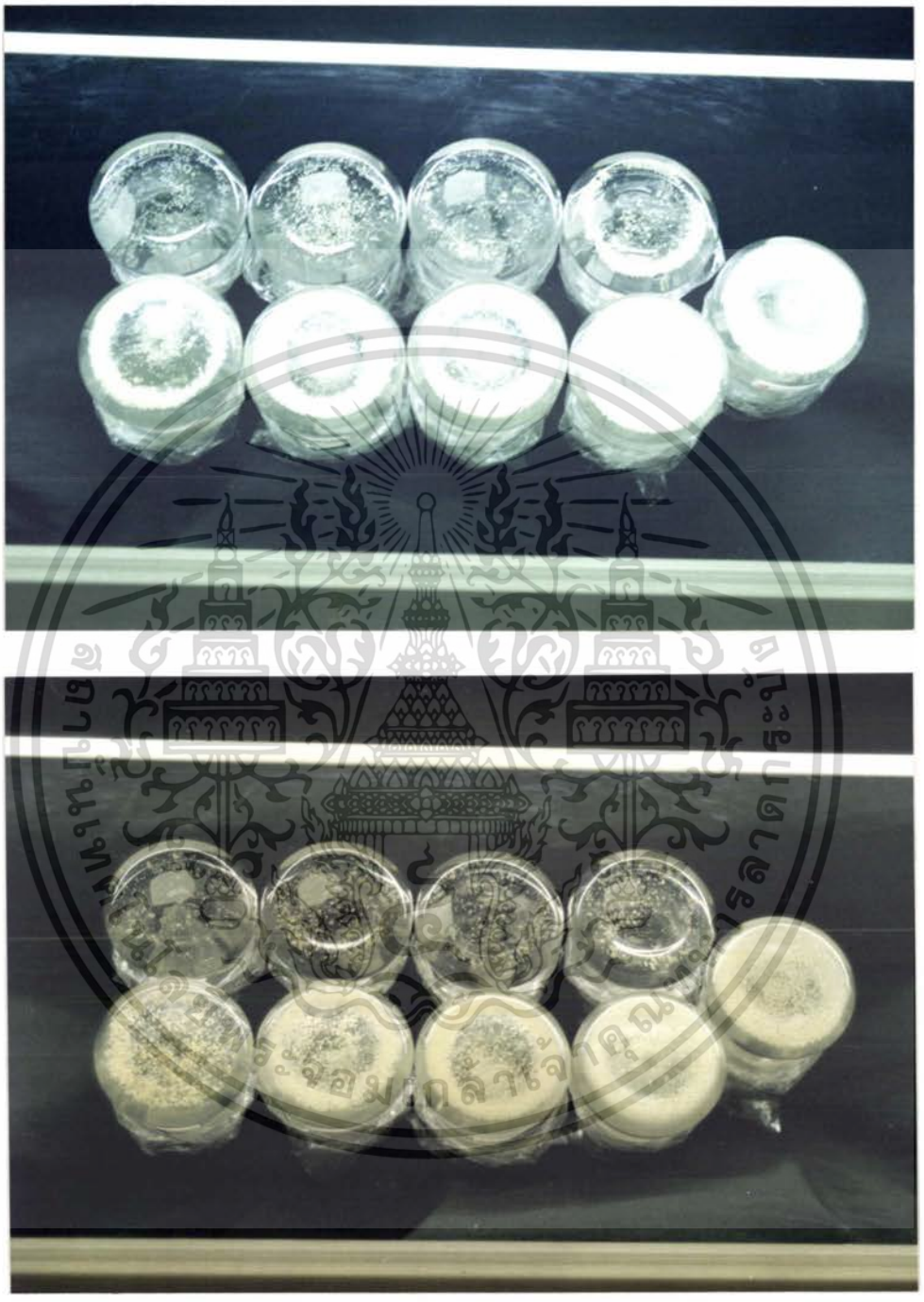
ส่วนเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการทดลองที่ 2 เมื่อนำไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเกลือ ผลสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ และมีการเจริญเติบโต เมื่อเทียบความเข้มข้นเกลือน้อยจะโตได้ดีและเร็วกว่าที่ความเข้มข้นเกลือมาก ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 1.0 เปอร์เซนต์ เซลล์แขวนลอยจะเปลี่ยนสี (รูปที่ 28)

การพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอเป็นไมโครแคลลัส (รูปที่ 29) และไม่พบการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ทนเกลือได้แล้วในการเทผสมอาหารแข็งนาน 1.5 เดือน (รูปที่ 30)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 25 บน เมล็ดพันธุ์บาสมาติ 370 สามารถงอกเป็นแคลลัสได้
ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 1.0 เปอร์เซนต์
ล่าง เมล็ดพันธุ์หอมมะลิ สามารถงอกเป็นแคลลัสได้
ในสภาพที่มีเกลือสูงสุด 0.25 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 ผลการเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสภาพที่มีเกลือ

บน บาสมาติ 370

ล่างหอมมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

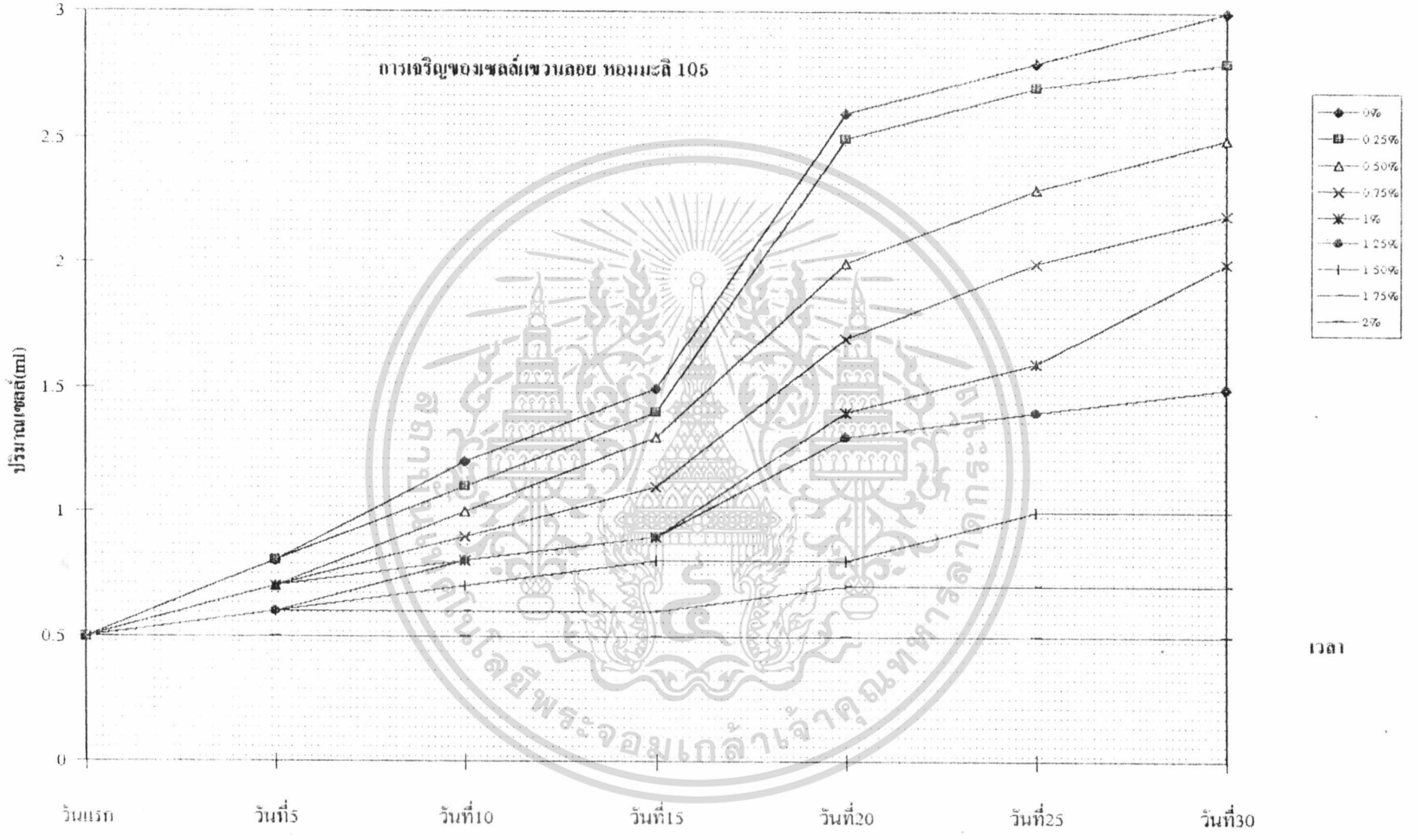
ตารางการเจริญของเซลล์แขวนลอย หอมมะลิ 105

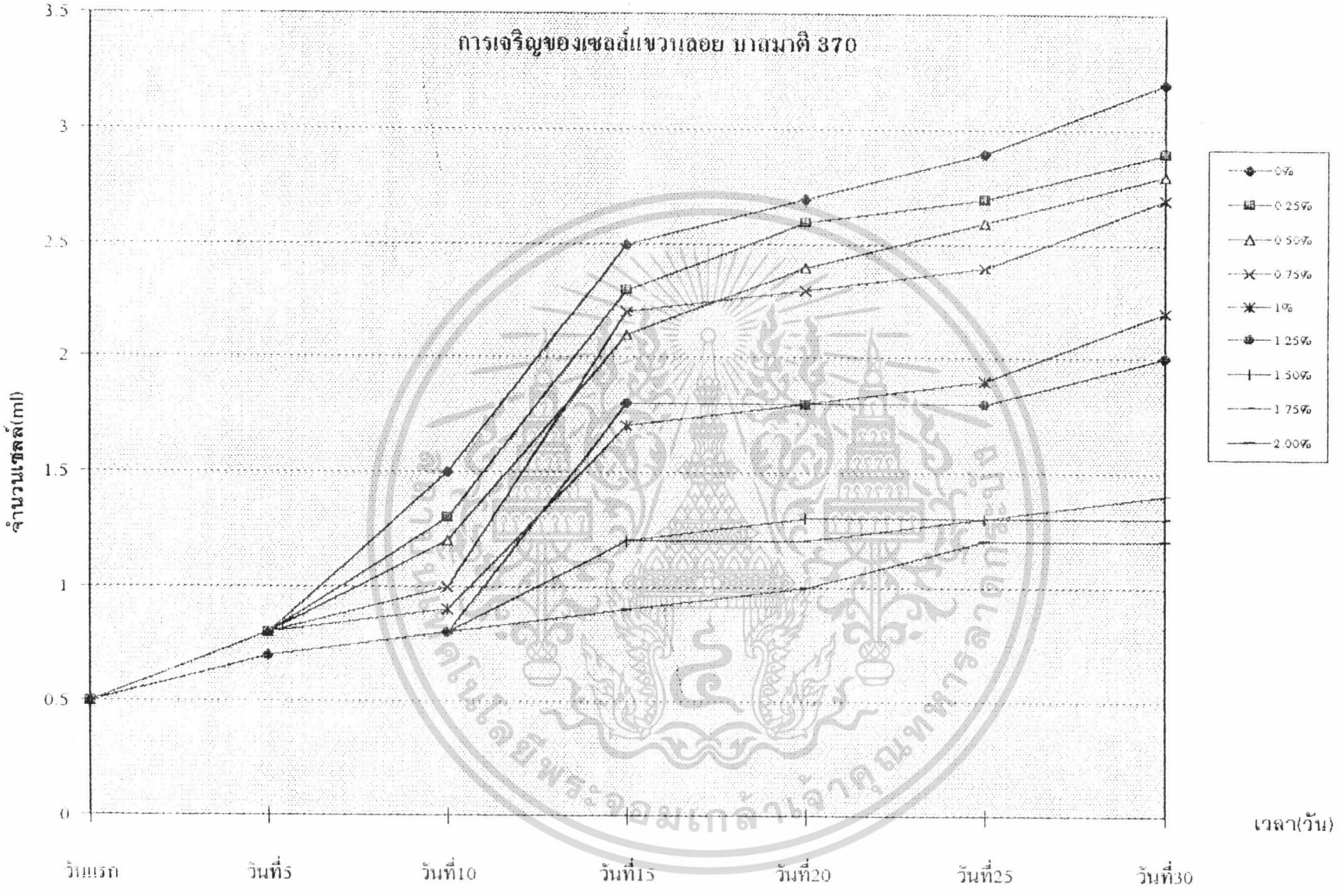
ความเข้มข้น	วันแรก	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 30
เกลือ 0%	0.5	0.8	1.2	1.5	2.6	2.8	3
0.25%	0.5	0.8	1.1	1.4	2.5	2.7	2.8
0.50%	0.5	0.7	1	1	2	2.3	2.5
0.75%	0.5	0.7	0.9	0.9	1.7	2	2.2
1.0%	0.5	0.7	0.8	0.9	1.4	1.6	2
1.25%	0.5	0.6	0.8	0.9	1.3	1.4	1.5
1.5%	0.5	0.6	0.7	0.8	0.8	1	1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

ตารางการเจริญของเซลล์แขวนลอย บาสมาติ 370

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

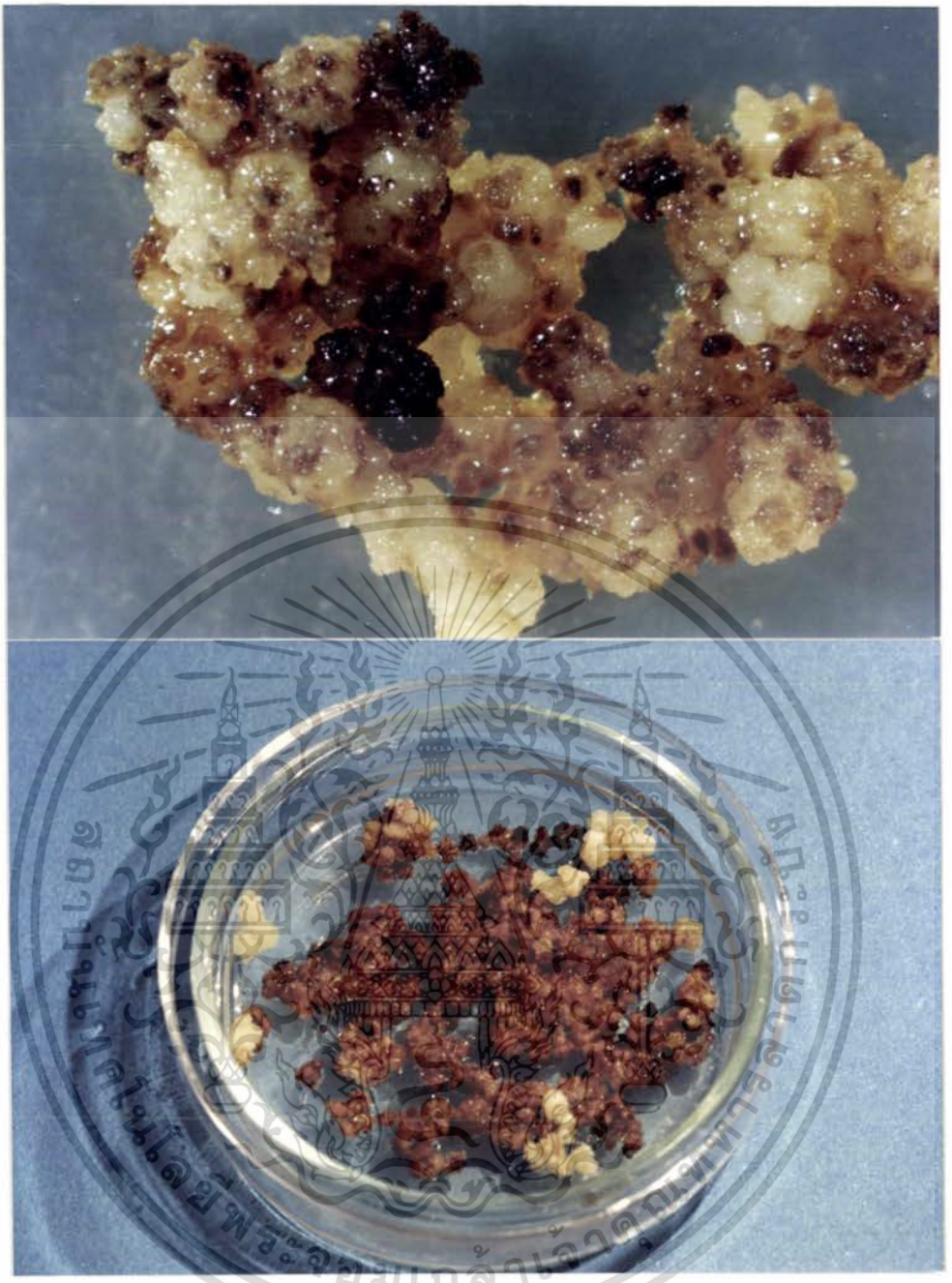
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


การเจริญของเซลล์เชื้อวนลอย ทอมมะติ 105
ปริมาณเซลล์(ml)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
วันแรก
วันที่5
วันที่10
วันที่15
วันที่20
วันที่25
วันที่30
เวลา
0%
0.25%
0.50%
0.75%
1%
1.25%
1.50%
1.75%
2%


การเจริญของเซลล์แขวนลอย บาลมาดี 370
จำนวนเซลล์(ml)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
วันแรก
วันที่5
วันที่10
วันที่15
วันที่20
วันที่25
วันที่30
เวลา(วัน)
0%
0.25%
0.50%
0.75%
1%
1.25%
1.50%
1.75%
2.00%

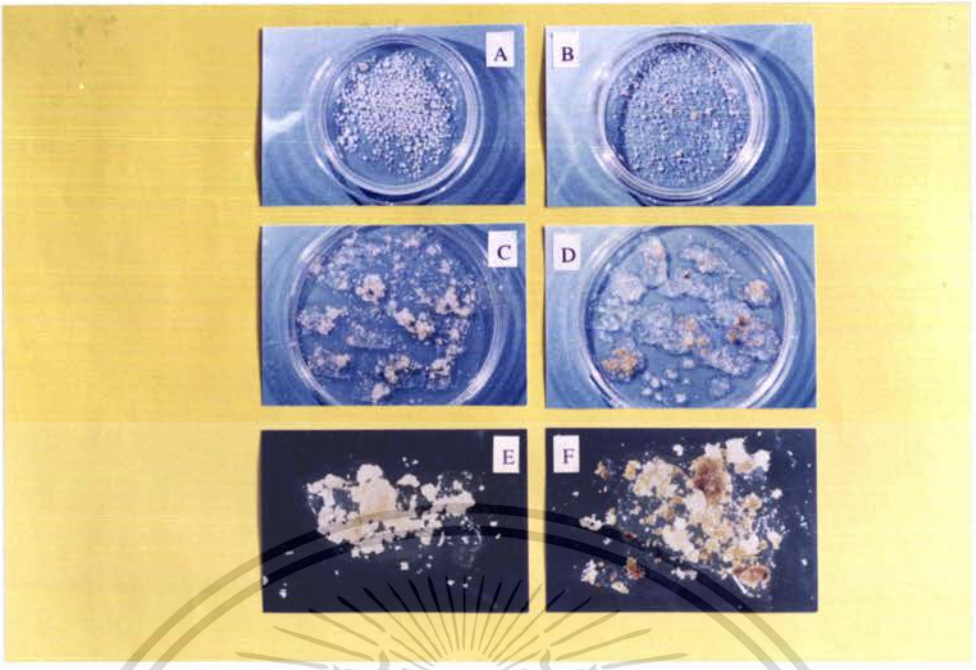
รูปที่ 27 เซลล์แขวนลอยจะเปลี่ยนเป็นสีที่เข้มขึ้นเมื่อเลี้ยงเปลี่ยนอาหาร
ไปเกิน 4 เดือน
ซ้าย บาสมาติ 370 ขวา หอมมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 28 เซลล์แขวนลอยจากการทดลองที่ 2
จะเปลี่ยนสีเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารมีเกลือ
บน บาสมาติ 370 ล่าง หอมมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



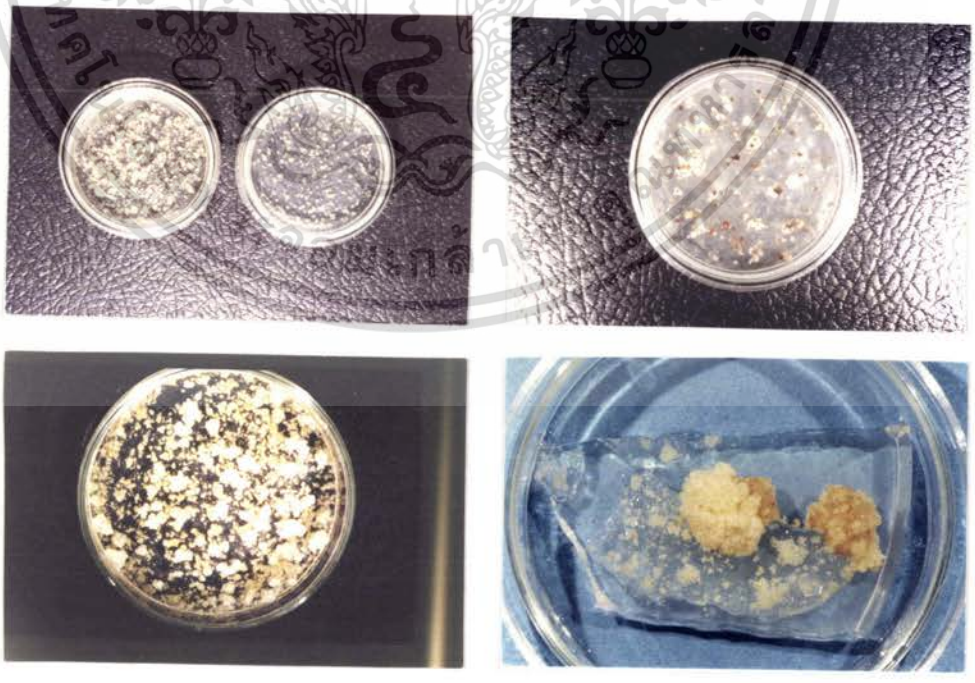
รูปที่ 29 การพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอเป็นไมโครแคลลัส

ซ้าย ACE บาสมาติ 370 ขวา BDF หอมมะลิ 105

A-B เซลล์แขวนลอยผสมอาหารแข็งเลี้ยง 1-2 เดือน

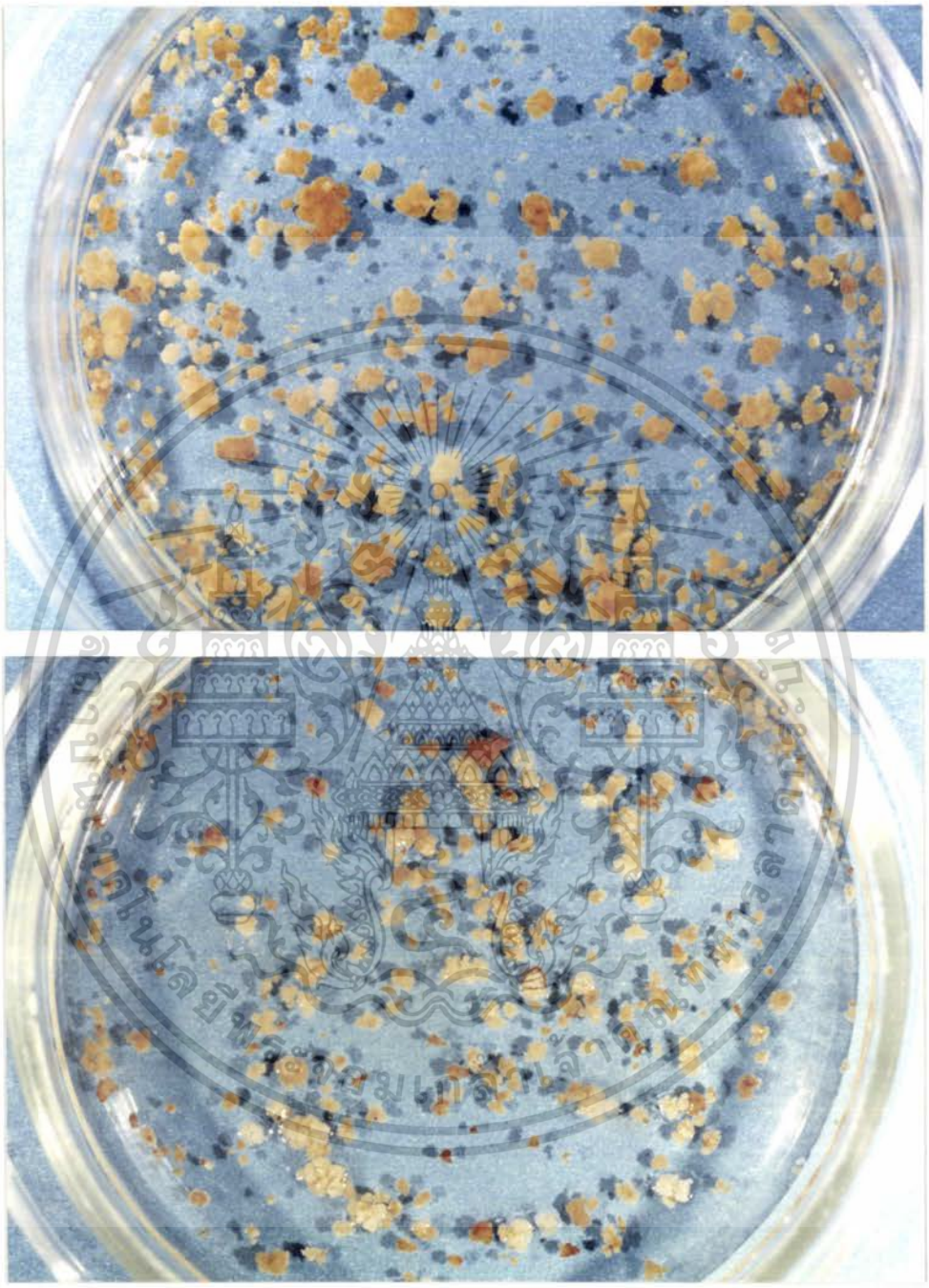
C-D ตัดชิ้นวุ้นวางบนอาหารใหม่

E-F การเจริญดูดจากกล้องสเตริโอ



รูปที่ 29 การพัฒนาของไมโครแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 30 ไม่พบการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ทนเกลือได้แล้วในการเทผสมอาหารแข็ง บน บาสมาติ 370 ล่าง หอมมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3.3 ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสตร์

3.3.1 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลในการเพาะเลี้ยง

ภายใน 5 วันแรกพบการสร้างผนังเซลล์ติดสีย้อม ในวันที่ 5-15 วันยังมีชีวิตติดสีย้อมทุกโปรโตพลาสตร์ในทุกระดับความเข้มข้นเกลือ ในวันที่ 23 พบว่าโปรโตพลาสตร์ที่เจริญเริ่มตาย และในเวลา 1 เดือนไม่พบโปรโตพลาสตร์ที่มีชีวิตเหลืออยู่

การแยกโปรโตพลาสตร์ ได้ผล (รูปที่ 31 - 43)

3.3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสตร์

การพัฒนาของโปรโตพลาสตร์ ได้ผล (รูปที่ 44 - 53)

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

รอผลการทดลอง

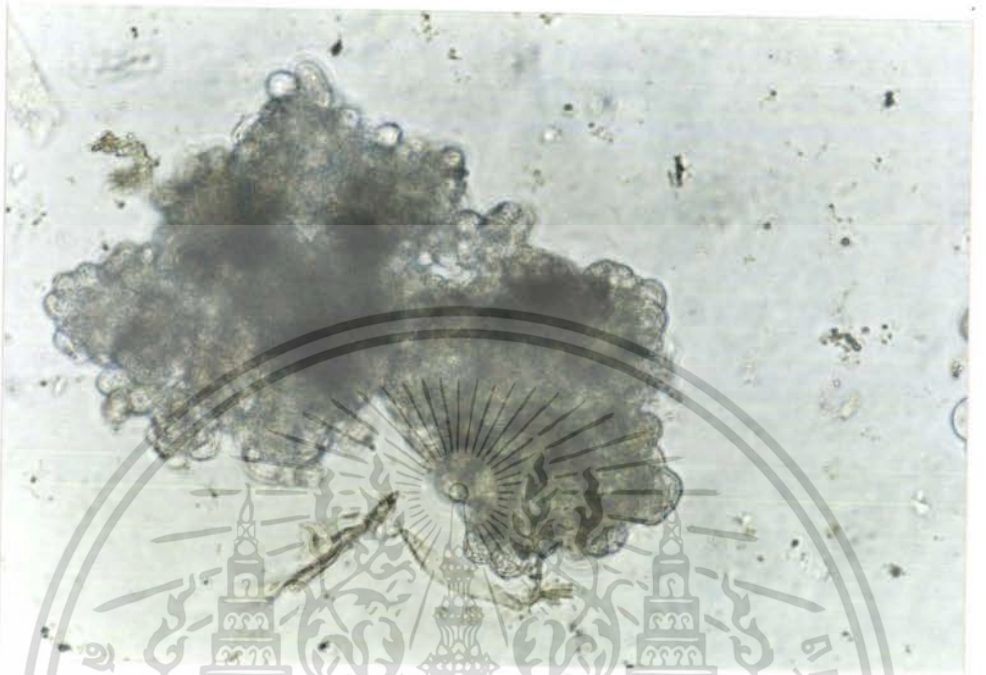
คาดว่า 1. จะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการทดลองที่ 2 ให้เจริญเป็นจุดเขียวได้ในอาหารความเข้มข้นเกลือมากขึ้นกว่าแบบไม่ได้ฉายรังสี

2. เกิดการกลายพันธุ์จากก้อนแคลลัส

3. เซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอจะไม่สามารถพัฒนาเป็นไมโครแคลลัสจากการทำลายคุณสมบัติโดยรังสี เพื่อใช้มันเป็น nurse cell ในการเลี้ยงโปรโตพลาสตร์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอยชนิดนั้นที่ไม่ได้ฉายรังสี ในการเลี้ยงแบบ beat type โดยต้องลองเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกรังสีนั้นที่มีชีวิตอยู่ผสมกับอาหารเพื่อดูการเกิดเป็นไมโครแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการแยกโปรโตพลาสตร์



รูปที่ 31 ก้อนเซลล์แขวนลอยที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสตร์

รูปที่ 32 กลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 33 การตรวจการมีชีวิตเซลล์แขวนลอยด้วยสีย้อม FDA เรืองแสงสีเขียว

รูปที่ 34 การตรวจผนังเซลล์จะติดสีย้อม Colcofluor white

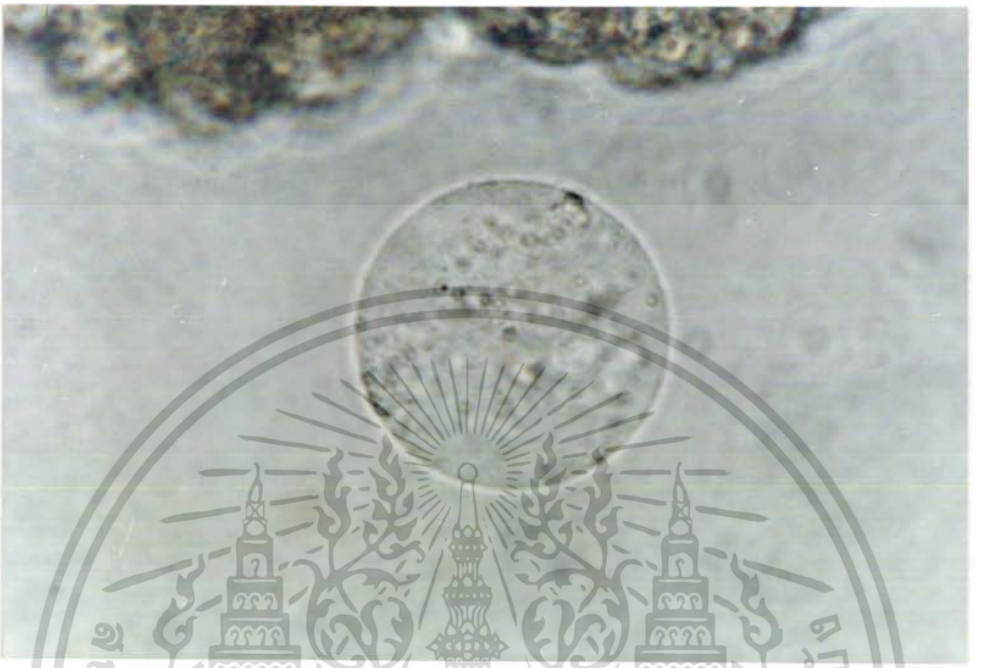
เรืองแสงเป็นสีขาวนวลอมฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

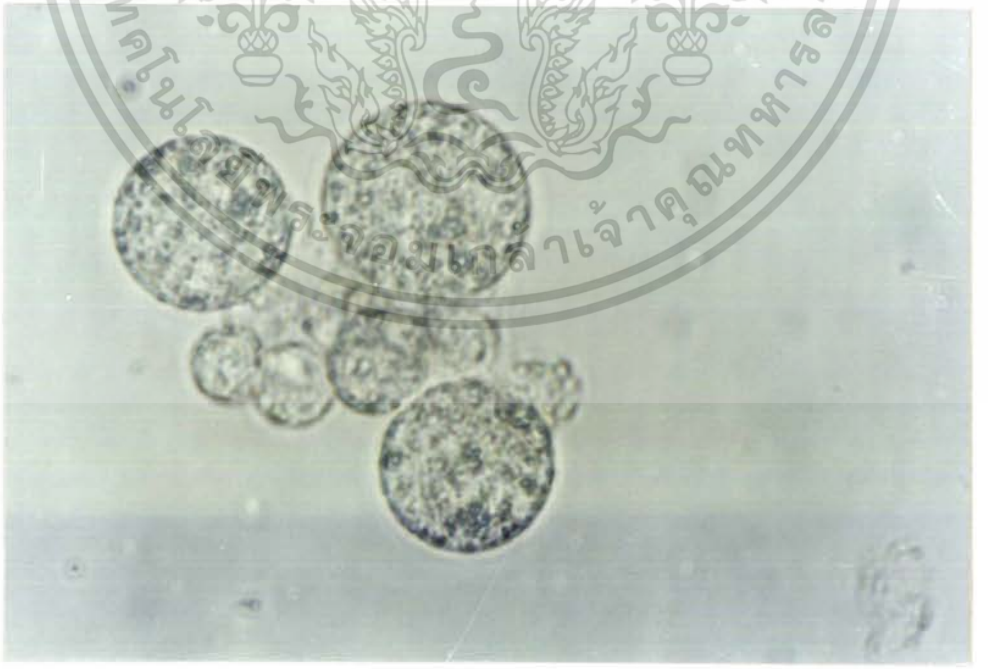
รูปที่ 35 เซลล์แขวนลอยที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ให้โปรโตรพลาสตร์ออกมา

รูปที่ 36 โปรโตพลาสตร์ปนอยู่กับเซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

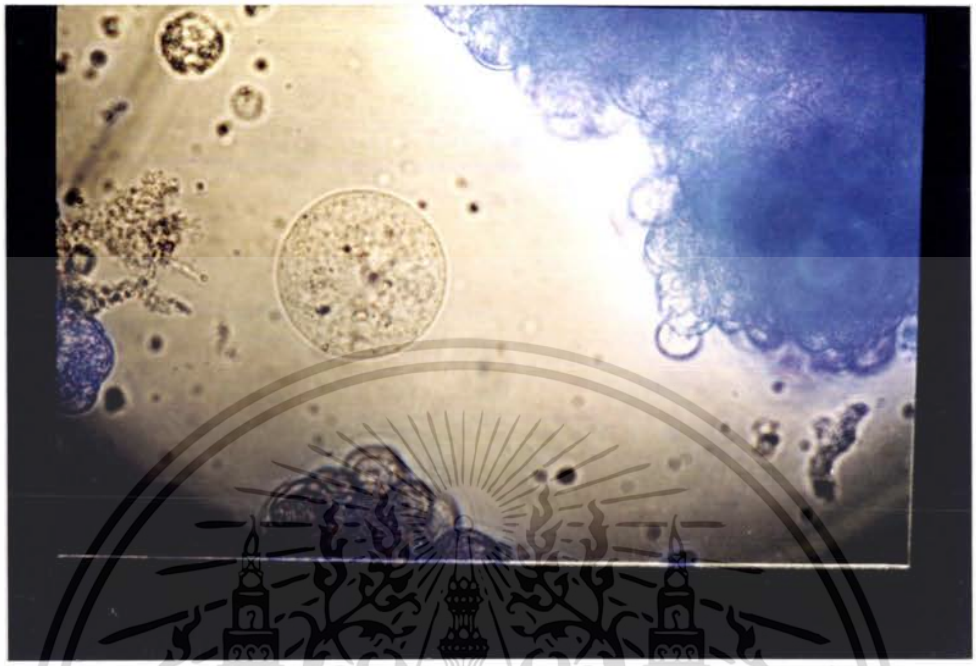


รูปที่ 37 ลักษณะโปรโตพลาสตร์ กำลังขยาย 400 เท่า

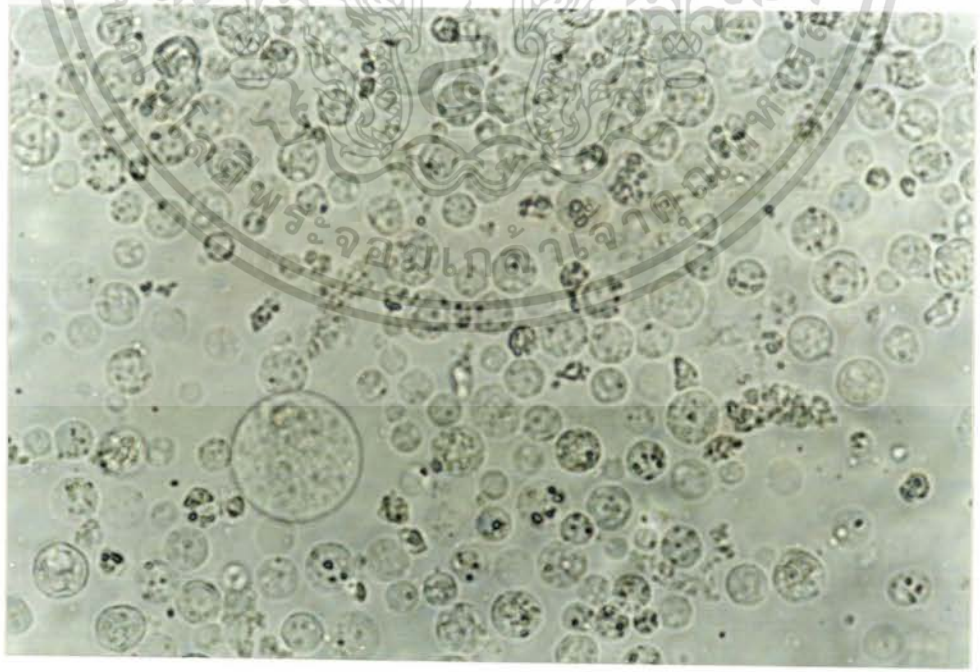


รูปที่ 38 โปรโตพลาสตร์ที่ได้มีหลายขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 39 โปรโตพลาสตร์ที่ถูกย่อยผนังเซลล์จะไม่ติดสีย้อม Colcofluor white



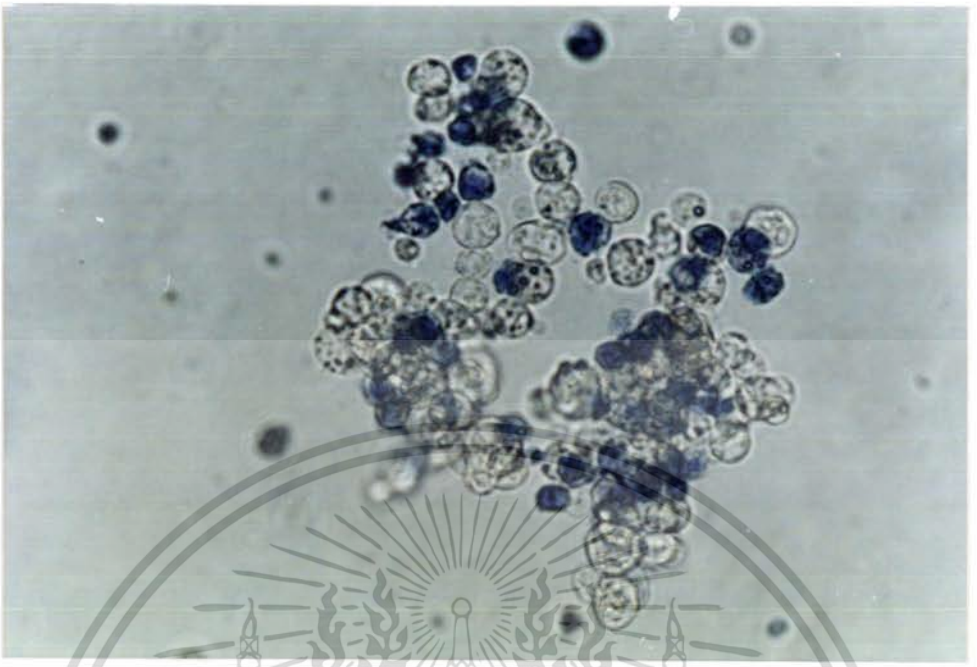
รูปที่ 40 โปรโตพลาสตร์ ที่บริสุทธิ์ ได้จาก band

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 41 โปรโตพลาสตร์ล้างทำความสะอาดน้ำตาล 20 % ออก

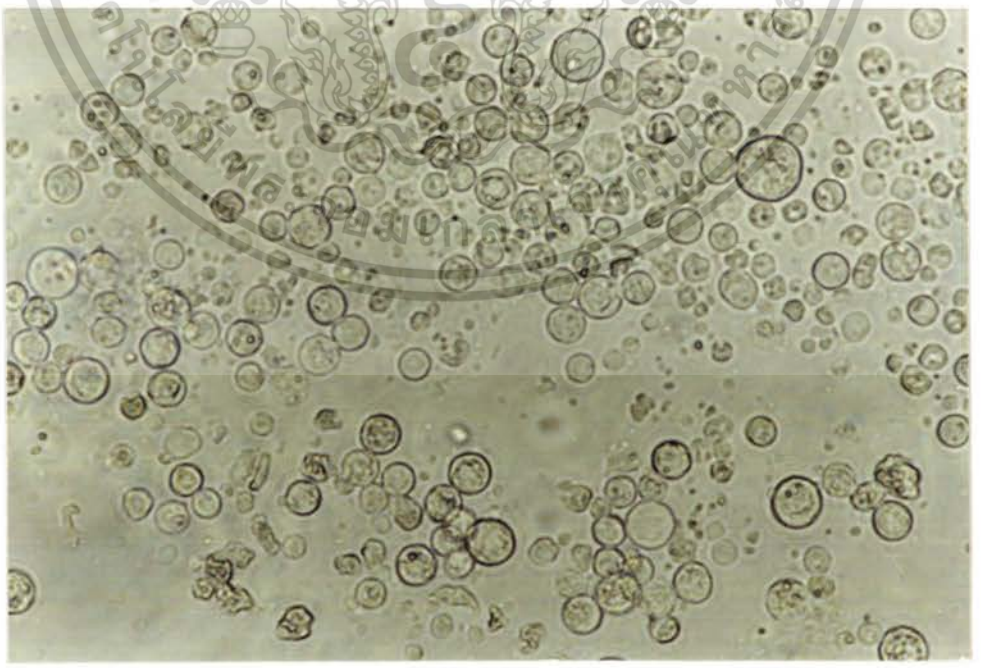
รูปที่ 42 โปรโตพลาสตร์ติดสีย้อม FDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 43 โปรโตพลาสตร์ ที่ไม่มีชีวิตติดสีย้อม evan blue

ผลการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสตร์



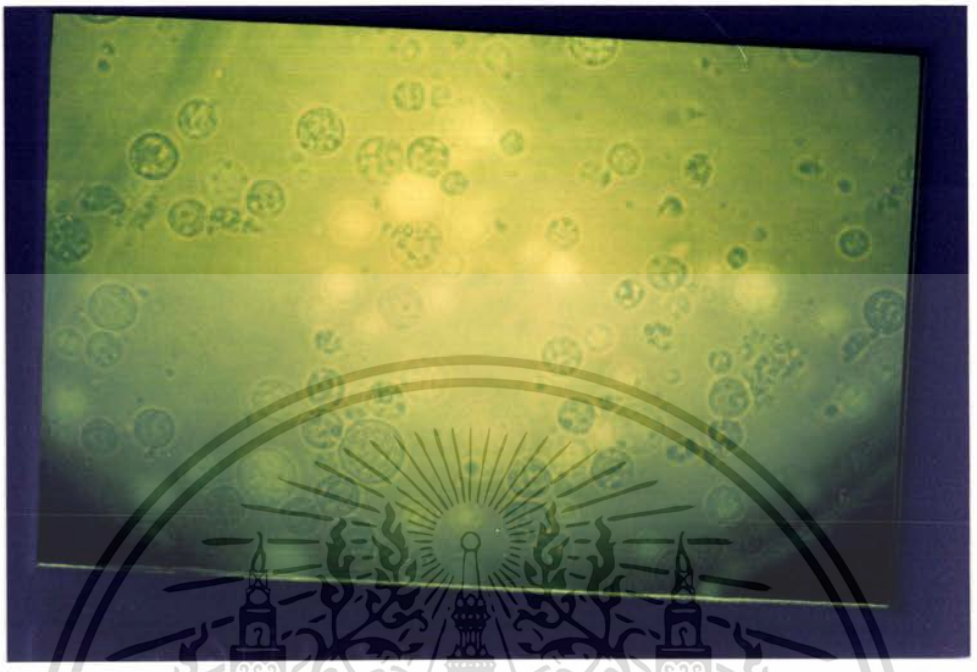
รูปที่ 44 โปรโตพลาสตร์ เริ่มสร้างผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

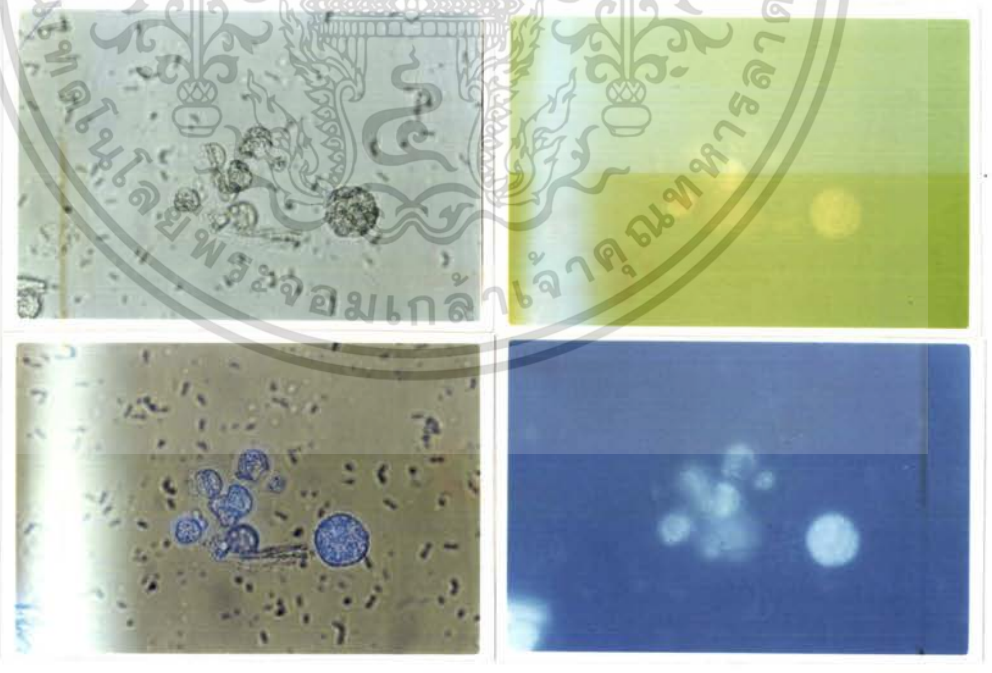
รูปที่ 45 โปรโตพลาสตร์ ที่สร้างผนังเซลล์แล้ว ติดสีย้อม Colcofluor white

รูปที่ 46 โปรโตพลาสตร์ที่รวมกันเป็นกลุ่มที่ปลายหยด วิธีเลี้ยงหยดอาหารเล็กๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

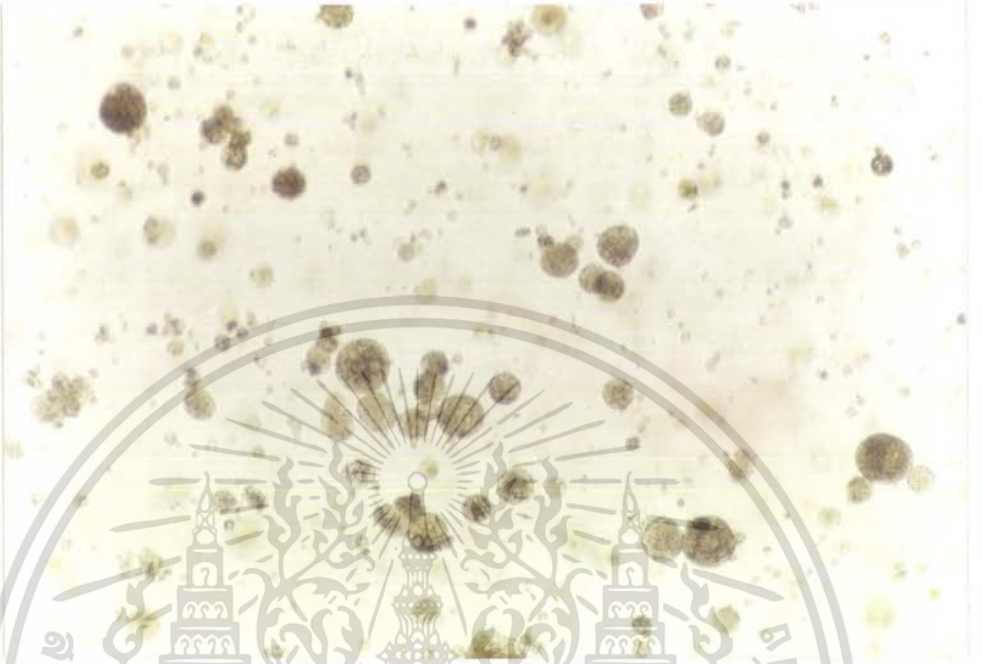


รูปที่ 49 การตรวจการมีชีวิตของโปรโตพลาสตร์ติดสีย้อม FDA
ในการทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ไม่มีชีวิตทั้ง 100 %



รูปที่ 50 การตรวจการมีชีวิตของโปรโตพลาสตร์ที่เจริญขึ้น
ด้วยสีย้อม FDA และ สีย้อม Colcofluor white
ในการทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 51 การพัฒนาของ โปรโตพลาสตร์

รูปที่ 52 โปรโตพลาสตร์ที่แบ่งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 53 โปรโตพลาสตร์ที่พัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์
(แต่ไม่มีชีวิตรอด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญคือ N_6 IAA 2 : BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS IAA 2 : BA 4 ตามลำดับ สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญคือ N_6 BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS NAA 2 : BA 2 ตามลำดับ

การทดลองที่ 2

สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอได้ในระยะเวลา 5-6 เดือน ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถขยายจำนวนและพัฒนาเป็น โปรโตคอร์ม เจริญเป็นรากและยอดเขียวได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง

การทดลองที่ 3

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

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

3.3 โปรโตพลาสตร์ ข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 และหอมมะลิ 105 ให้เจริญ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ ได้ประมาณนาน 20 วัน

การทดลองที่ 4

อยู่ในช่วงรอผลการทดลอง คาดว่าเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการทดลองที่ 2 จะสามารถทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นพพร สายัมพล. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2526. 123 หน้า.

นิตย์ศรี แสงเดือน. พันธุวิศวกรรม. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2533. 346 หน้า.

บุญยืน กิจวิจารณ์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2528. 165 หน้า

ประพาส วีระแพทย์. ความรู้เรื่องข้าว. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ. 2531. 108 หน้า.

ประภา ศรีพิจิตต์. "การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์" เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง. หน้า 17-28. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2536.

ประสาทพร สมิตะมาน. โปรโตพลาสต์เทคนิคการเลี้ยงและการประยุกต์ใช้. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2528. 124 หน้า.

พรทิพย์ ธนูทอง. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2528. 144 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเสิศวัฒนา. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2524. 118 หน้า.

วาสนา พลารักษ์. ข้าว. ภาควิชาพืชศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2523. 76 หน้า

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. "การเพาะเลี้ยงเซลล์" เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง หน้า 12-16. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2536.

เอื้อพร ไชยวรรณ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร. ภาควิชาเภสัชเวท, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2531. 115 หน้า.

ประภา ศรีพิจิตต์ และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม " การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม *(Oryza sativa L.)* พันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 "
วนเกษตรศาสตร์ (วิทย) 28 27 (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เผดิม ระติสุนทร " การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ "วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย)
27:278-255(2536)

สิรนุช ลามศรีจันทร์ "การกลายพันธุ์ของพืช" ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป,
คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2536 196 หน้า

Chowdhry, C.N., A.K. Tyagi, N. Maheshwari and S.C. Maheshwari. "Effect of L-proline and L-tryptophan on Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169.)" Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32. (1993) : 357-361

Cho.M.S. and F.J.Zapata. "Callus Formation and Plant Regeneration in Isolated Pollen Culture of Rice (*Oryza sativa* L.cv. Taipei 309)". Plant sciene. 58 (1988) : 239-244.

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

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. 6. (1987) : 294-296.

Wang Dayuan, P. D.Miller, and M. R. Sondahl. "Plant regeneration from protoplasts of Indica type rice and CMS rice". Plant Cell Report. 8. (1989) : 329-332.

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

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

G.C. Ghosh Biswas,P.K.Burkhardt,J.Wunn,A.Klotı,I.Potrykus " Fertile indica rice plant regenerated from protoplasts isolated from scutellar tissue of immature embryos Plant Cell Report. 32. (1994) 528-532.

P Sathish "Rice anther culture: callua initiation and androclonal variation in progenic of regenerate plant" Plant Cell Report. (1995) 14: 432-436

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R.K. Jain " An improved procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts" Plant Cell Report. (1995) 14:515-519

Clyde Wilson " Salt-induced Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato" Plant Science 107 (1995)147-157.

Ann Moons "Molecular and Physiological Rasponses to Abscisic Acid and Salt in Root of Salt-Sensitive and Salt-Tolerent Indica Rice Varieties" Plant physiol. (1995) 107:177-186.

Hiroyuki Fukuoka "Molecular changes of organelle DNA sequences in rice through dedifferentiation, long-term culture, or the morphogenesis process" Plant Molecular Biology 26. 899-907,1994.

S.Sabbah "Methylation of DNA in NaCl-adapted cell of patato" Plant Cell Report. (1995) 14:467-470.

Yuichi Takeuchi "Peroxidation of lipid and growth inhibition induced by UV-B irradiation" Plant Cell Report. (1995)14:566-570.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัชรี วิมลมาศ และ แสงทอง " การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวจากเซลล์แขวนลอย" รายงานวิทยาศาสตร์บันทิต สจล. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ 2537

ชาญวิทย์ "การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ" วิทยานิพนธ์ ม.เกษตรศาสตร์ สาขาพืชไร่ 2537

พรรณี "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 โดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ" วิทยานิพนธ์ ม.เกษตรศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การตรวจความมีชีวิตของเซลด้วย FDA (fluorescein diacetate)

- เตรียม stock solution โดยใช้ FDA 5 mg/ ml acetone แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

- ใช้ FDA stock จำนวน 0.5 ml ผสมกับ culture medium (ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ หรือ โปรโตพลาสต์) จำนวน 24.5 ml จะได้ความเข้มข้น 0.01 %

- หยดเซลล์ หรือ protoplast suspention 1 หยด บน slide แล้วหยด 0.01 % FDA 1 หยด ผสมกัน รอประมาณ 5 นาที

- ตรวจดูด้วยกล้อง fluorescence microscope ถ้ามีชีวิตจะเรืองแสงสีเขียวน้ำเงิน

การตรวจความมีชีวิตของเซลด้วย Evan's blue

- เตรียมสี Evan's blue 0.025% และ phenosaffranin 0.1% โดยละลายในอาหารเพาะเลี้ยง

- หยดสี 1 หยด ผสมกับตัวอย่าง 1 หยด ลงบนกระจกสไลด์ ปิดด้วย cover slip

- ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วทำการล้างด้วย สารละลายอาหาร 2 ครั้ง

- นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะติดสีชัดเจน

การตรวจสอบ cell wall ของโปรโตพลาสตร์

- เตรียม stock solution โดยใช้ calcofluor white 0.001 ละลายในอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสตร์ จำนวน 1 mg

- ก่อนใช้เจือจาง stock solution 0.1 ml ผสมกับอาหาร 1 ml

- ใช้ pasteur pipette ดูดโปรโตพลาสตร์เล็กน้อย ใส่ลงในสารละลาย จำนวนเท่ากัน (มักใช้เพียง 1-2 หยดๆลงบน glass slide ไม่ต้องใส่ cover glass)

- หลังจากทิ้งไว้ 1-2 นาที นำไปตรวจดูด้วยกล้อง fluorescence ถ้ายังมีผนังเซลล์จะมองเห็นเรืองแสงสีขาวนวลโดยรอบ

- อนึ่งในการแยกโปรโตรพลาสตร์ ถ้าหากเห็นรูปร่างกลม (spherical) แสดงว่าไม่มีผนังเซลล์แล้ว การตรวจสอบนี้เป็นการยืนยันอีกทีหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 สารเคมีในอาหารสูตร Kao และ Michayluk (KM-8P) (1975) ดัดแปลงที่ใช้ในการทดลองนี้

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutrients	
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
NH_4NO_3	600
$MgSO_4 7H_2O$	300
$CaCl_2 6H_2O$	600
KCl	300
Micronutrients	
$MnSO_4 H_2O$	10
$ZnSO_4 7H_2O$	2
H_3BO_3	0.025
$CuSO_4 5H_2O$	0.250
$Na_2MnO_4 2H_2O$	0.025
KI	0.750
Vitamins	
thiamine.HCl	1
pyridoxine.HCl	1
nicotinamind	1
D-Pantothenic acid Ca-Salt	1
Biotin	0.01
Chlorine chloride	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Riboflavin	0.2
L-Ascobic acid	2
Vitamin B_{12}	0.02

Organic acids	
Citri acid	40
Malic acid	40
Fumalic acid	40

Sugar and Analogs	
sucrose	250
glucose	68400
frutose	250
ribose	250
xylose	250
mannose	250
rhamnose	250
cellobiose	250
sorbitol	250
manital	250
myo-inositol	100

Nucleic acid basas	
adenine	0.1
guanine	0.03
thymine	0.03
uracil	0.03
hypoxanthine	0.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

xanthine	0.03
Amino acid	
glutamine	5.6
alanine	0.6
cysteine	0.2
glycine	0.1
Phytohormone	
2,4-D	0.5
PH	5.8

ตารางผนวกที่ 2 สารเคมีในอาหารสูตร Kao และ Michayluk(1975) KM -8P

สาเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Maoronutrients	
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
NH_4N_3	600
$MgSO_4 7H_2O$	300
CaCl2.2H2O	600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KCl	300
Micronutrients	
MnSO4.H2O	10
ZnSO4.7H2O	2
H3BO3	3
CuSO4.5H2O	0.025
$Na_2MnO_42H_2O$	0.025
CoCl2.6H2O	0.025
KI	0.750
Vitamins	
thiamine.HCl	1
pyridoxine.HCl	1
nicotinamide	1
D-Ca	1
Pantothenate	
Folic acid	0.4
Aminobenzoate	0.02
Biotin	0.01
Chlorine chloride	1
Riboflavin	0.2
Ascorbic acid	2
Vitamin A	0.01
Vitamin D3	0.01
Vitamin B12	0.02
Organic acids	
Na-pyruvate	20
Citric acid	40
Malic acid	40
Fumaric acid	40
Sugar and Analogs	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sucros e	250
glucos e	68400
fructos e	250
ribose	250
xylose	250
manno e	250
rhamnose	250
cellobiose	250
sorbito l	250
manito l	250
myo-inositol	100
Nucleic acid bases	
adenin e	0.1
guanie e	0.03
thymin e	0.03
uracil	0.03
hypoxanthine	0.03
xanthi ne	0.03
Amino Acids	
glutamine	5.6
alanine	0.6
glutamate	0.6
cystein e	0.2
aspartic acid	0.1
arginin e	0.1
glycine	0.1
Phytohormone	
2,4-D	0.5
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 สารเคมีในสูตรอาหาร Cu และคณะ (1975) (N_6)

สารเคมี	ความเข้มข้น mg/l
Macronutrients	
KH2PO4	400
KNO3	2830
(NH4)2SO4	463
MgSO4.7H2O	185
CaCl2.2H2O	166
FeSO4.7H2O	27.8
Na.EDTA	37.3
Micronutrients	
MnSO4.H2O	3.3
ZnSO4.7H2O	1.5
H3BO3	1.6
KI	0.83
Vitamins	
nicotinic acid	0.5
thiamine.HCl	1
pyridoxine.HCl	0.5
Sugars	
sucrose	30000
Amino acid	
glycine	2
Phytohormone	
2,4-D	2
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 สารเคมีในสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) MS

สารเคมี	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อลิตร
Macronutrients	
$NH4NO_3$	1650
KNO3	1900
CaCl2.2H2O	440
MgSO4.7H2O	370
KH2PO4	170
Micronutrients	
H3BO3	6.2
MnSO4.H2O	6.9
ZnSO4.H2O	6.14
KI	0.83
NaMoO4.2H2O	0.25
CuSO4.5H2O	0.025
CoCl2.6H2O	0.025
Iron Na- EDTA	37.25
FeSO4.7H2O	27.85
Oganic acid	
glycine	2
nicotinic acid	0.5
pyridoxine	0.5
thiamine	0.1
myo-inositol	100
Sugars	
sucrose	30000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phytohormone	
2,4-D	
NAA	
KI	
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 สารละลายสูตร CPW ที่ใช้ล้างโปรโตพลาสต์ Frearson และคณะ (1973)

สารเคมี	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อลิตร
KH2PO4	27.2
KNO3	101
CaCl2.2H2O	1480
MgSO4.7H2O	246
KI	0.16
CuSO4.5H2O	0.025
MES	1013
Manitol	109200
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 สูตรสารละลายเอนไซม์ ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ Frearson และคณะ (1973)

สารเคมี	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อลิตร
KH2PO4	27.2
KNO3	101
CaCl2.2H2O	1480
MgSO4.7H2O	246
KI	0.16
CuSO4.5H2O	0.025
MES	1013
Manitol	109200
Marcerozyme (%)	0.5, 1
Cellulase (%)	1, 2, 3
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการเตรียม Stork สูตรอาหาร N_6

N_6 medium (Chu medium)

	compenent	concentrate		stork (gm)			use
		mg/l		1 L 1000 ml	1/2 L 500 ml	1/10 L 100 ml	
I	$(NH_4)SO$	463	50X	23.15	11.575		20 ml/L
	KNO	2830		141.50	70.575		
	KHPO	400		20.00	10		
	MgSO7HO	185		9.25	4.625		
II	CaCl2HO	166	100X	16.600	8.3		10 ml/L
III	MnSO2HO	3.33	500X	1.665		0.1665	2 ml/L
	ZnSOHO	1.50		0.750		0.075	
	HBO	1.60		0.800		0.080	
	KI	0.83		0.415		0.0415	
IV	NaEDTA	37.30	100X	3.73	1.86		10 ml/L
	FeSOHO	2.78		2.75	1.39		
V	glycine	2.00	500X	1.00		0.05	2 ml/L
	thiamine-HCl	1.00		0.50		0.05	
	pyridoxine-HCl	0.50		0.250		0.0125	
	nicotinic acid	0.50		0.250		0.0125	
	agar	0.7-0.8 %		7 - 8 g			
	agarose	0.65 %		6.5 g			
	phytagel	0.27 %		2.7 g			
	sucrose	2-3 %		20 - 30 g			
	PH = 5.8						

Add 2,4-D 2 mg/l L-proline 1 g/l

casine hydrolysate 0.1 g/l

myo-inositol 0.1 g/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้