สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระบบการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของข้าวโพดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

น.ส.จารุวรรณ คงทรัตน์ รหัส 37054308
น.ส.นฤมล มงคลธนวัฒน์ รหัส 37054326

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา 2540

ปพ.
จ3375
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30606
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Regeneration system in corn (Zea may L.) by tissue culture

Miss Jaruwan Kongtarat code 37054308

Miss Narumon Mongklontanawat code 37054326

A Special Project Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement for

the Requirement for the degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ : ระบบการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของข้าวโพดโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Regeneration system in corn (Zea may L.) by tissue culture

โดย : น.ส.จารุวรรณ คงทรัตน์ รหัส 37054308

: น.ส.นฤมล มงคลธนวัฒน์ รหัส 37054326

ภาควิชา : ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

..... กรรมการ

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

..... กรรมการ

(อ.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ : ระบบการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของข้าวโพดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย : น.ส.จารุวรรณ ดงทรัตน์ รหัส 37054308

: น.ส.นฤมล มงคลธนวัฒน์ รหัส 37054326

ภาควิชา : ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ปีการศึกษา : 2540

บทคัดย่อ

ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท สุวรรณ 3 และ สุวรรณ 5 พบว่าอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

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

เมื่อทำการหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2-16 6-14 และ 4-16 วัน ในพันธุ์ซุปเปอร์สวีท สุวรรณ 3 และสุวรรณ 5 ตามลำดับ และในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอยพันธุ์สุวรรณ 3 และ แคลลัสซุปเปอร์สวีท พบว่าระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ และ อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนส เป็น 1.5:0.5 ที่เวลา 6 ชั่วโมงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ เพื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NBR ซึ่งปรากฏว่าโปรโตพลาสต์มีการแบ่งตัวและสร้างผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : Regeneration system in corn (Zea may L.) by tissue culture

Name : Miss Jaruwan Kongtarat code 37054308

Miss Narumon Mongklontanawat code 37054326

Special Project Advisor : Anurug Poeaim

Department : Applied Biology

Academie year : 1997

Abstract

Embryos of Supersweet Suwan 3 and Suwan 5 were cultured on N_6 medium supplement of 2,4-D 2 mg/l NAA 1 mg/l BA 1 mg/l and Kinetin 1 mg/l suitable to used for callus initiation from immature embryos.

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

Growth curve was established from Supersweet to select the optimal stage at 6-18 days Suwan 3 to select the optimal stage at 8-16 days and Suwan 5 to select the optimal stage at 10-16 days for cell active in N_6 medium containing 2,4-D 2 mg/l NAA 1 mg/l by cell fresh weight and cell dry weight method.

Condition was developed for isolated protoplasts from cell suspention of Suwan 3 and calli of Supersweet. The enzyme ratio between cellulase and pectinase 1.5:0.5 and mannitol 0.6 M at digestion period 6 hours was the suitable condition for protoplast isolated fom cell suspention of Suwan 3 and calli of Supersweet.

Protoplast from cell suspension of Suwan 3 and calli of Supersweet were cultured in NBR medium. Cell wall was completely divided within 1-2 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความรู้ และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อการทำโครงงานพิเศษ อีกทั้งยังช่วยกรุณาแนะนำ และจัดหาเอกสารประกอบโครงงานพิเศษ สารเคมีที่จำเป็น อุปกรณ์ที่ต้องใช้เครื่องคอมพิวเตอร์และสถานที่สำหรับพิมพ์รูปเล่ม นอกจากนี้ยังได้กรุณาสละเวลาเพื่อช่วยแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์และประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เนาวรัตน์ ปานแย้ม กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขโครงงานพิเศษด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่ให้ความกรุณาอำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่ อาหาร ตลอดจนช่วยให้โครงงานนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุดนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
-วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	19
-วัสดุและอุปกรณ์ที่จำเป็น	19
-ขั้นตอนการดำเนินงาน	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	63
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้เพาะเลี้ยงคัพภะให้เป็นแคลลัส	22
ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของไมโครแคลลัส	25
ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3	40
ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท	43
ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ5	46
ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย ของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3	55
ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของ ข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงเซลล์ที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ 29

รูปที่ 2 แสดงการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที 30

รูปที่ 3 ลักษณะคัพภะของข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 32

รูปที่ 4 ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาจากคัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 33

รูปที่ 5 ลักษณะของแคลลัสชนิด compact callus และ friable callus 34

รูปที่ 6 ลักษณะการพัฒนาของแคลลัสโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ 35

รูปที่ 7 ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในขวดรูปชมพู่ 37

รูปที่ 8 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ 38

รูปที่ 9 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA 39

รูปที่ 10 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 โดยการหาน้ำหนักสด 41

รูปที่ 11 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 โดยการหาน้ำหนักแห้ง 42

รูปที่ 12 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีทโดยการหาน้ำหนักสด 44

รูปที่ 13 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท โดยการหาน้ำหนักแห้ง 45

รูปที่ 14 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ5 โดยการหาน้ำหนักสด 47

รูปที่ 15 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ5 โดยการหาน้ำหนักแห้ง 48

รูปที่ 16 ลักษณะของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 50

รูปที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญของไมโครแคลลัสเมื่อเลี้ยงในอาหาร R_2 และ N_6ที่ประกอบด้วยมอลโตส 51

รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของไมโครแคลลัสเมื่อเลี้ยงในอาหาร NBR ที่ประกอบด้วย NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และ NBR ที่ประกอบด้วย NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร 52

รูปที่ 19 ลักษณะการพัฒนาของไมโครแคลลัสเพื่อจะเจริญเป็นต้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ 53

รูปที่ 20 แถบของโปรโตพลาสต์ที่ได้หลังจากการแยกด้วยสารละลายซูโครส 20% 57

รูปที่ 21 แสดงโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อด้วย FDA 58

รูปที่ 22 แสดงการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร NBR สูตรต่าง ๆ 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 23 แสดงการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 1-2 วัน 60
รูปที่ 24 แสดงการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 2 วัน 61
รูปที่ 25 แสดงการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 14 วัน 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวโพด (Zea mays L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญ รองจากข้าวสาลีและข้าว ข้าวโพดมีคุณค่าทางอาหารสูง จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อาหารสัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ จากความสำคัญดังกล่าว จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีคุณภาพดี ผลผลิตสูงขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อม และต้านทานต่อโรค โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งจะช่วยลดปัญหาต่าง ๆ ทั้งด้านเวลา แรงงาน ทุนทรัพย์ และข้อจำกัดในการผสมพันธุ์อื่นๆ สำหรับส่วนต่างๆของข้าวโพดที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ เอนโดสเปิร์ม ข้อ ปลายราก ละอองเรณู เอมบริโอ อับเรณู เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติของโปรโตพลาสต์ พบว่ามีความสำคัญเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การรวมกันของโปรโตพลาสต์ของพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีตาม การย้ายสารพันธุกรรม หรือ ออร์แกนเนลล์ เข้าไปในโปรโตพลาสต์ จากความสำคัญดังกล่าวจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงเทคนิคขั้นพื้นฐานต่าง ๆ รวมถึงการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ และวิธีเกี่ยวกับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดก่อนที่จะศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์โครงงานพิเศษ

1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของคัพภะเป็นแคลลัสของข้าวโพด

2 ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด

3 หากราฟการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด

4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

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

ใบประกอบด้วยกาบใบทำหน้าที่หุ้มตาและลำต้น ใบเป็นแผ่นเรียวยาวประมาณ 80 เซนติเมตร มีเยื่อกันน้ำเป็นแผ่นบางอยู่ตรงรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ หูใบเกิดที่ฐานของใบทั้งสองข้าง ข้าวโพดเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้เกิดจากตายอดของลำต้น ส่วนช่อดอกตัวเมียหรือฝักเกิดจากตาบริเวณซอกใบประมาณข้อที่เจ็ดนับจากใบธงลงมา ตามซอกใบมี prophyllum หุ้มอยู่ prophyllum ต่างจากใบธรรมดาคือมีเส้น 2 เส้น ตาที่เจริญเป็นฝักเมื่อยังอ่อนอยู่เหมือนตาที่เจริญเป็นแขนง แต่ต่อมา prophyllum ของตาฝักจะเจริญต่อไปและเจริญเป็นฝักอ่อน สำหรับก้านฝักจะไม่ยืดตัวทำให้ใบที่เกิดขึ้นมีแต่ก้านใบกลายเป็นเปลือกหุ้มฝัก (กรมวิชาการเกษตร , 2524 ; ประภา , 2527 ; ทรงเชาว์ 2531)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคที่นำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ตั้งแต่ในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ หรือโปรโตพลาสต์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารที่พืชต้องการครบทุกอย่าง น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น

ส่วนต่างๆของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ ปลายยอด ปลายราก เนื้อเยื่อเจริญ ใบเมล็ด คัพภะ อับละอองเกสร รังไข่ โปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการรายงานของทนง (2525) และอังคณา(2528) ได้ทดลองนำส่วนข้อปลายราก แผ่นใบและกาบใบที่ยังม้วนอยู่ของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีทและพันธุ์สุวรรณ 1 เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D (4.524-13.572 ไมโครโมล) พบว่าข้อและปลายรากเท่านั้นที่เกิดแคลลัส และเป็นแบบเซลล์เกาะกันหลวมๆ ส่วนแผ่นใบและกาบใบที่ยังม้วนอยู่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

Green และ Philip (1975) ใช้คัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ A-188 สามารถชักนำให้เป็นแคลลัส และชักนำต่อให้เป็นต้นข้าวโพดได้สำเร็จเป็นครั้งแรก Armstrong และ Green (1985) กับ Duncan และ Widholm (1987) รายงานว่า แอลโพรลีนมีผลต่อการเลี้ยงและการเจริญเติบโตเป็นต้นข้าวโพด Duncan และคณะ (1985) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตรที่ได้จากการเลี้ยงคัพภะอ่อนและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

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

อังคณา (2528) รายงานว่าในการเลี้ยงคัพภะข้าวโพดสามารถชักนำแคลลัสชนิดเซลล์เกาะกันแน่น ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ส่วนกอบเกียรติ (2532) ได้ทดลองเลี้ยงคัพภะข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 บนอาหารสูตร MS พบว่าเมื่อใช้ 2,4-D 9.048 ไมโครโมล น้ำตาลซูโครส 2-4 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในสภาพมืดตลอดเวลา สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีจากรายงานของ Green และ Philip (1975) พบว่าคัพภะข้าวโพดอายุ 16-20 วัน หลังถ่ายละอองเรณูสามารถชักนำให้ส่วน เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 9.048 ไมโครโมล ไกลซีน 7.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เอสพาราจีน 1.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนอาซีน 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไพริดอกซิน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมแพนโททีเนต 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Vasil และคณะ (1983;1984)ได้ทดลองเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2.262-4.524 ไมโครโมล น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ส่วนของมีโซคอททิล เกิดแคลลัสได้และเมื่อย้ายลงบนอาหารที่มี 2,4-D 4.524 ไมโครโมล เคซีนไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือย้ายลงบนอาหารที่ปราศจาก 2,4-D สามารถชัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำให้เกิดต้นได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Goble และคณะ(1986) พบว่าคัพภะข้าวโพดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D 2.262 ไมโครโมล น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

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

Imbrie - Milligan และ Hodes (1986) และ Imbrie - Milligan และคณะ (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสที่พัฒนามาจากคัพภะ ซึ่งได้มาจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม A188 ในอาหารที่ประกอบด้วย เคซีนไฮโดรไลเซท น้ำมะพร้าว กรดอะมิโน น้ำตาล ไฟโตฮอร์โมน ไนเตรต แคลเซียม และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยนำแคลลัสมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ นำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร NN67 ดัดแปลง โดยวิธีชั้นเซลล์พี่เลี้ยง (feeder layer) และเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cell) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

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

Vasil และ Vasil (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ Dekalb XL 82 โดยนำเซลล์แขวนลอยมาย่อยด้วยสารละลาย เอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 3 เปอร์เซ็นต์ และ pectinase serva 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย $CaCl_2$ $2H_2O$ 7 มิลลิโมลาร์ 0.7 มิลลิโมลาร์ $NaH_2PO_4.H_2O$ แมนนิทอล 0.5 โมลลาร์ และ MES 3 มิลิโมล ที่ pH 5-6 จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1-3x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM ดัดแปลงในที่มืด สามารถชักนำให้เกิดเป็นโซมาติกเอมบริโอได้

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

Rhodes และ คณะ (1988) ได้ศึกษาการเจริญเป็นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากการเลี้ยงคัพภะของข้าวโพด พบว่าการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้ผลดีเมื่อเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อโดยใช้โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจากคัพภะและสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดสามารถเจิญบนตัวกรองเหนือเซลล์ชั้นพี่เลี้ยงโดยตรงในอาหารเหลว สภาพแวดล้อมเริ่มต้นและการเจริญของชั้นเซลล์พี่เลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญในการได้มาซึ่งประสิทธิภาพ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ โปรโตพลาสต์ถูกย่อยได้จากเซลล์แขวนลอยที่พัฒนามาจากคัพภะซึ่งให้แคลลัสที่ทนต่อลักษณะแรงดันของการเพาะเลี้ยงในช่วงแรก ๆ จากการศึกษาได้ผลดีกับโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ A188 และ B73-1 สามารถเจริญเป็นต้นใหม่จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

Kroutwig และ Lorz (1995) ได้ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ และเพคติเนส วาย 23 0.078 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสมของไมโครสปอร์ของข้าวโพดหลายสายพันธุ์ นำโปรโตพลาสต์ที่ปรับความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร LB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม และสามารถชักนำข้าวโพดลูกผสม H99 กับ FR-16-I จากโปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นแคลลัสและชักนำให้เป็นต้นได้

Welter และคณะ (1995) ศึกษาการพัฒนารูปร่างของคัพภะข้าวโพดไปเป็นแคลลัสชนิด พบว่าคัพภะของข้าวโพดที่พัฒนาไปเป็นแคลลัสชนิด friable ประกอบไปด้วยลักษณะรูปร่างหลายแบบในช่วงต่างๆ ระหว่างการเปลี่ยนอาหารจะทำให้ได้แคลลัสที่มีรูปร่างชนิด typeII 3 แบบ ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีรูปร่าง 3 แบบ ได้แก่ pre-embryogenic early-embryogenic และ late-embryogenic ถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบใช้แสงและแบบส่องกราด จากการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ของการพัฒนาระหว่างรูปร่างทั้ง 3 แบบ และการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ทำให้ทราบว่าลักษณะรูปร่างทั้ง 3 แบบ สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ผ่าน somatic embryogenesis

Jardinaud และ คณะ (1995) ศึกษาความเหมาะสมในการถ่ายทอด DNA และการแสดงออกของ β-glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพดโดยวิธีอิเลคโตรพอเลชั่น พบว่าสามารถการนำ DNA อิสระเข้าไปในไมโครสปอร์ของข้าวโพดลูกผสมโดยวิธีอิเลคโตรพอเลชั่น ซึ่งการเลือกสารละลายสำหรับทำเลคโตรพอเลชั่นพิจารณาจากความสามารถที่ให้การเจริญเป็นต้นใหม่ได้จำนวนมาก

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีเอสถูกยับยั้งโดยการเพิ่ม KNO_3 และ $MgSO_4$ 100 มิลลิโมล ในสารละลายสำหรับทำอิเลคโตรพอเลชั่น การแสดงออก 7 ลักษณะของเวกเตอร์ได้แก่ ยีนรายงานผล Uid A ที่ถูกควบคุมโดยโมซาอิคไวรัสของดอกกะหล่ำ ยีน Lat 52-7 Zmg 13 Emu Ubig-1 Al หรือ ยีนโปรโมเตอร์ Act 1 ใช้ทดสอบความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของเอนไซม์บีต้ากลูคูโรนิเดส ในไมโครสปอร์ของข้าวโพด ระดับการแสดงออกสูงสุดเมื่อยีน Uid A ถูกขับโดยยีนโปรโมเตอร์ Act 1 ดังนั้นเวกเตอร์ตัวนี้จึงมีการใช้ต่อไปเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ระดับการแสดงออกของเอนไซม์บีต้ากลูคูโรนิเดสสูงสุด

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเลี้ยงเนื้อพืช

อาหารสำหรับเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆมักมีชื่อเรียกต่างๆกันตามชื่อผู้คิดค้น เช่น สูตรอาหารของ White เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ สูตรอาหารของ Vacin และ Went เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้วยไม้ สูตรอาหารของ Murashige และ Shoog (MS) เป็นสูตรอาหารใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ และสูตร Chu (N_6) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ข้าวสาลีและข้าวโพด อย่างไรก็ตามสูตรอาหารต่างๆ ที่มีอยู่มากมายในปัจจุบันเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วมีองค์ประกอบต่างๆดังนี้

1. สารอนินทรีย์ (innorganic salts) ได้แก่ แร่ธาตุอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) หรือ (major elements) ได้แก่ คาร์บอน (C)ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปตัสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการปริมาณมากและขาดไม่ได้ พืชต้องการในปริมาณ 50 หรือมากกว่ามิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrients) หรือ (trace elements) ได้แก่ เหล็ก (Fe) แมงกานิส (Mn) โคบอล (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โมลิบดีนัม (Mo) และโบรอน (B) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้เช่นกัน พืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ธาตุต่างๆเหล่านี้อาจใช้ในรูปสารประกอบต่างๆ เช่น โปแตสเซียม (K) อาจใช้ในรูปของไนเตรต (NO_3) คือ KNO_3 หรืออาจใช้ในรูปของซัลเฟต (SO_4) คือ K_2SO_4 เป็นต้น สำหรับความเข้มข้นของสารประกอบของแร่ธาตุเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามสูตรอาหารต่างๆ

2. สารอินทรีย์ (organic substances) (organic salts) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) แบ่งออกเป็นหลายพวกดังนี้ ที่พืชต้องการแบ่งเป็น 6 พวกดังนี้

2.1 คาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน เป็นสารให้พลังงาน น้ำตาลที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่ ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose) ซอบิทอล (sobitol) แมนนิทอล (mannitol) ปกติจะใช้น้ำตาล 20-40 กรัมต่ออาหารที่เตรียม 1 ลิตร หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ ในบางกรณีกลูโคสใช้ได้ดีกว่าซูโครส

2.2 วิตามินเป็นอาหารที่สำคัญ เช่น

2.2.1 ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ (thiamin-HCI) วิตามิน B_1 เป็นตัวที่สำคัญ ปกติต้องการ 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.2 ไมโอ-อินโนสิทอล (myo-inositol) จะเป็นประโยชน์ถ้าอยู่ในช่วง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ไนอาซีน (niacin) หรือ นิโคตินิกแอสิด (nicotinic acid) วิตามิน B_3 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.4 ไพริดอกซิน ไฮโดรคลอไรด์ pyridoxine-HCI วิตามิน B_6 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.5 ไบโอติน (biotin) วิตามิน H ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6 แพนโทธินิกแอสิค (pantothenic acid) ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.7 แอสคอบิก (ascorbic acid) วิตามิน C

2.2.8 ฟอลิคแอสิค (folic acid) วิตามิน M หรือ วิตามิน B_c

2.2.9 แคลเซียม แพนโททีเนต (calcium pantothenate)วิตามิน B_5

2.2.10 ไซยาโนโคบาลามีน (cyanocobalamine) วิตามิน B_{12}

นอกจากนี้ยังมีวิตามินตัวอื่นๆ เช่น choline , riboflavin , citric acid สารเหล่านี้อาจช่วยลดอัตราการที่เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้บ้าง

2.3 กรดอะมิโนต่างๆ เช่น ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) อาจีนีน (arginine) แอสปาราจีน (asparagine) แอสปาติค แอสิค (aspartic acid) ซีสทีน (cystein) กลูตามีน (glutamine) กลูตามิก แอสิค (glutamic acid) ลิวซีน (leucine) เมทไทโอนีน (methionine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) โพรลีน (proline) เซอลีน (serine) ทริปโตเฟน (trytophan) และไทโรซีน (tyrosine) อาจช่วยในการเพิ่มจำนวนของส่วนต่างๆ สำหรับพวก amides อาจมีประสิทธิภาพดีกว่ากรดอะมิโนอื่นๆ ดังนั้นประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนในอาหารเพาะเลี้ยงควรพิจารณาเป็นกลุ่ม

2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นได้ ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้เร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

2.4.1 ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และรวมกันเป็นกลุ่มของแคลลัส ได้แก่

- พวกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

-อินโดลอะเซติค แอสิค (indol 3-acetic acid = IAA)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_9NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 175.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- พวกที่สังเคราะห์ขึ้น

- แอลฟา-แนพทาลิน อะเซติค แอสิค (α-napthalene acetic acid=NAA)

สูตรเคมี $C_{12}H_{10}O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 186..20

- 2,4 ไดรคลอโรฟีนอกซี อะเซติค แอสิค (2,4-dichlorophenoxy acetic acid = 2,4-D)

สูตรทางเคมี $C_8H_6O_3C_{l2}$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04

- 2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอสิค (2,4,5 –trichlorophenoxy acetic acid = 2,4,5-T)

- 3- อินโดลบิวไทริค แอสิค (3-idolbutyric acid = IBA)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{13}NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 203.23

- พาราคลอโรฟีนอกซีอะเซติค แอซิค (p-chlorophenoxy acetic acid = pCPA)

สูตรทางเคมี $C_8H_7O_3CI$ น้ำหนักโมเลกุล 186.59

- 2-แนพทอกซี อะเซติค แอสิค (2-naphtoxyacetic=NOA)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{10}O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 202.20

- 3,6 ไดคลอโรอะนิสิค (3,6 dichloroanisic acid = dicamba)

น้ำหนักโมเลกุล 221.04

- ฟีลนีล อะเซติค แอสิค (phenylacetic acid = PAA)

- 4-อะมิโน 3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิค แอสิค (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid)

2.4.2 ไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นอนุพันธุ์ของ adenine ซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต แต่จะมีกิจกรรมได้เฉพาะในพืชเท่านั้น สารพวกนี้ที่ใช้กันมาก

- 6- เฟอร์ฟูริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine=kinetine)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_9N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 215.21

- 6- เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine=BAP)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{11}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 225.20

- 2-ไอโซเพนทินิล อะมิโนเพียวรีน (2-isopentenyl aminopurine = 2ip)

(N- isopentenylaminopurine = 2 ip)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_{13}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 203.3

- ซีเอทิน (zeatin) (เกิดในธรรมชาติ)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_{13}N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 219.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 จิบเบอร์เรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้จะนำมาใช้น้อย หรือใช้ในบางกรณี เท่าที่ใช้กันทั่วไปได้แก่

- จิบเบอร์เรลลิน แอสิค (gibberellins acid = GA3)

สูตรทางเคมี $C_9H_{22}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.37

2.5 Nitrogenous base adenine เป็นตัวที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับ cytidylic และ guanylic acid จะช่วยในการเติบโตของแคลลัส

2.6 สารอื่นๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน มะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วย เป็นต้น บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อยังไม่ทราบแน่ชัด ผงถ่านที่เติมเข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจากเซลล์

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผล ต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส

2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลิอิก

3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดรากเป็นขั้นตอน ที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับออกซินในต้นพืชกับสภาพแวดล้อม ถ้าออกซินภายในต้นมีระดับต่ำก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อการเกิดรากที่สมบูรณ์

ผลของไซโตไคนินในกระเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ส่งเสริมการเจริญของใบ

2. ยับยั้งการเจริญของราก

3. กระตุ้นให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดยอดหลายยอด

4. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ ไซโตไคนินเร่งการแบ่งตัวของเซลล์เนื่องจากมีผลต่อ RNAซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์และไซโตพลาสซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของจิบเบอเรลลินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จิบเบอเรลลินสามารถกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ หรือการแบ่งตัวของเซลล์ หรือทั้งการยืดตัวและการแบ่งตัวของเซลล์

เซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น เริ่มต้นโดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ ปลายยอด ปลายราก เนื้อเยื่อเจริญ ใบ เมล็ด คัพภะ อับละอองเกสร รังไข่ ตา ข้าง ดอก หรือ ผล และทำการชักนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นให้เกิดเป็นแคลลัส โดยการนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ที่มีธาตุอาหารที่สมบูรณ์ เช่น สูตร Murashige และ Skoog (1962) ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราค่อนข้างสูง สารที่นิยมใช้มากที่สุดคือ 2,4-D การเพาะเลี้ยงในอาหารดังกล่าวจะทำให้เกิดแคลลัสซึ่งเซลล์เกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ เมื่อนำแคลลัสชนิดนี้ย้ายลงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบประมาณ 50-120 รอบต่อนาที เซลล์ก็จะหลุดจากกันมาแขวนลอยในอาหาร บางกรณีอาจใช้แท่งแก้วบี้ให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสได้ นอกจากนี้เซลล์แขวนลอยยังอาจได้จากการนำเอาเอมบริโอหรือต้นกล้าซึ่งอยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาย่อยเอาสารเพคตินอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของมิดเดิลลาเมลลาออกด้วยเอนไซม์ เพคติเนส ทำให้เซลล์ซึ่งเคยถูกยึดติดกันด้วยมิดเดิลลาเมลลา หลุดออกจากกันมาแขวนลอยในสารละลาย เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและสิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยม เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้น ควรประกอบด้วยเซลล์กลุ่มเล็กๆ และเป็นเซลล์เดี่ยวๆมีความสม่ำเสมอด้านการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และด้านชีวเคมี

วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

1.ใช้ในการศึกษาทางโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์

2.ต้องการชักนำให้ได้ต้นพืชจำนวนมาก

3.ใช้ทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีต่างๆ

4.ใช้ทดสอบความต้านทานต่อสภาพเครียสต่างๆ เช่น ทนกรด ทนเค็ม ทนแล้ง

5.ใช้เป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์

6.ใช้เป็นแหล่งในการย้ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

1. การเลี้ยงใน microchamber

วิธีนี้นิยมเลี้ยงเซลล์แขวนลอยซึ่งประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวๆ วิธีนี้จะกระทำได้ โดยหยดเซลล์แขวนลอยเป็นหยดเล็กๆ บนแผ่นโคเวอร์สไลด์แล้วจึงคว่ำแผ่นโคเวอร์สไลด์นั้นบนสไลด์หลุม เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวๆด้วย hanging drop technique บางกรณีอาจใช้โคเวอร์สไลด์ 2 แผ่นมาวางบนแผ่นสไลด์ธรรมดาให้ห่างกันพอสมควร แล้วจึงวางแผ่นโคเวอร์สไลด์ ที่มีเซลล์เดี่ยวๆ หยดอยู่คว่ำลงไป วิธีนี้ให้ผลสำเร็จไม่สูงมากนัก จึงใช้เฉพาะกับการเลี้ยงเซลล์ครั้งละเซลล์เท่านั้น

2.การเลี้ยงในขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า

วิธีนี้นิยมใช้เซลล์แขวนลอยในปริมาณไม่มากนัก โดยนำเซลล์แขวนลอยใส่ขวดทรงชมพู่ ขนาด 50-2000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำขวดนั้นไปวางบนเครื่องเขย่าแบบเป็นวง ซึ่งจะเขย่าขวดในแนวราบด้วยอัตราเร็ว 30-150 รอบต่อนาที สำหรับการเขย่านี้จะต้องขึ้นกับปริมาณอาหารในขวดด้วย ปกติขวดขนาด 125 มิลลิลิตร จะใส่อาหารเหลวประมาณ 20-25 มิลลิลิตร หรือขวดขนาด 250 มิลลิลิตร จะใส่อาหารประมาณ 50-70 มิลลิลิตร เนื่องจากการเขย่าด้วยความเร็วเท่ากันเซลล์จะได้รับแรงกระแทกมากกว่า หากปริมาตรอาหารในขวดน้อยลง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยวิธีนี้ จะต้องเปลี่ยนอาหารให้เซลล์อยู่เสมอประมาณ 5-20 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิด การเปลี่ยนอาหารบ่อยๆอาจทำให้เซลล์ขาดการเติบโตอย่างต่อเนื่อง ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงโดยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการสำหรับการวิจัยเท่านั้น

3.การเลี้ยงในถังหมัก

การเลี้ยงเซลล์วิธีนี้เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นปริมาณมากกว่า 1 ลิตรขึ้นไป โดยนำเซลล์แขวนลอยมาเพาะเลี้ยงในถังหมัก ซึ่งมีการกวนด้วยใบพัดหรือเป่าให้อากาศให้เซลล์แขวนลอยมีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา เพื่อให้เซลล์ในถังขนาดใหญ่นั้นได้รับอากาศตลอดเวลา เซลล์แขวนลอยจะถูกตรวจสอบตลอดเวลาเพื่อให้มีการเปลี่ยนอาหารปรับปริมาณอากาศและอุณหภูมิให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่เสมอ หลังจากนั้นมีการควบคุมการถ่ายเอาเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงออกมาใช้ประโยชน์ด้วย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยด้วยระบบนี้ นิยมกระทำเพื่อการผลิตสารเคมีจากเซลล์แขวนลอยในลักษณะอุตสาหกรรม เนื่องจากการผลิตเซลล์แขวนลอยด้วยวิธีนี้จะต้องใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือที่มีความทันสมัย และราคาแพง แต่จะสิ้นเปลืองแรงงานน้อย และเราสามารถที่จะควบคุมขั้นตอนการผลิตเซลล์แขวนลอยได้อย่างสมบูรณ์

การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การพัฒนาของเอมบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยวๆ แบ่งตัวออกเป็น 2 4 เซลล์และทวีคูณไปเรื่อยๆ จนได้กลุ่มเซลล์ (cell aggregation) ต่อมาพัฒนาเป็นก้อน(globular shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped torpedo-shaped และเจริญไปเป็นต้นในที่สุด

ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น เซลล์จะมีการเจริญเติบโตแบบต่างๆกันแบ่งได้เป็น 3 ระยะดังนี้

1. Lag phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตน้อยมากเนื่องจากเซลล์แขวนลอยต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพอาหารใหม่หลังจากการเปลี่ยนอาหาร ระยะนี้จะยาวขึ้นเมื่อปริมาณเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นมีอยู่น้อย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไปจึงเริ่มต้นด้วยเซลล์แขวนลอยในอัตราประมาณ 9,000-15,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตในระยะ lag phase ไม่ยาวนัก

2. Exponential phase ระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก ทำให้ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อัตราการตายของเซลล์แขวนลอยในระยะนี้ไม่ต่างจากระยะ lag phase มากนัก เซลล์แขวนลอยจะอยู่ในระยะนี้จนกระทั่งเซลล์แขวนลอยมีอยู่ราว 1-4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะต่อไป

3. Stationary phase ระยะนี้อัตราการเพิ่มปริมาณของเซลล์แขวนลอยมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการตายของเซลล์แขวนลอยคล้ายระยะ lag phase ปกติเซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ระยะนี้หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 18-25 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่ใช้ และชนิดของเนื้อเยื่อพืช) เซลล์แขวนลอยที่อยู่ในระยะนี้จะเข้าสู่ระยะ lag phase ค่อนข้างนานหากย้ายลงสู่อาหารใหม่ ดังนั้นระยะนี้จึงเป็นระยะสุดท้ายที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทั่วไป เพราะเซลล์แขวนลอยจะไม่ถูกปล่อยไว้นานจนอัตราการเกิดใหม่ของเซลล์แขวนลอยต่ำกว่าอัตราการตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในขวดพู่บนเครื่องเขย่าจะต้องมีการหากราฟการเจริญเติบโต ระหว่างเวลากับการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ซึ่งเราสามารถที่จะทราบได้ว่าจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ประมาณช่วงเวลาวันที่เท่าไร

การตรวจสอบการเจริญเติบโต

ในเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงไว้นั้น อาหารที่ใช้ไปในช่วงเวลาหนึ่งจะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและซากเซลล์แขวนลอยปะปนกันอยู่ การตรวจนับจำนวนเซลล์แขวนลอยเป็นเรื่องที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอย่างมาก เพราะปริมาณเซลล์แขวนลอยต่อหน่วยปริมาตรของอาหารที่ต่ำเกินไปจะทำให้เซลล์แขวนลอยตายได้เมื่อเทเซลล์แขวนลอยนั้นสู่ผิวอาหารวุ้น

การตรวจสอบปริมาณและสภาพเซลล์แขวนลอยอาจกระทำได้โดยวิธีการต่างๆดังนี้

1. การหาปริมาณเซลล์ที่อัดแน่น (packed cell volume) วิธีนี้เป็นวิธีวัดปริมาตรเซลล์ที่จะทำได้ง่ายที่สุด โดยเพียงนำเซลล์แขวนลอย 10 มิลิลิตร มาใส่หลอดวัดปริมาตรสำหรับเครื่องปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 700-1,000 กรัม นาน 5 นาที ก็จะทราบปริมาตรเซลล์ที่อัดแน่นอยู่ก้นหลอด จากนั้นจึงเทียบปริมาตรเซลล์นั้นเป็นต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร

2. การหาน้ำหนักสด วิธีนี้อาจทำโดยนำเซลล์ที่อัดแน่นจากวิธีแรกมาชั่งหาน้ำหนัก โดยนำเซลล์ที่ได้ไปวางบนกระดาษกรองเปียกซึ่งทราบน้ำหนัก ล้างเซลล์ด้วยน้ำบนกรวยเคลือบที่ใช้สุญญากาศดูด แล้วจึงนำกระดาษกรองพร้อมเซลล์มาชั่งน้ำหนัก จากนั้นคำนวณหาน้ำหนักสดของเซลล์ การหาน้ำหนักสดนี้จำเป็นต้องใช้เซลล์จำนวนมากจึงจะให้ผลที่แม่นยำ ทั้งนี้การแสดงน้ำหนักสดจะต้องแสดงต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร

3. การหาน้ำหนักแห้ง วิธีนี้อาจทำโดยนำเซลล์ที่หาน้ำหนักสดแล้วมาอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงในตู้อบร้อน หรืออบจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง แล้วรีบนำมาหาน้ำหนัก วิธีนี้ต้องใช้เซลล์จำนวนมากจึงจะมีความคลาดเคลื่อนน้อยลง การแสดงน้ำหนักแห้งก็ต้องแสดงต่อปริมาตรเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร

4. การนับจำนวนเซลล์ วิธีนี้อาจกระทำโดยนำเซลล์ที่อัดแน่นแล้วมาเติมกรดเกลือเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อเซลล์แขวนลอยตั้งต้น 10 มิลลิลิตร เขย่าเซลล์แขวนลอยให้กระจายตัวสัมผัสกับกรด แล้วแช่ไว้ที่ -5 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จากนั้นนำมาละลายแล้วเติมกรดโครมิคเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลิลิตร เก็บไว้นาน 3-5 วันที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมสารละลายผสมระหว่างกรดเกลือเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1: 1 แล้วทำให้เซลล์กระจายตัวใหม่ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมานับจำนวนใต้กล้องจุลทรรศ์บนสไลด์สำหรับนับจำนวนเซลล์ ทั้งนี้เซลล์ต้องมีจำนวนน้อยกว่า 250 เซลล์ต่อพื้นที่สไลด์ เพื่อให้การนับมีความแม่นยำ

5. การหา mitotic index วิธีนี้เป็นการนำเอาเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วยสีย้อมโครโมโซม เช่น aceto-orcein หรือ acito-carmine เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดูการแบ่งเซลล์ เนื่องจาก 4 วิธีที่กล่าวข้างต้นไม่สามารถเลือกวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตได้ หากแต่เป็นการวัดรวมทั้งปริมาณเซลล์ทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิต การแสดงค่า mitotic index จะเป็นการแสดงว่าในจำนวนเซลล์แขวนลอย 100 เซลล์มีเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวอยู่กี่เซลล์ โดยตรวจจากเซลล์แขวนลอยจำนวนไม่น้อยกว่า 1,000 เซลล์ โดยวิธีนี้จะทำให้ทราบว่าเซลล์แขวนลอยมีความมีชีวิตมากน้อยเพียงใด

6. การย้อมสี fluorescence diacitate (FDA) สีนี้เป็นสีย้อมชนิดพิเศษที่ใช้สำหรับการย้อมเซลล์ที่มีชีวิต ปกติเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรส อยู่ภายในเซลล์ เมื่อนำเซลล์มาย้อมด้วยสีฟรูออร์เรสเซน ไดอะซิเตต สีนี้จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเทอเรส อยู่ภายในเซลล์ จากนั้นนำเซลล์มาดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีการเรืองแสงจะมีสีเหลือง-เขียว แสดงว่าเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ ถ้าเซลล์มีความเข้มของสีมากแสดงว่าเซลล์มีความแอกทีฟมาก เซลล์มีชีวิตมาก ถ้าเซลล์มีความเข้มสีน้อยหรือไม่ติดสี แสดงว่าเซลล์มีความแอกทีฟน้อย และเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอาจถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น

1. การศึกษาด้านสรีรวิทยาของเซลล์ ทั้งทางด้านโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยซึ่งมีความสม่ำเสมอกันทั้งด้านรูปร่างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นจำนวนคราวละมากๆ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาพฤติกรรมทางสรีรวิทยาของเซลล์ได้ง่ายขึ้น

2. ใช้ในการผลิตสารเคมี เซลล์พืชบางชนิดเมื่อได้รับการปฏิบัติดูแลอย่างจำเพาะเจาะจง เช่น เลี้ยงในสภาพแสงเหนืออุณหภูมิหนึ่งด้วยอาหาร ซึ่งมีเกลือแร่และสารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะเซลล์เหล่านั้น จะสร้างสารเคมีบางอย่างมากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งสารเหล่นี้จะเป็นพวกสารทุติยภูมิ เช่น สารฟีโนลิค เทอพีโนลิค เทอพีนอย และ อัลคอลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
30606

ดังนั้น บริษัทอุตสาหกรรมจึงได้นำเซลล์แขวนลอยของพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเก็บเซลล์มาสกัดสารที่ต้องการ เช่น แคปไซซินจากเซลล์พริก vanilla จากเซลล์ vanilla สี betalain จากเซลล์ portulaca เป็นต้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ที่จำเป็น:-

1. อุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัย

1.1 เอมบริโอ ข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท สุวรรณ 3 และ สุวรรณ 5

1.2 สารเคมีต่างๆที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.3 เอนไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยผนังเซลล์ เซลลูเลสจากเชื้อราไตรโคเดอม่า และ เพคติเนสจากเชื้อรา

1.4 สีย้อมตรวจสอบโปรโตพลาสต์ FDA

1.5 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรอง

1.6 เครื่องแก้วต่างๆ

1.7 อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1.8 โถดูดความชื้น

1.9 ตู้ปลอดเชื้อ

1.10 เครื่องดูดอากาศ

1.11 หม้อนึ่งความดัน

1.12 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

1.13 เครื่องเขย่า

1.14 เครื่องเซนติฟิวส์

1.15 กล้อง fluorescent microscope

1.16 กล้อง inverted microscope

1.17 กล้องถ่ายภาพ

1.18 ตู้อบความร้อน

1.19 สไลด์นับจำนวนเซลล์ (heamacytometer)

1.20 สารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการดำเนินงาน

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. การฟอกฆ่าเชื้อฝักข้าวโพด

1.1 เปิดแสง uv ทิ้งไว้ 30 นาทีก่อนใช้ตู้ปลอดเชื้อ

1.2 ฆ่าเชื้อทำความสะอาดภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยการฉีดแอลกอล์ฮอล 70 เปอร์เซ็นต์แล้วใช้ผ้าสะอาดเช็ด

1.3 ฆ่าเชื้อที่มือผู้ปฏิบัติงานด้วยแอลกอล์ฮอล 70 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ทำการฆ่าเชื้อมีดผ่าตัดและปากคีบโดยจุ่มแอลกอล์ฮอล 95 เปอร์เซ็นต์แล้วลนไฟ ทิ้งให้เย็น ทำเช่นเดิมอีก 2-3 ครั้ง

1.5 แช่ฝักข้าวโพดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยเติมคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ tween 20 2-3 หยด

1.6 แช่ไว้ 30 นาทีเขย่าเป็นระยะในตู้ปลอดเชื้อ ล้างฝักข้าวโพดโดยใช้น้ำกลั่นอบฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆละ 3-4 นาที

1.7 แช่ฝักข้าวโพดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมจะทำการแคะเอ็มบริโอ

2. การแคะเอ็มบริโอ

2.1 นำปากคีบปลายแหลมแทงแกนฝักข้าวโพดในลักษณะคว่ำจะทำให้แคะเอ็มบริโอได้ง่าย วางฝักข้าวโพดบนจานเพาะเชื้อ ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดโกนค่อยๆปาดปลายเมล็ดข้าวโพดระวังอย่างให้เอ็มบริโอขาดเสียหายได้

2.2 ใช้ปลายมีดแคะเอ็มบริโอออกมาวางบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 โดยหงายส่วนแหลม(เพราะส่วนล่างที่ไม่แหลมจะเป็นส่วนที่เกิดราก) ถ้าจานเพาะเชื้อใหญ่ใส่ 20-25 เอ็มบริโอ จานเพาะเชื้อขนาดเล็กใส่ 4-5 เอ็มบริโอ (ดังรูปที่ 3)

2.3 การแคะเอ็มบริโอต้องหมั่นเปลี่ยน มีดผ่าตัดบ่อยๆและฆ่าเชื้อทุกครั้ง ป้องกันการปนเปื้อน

2.4 จานเพาะเชื้อที่แคะเสร็จจะปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

2.5 เมื่อบ่มได้ประมาณ 7 วัน เอ็มบริโอจะเริ่มงอกแคลลัสพร้อมยอดอ่อนและราก ต้องทำการตัดยอดอ่อนและรากออกเพื่อให้เอมบริโอเกิดเป็นแคลลัสเท่านั้น แล้วจะย้ายแคลลัสลงบนอาหารแข็งสูตรเดิมในจานเพาะเชื้อใหม่

2.6 เมื่ออายุ 14 วัน หลังจากแคะเอ็มบริโอ ทำการวัดขนาดแคลลัสก่อนย้ายแคลลัสลงในอาหารเหลวเพื่อเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย และย้ายลงในอาหารแข็งสำหรับการชักนำให้เกิดต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้เพาะเลี้ยงคัพภะให้เป็นแคลลัส

ชนิดของ Growth regulator	ปริมาตรที่ใส่ในแต่ละสูตร(mg/l)					
	N_0	N_1	N_2	N_3	N_4	N_5
2,4-D	2	2	2	2	2	2
NAA	0	1	1	1	1	1
Kinetin	0	0	0.25	0.5	0.75	1
BA	0	0	0.25	0.5	0.75	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

1. นำแคลลัสที่ได้จากข้อ 2.6 มาใส่ในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 N_6 ที่ประกอบด้วยซูโครสและมอลโตส และ R_2 ที่ประกอบด้วยซูโครสและมอลโตส เตรียมไว้ประมาณ 25 มิลลิลิตร ใน ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

3. เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 7 วัน โดยการถ่ายอาหารเก่าออกบางส่วนแล้วเติมอาหารสูตรเดิมลงไปใหม่

4. ศึกษาดูการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 3 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และซุปเปอร์สวีท โดยการหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในแต่ละระยะเวลาคือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 22 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ขวด ในแต่ละระยะเวลา โดยแต่ละขวดมีปริมาณเซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงโดยนำขวดมาวางในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาตามกำหนดจะทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังนี้

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

2 นำแผ่นกระดาษกรองวางบนกรวยกรอง (Buchner funnel) และนำไปต่อกับขวดรูปชมพู่ เพื่อจะทำการกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ

3. เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง ทำการกรองในระบบสูญญากาศ รอจนกระทั่งไม่หยดแล้ว นำกระดาษกรองที่เปียกน้ำไปชั่งบันทึกน้ำหนัก (B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 ทำการกรองเซลล์แขวนลอย ด้วยระบบสูญญากาศ ล้างเซลล์ที่อาจติดค้างอยู่ภายในขวดรูปชมพู่ ด้วยน้ำกลั่น

5 ชั่งน้ำหนักเซลล์และกระดาษกรอง บันทึกน้ำหนัก (C)

6 นำกระดาษที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง และทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

7 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้ง แล้วไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง โดยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกผลน้ำหนัก (D)

8 นำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ขวดที่ได้มาเขียนกราฟ และหาสมการความสัมพันธ์ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา

9 ค่าน้ำหนักสด (fresh weight) = (C) - (B)

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

การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด 3 พันธุ์คือ สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีท

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน (ดังรูปที่ 7) ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS N_6ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต R_2 ที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโตสโดยไม่มีการสารควบคุมการเจริญเติบโต N_6ที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโตสที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NBR ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NBR ที่ประกอบด้วย NAA ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.1 0.25 และ 0.5 และ NBR ที่เพิ่มความเข้มข้นของไฟทาเจล เป็น 5.2 กรัมต่อลิตรโดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วยเคซีนไฮโดรไลเซท 0.1 กรัมต่อลิตร และ แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2 ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเลี้ยงโดยนำไมโครแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสที่มีแสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของไมโครแคลลัส

สูตรอาหาร	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	kinetin (mg/l)	2,4-D (mg/l)	sucrose (g/l)	maltose (g/l)	phytagel (g/l)
N_6 sucrose	2	-	-	2	20	-	2.6
N_6 maltose	2	-	-	2	-	20	2.6
N_60 sucrose	-	-	-	-	20	-	2.6
N_60 maltose	-	-	-	-	-	20	2.6
R_2 sucrose	-	-	-	2	20	-	2.6
R_2 maltose	-	-	-	2	-	20	2.6
R_20 sucrose	-	-	-	-	20	-	2.6
R_20 maltose	-	-	-	-	-	20	2.6
MS	-	-	-	-	20	-	2.6
NBR 0.1NAA	0.1	3	1	-	20	-	2.6
0.25NAA	0.25	3	1	-	20	-	2.6
0.5NAA	0.5	3	1	-	20	-	2.6
NBR 0	-	-	-	-	20	-	2.6
NBR 0	-	-	-	-	20	-	5.2
NBR 0.1	0.1	3	1	-	20	-	5.2
NBR 0.25	0.25	3	1	-	20	-	5.2
NBR 0.5	0.5	3	1	-	20	-	5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด 3 พันธุ์ คือ สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีท

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 5.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสจากเซลล์แขวนลอยข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และจากแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

5.1.1 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

- นำเซลล์แขวนลอยมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.8 กรัม
- นำสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ กับ เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย CPW และแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ คือ 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกับเซลล์แขวนลอยที่บดละเอียด แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อที่จะหาช่วงเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม
- ทำการนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

5.1.2 การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

- นำแคลลัสมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.8 กรัม
- นำสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ กับเอนไซม์เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย CPW และแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ คือ 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกันกับแคลลัสที่บดละเอียด แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อที่จะหาช่วงเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม
- การนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอยข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และ แคลลัสของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 และแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีทน้ำหนัก 0.8 กรัม

2. นำเซลล์แขวนลอยบดให้ละเอียดแล้วแช่ในสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.6 M 30 นาที (ดังรูปที่ 1)

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

- การนับจำนวนโปรโตพลาสต์บนที่นับจำนวนเซลล์ โดยการดูดสารละลายในแต่ละช่วงเวลา โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ

การทดลองที่ 6 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 และแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีทน้ำหนัก 0.8 กรัม

2. นำเซลล์แขวนลอยบดให้ละเอียดแล้วแช่ในสารละลาย CPW ที่มีแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ 30 นาที

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

4. นำไปวางในที่มืดบนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

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

6. ดูดสารละลายเอนไซม์ออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

10. ตรวจสอบการมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Fluorescien diacetate และสีย้อม evan blue

11. ปรับปริมาตรโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

12. เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สูตร NBR ที่ระดับความเข้มข้นของ NAA 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

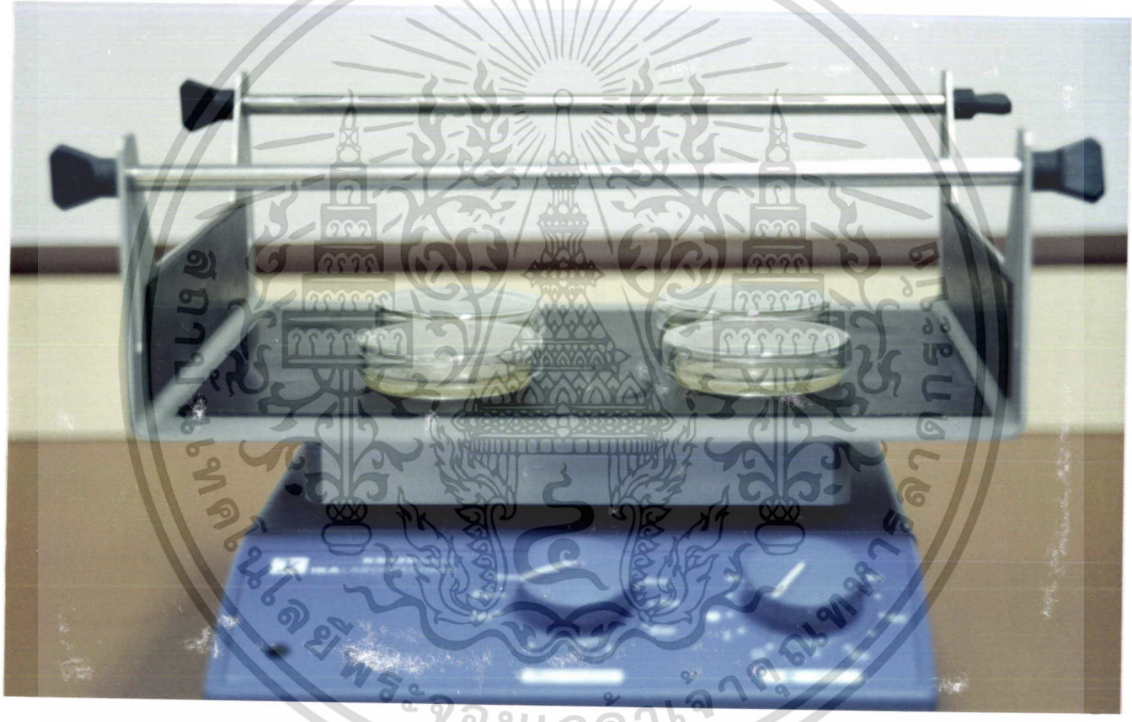
13. ปิดด้วยพาราฟิล์มและเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส

14. หลังจากนั้นนำมาตรวจดูการสร้างผนังเซลล์และดูการแบ่งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 1 แสดงเซลล์ที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที

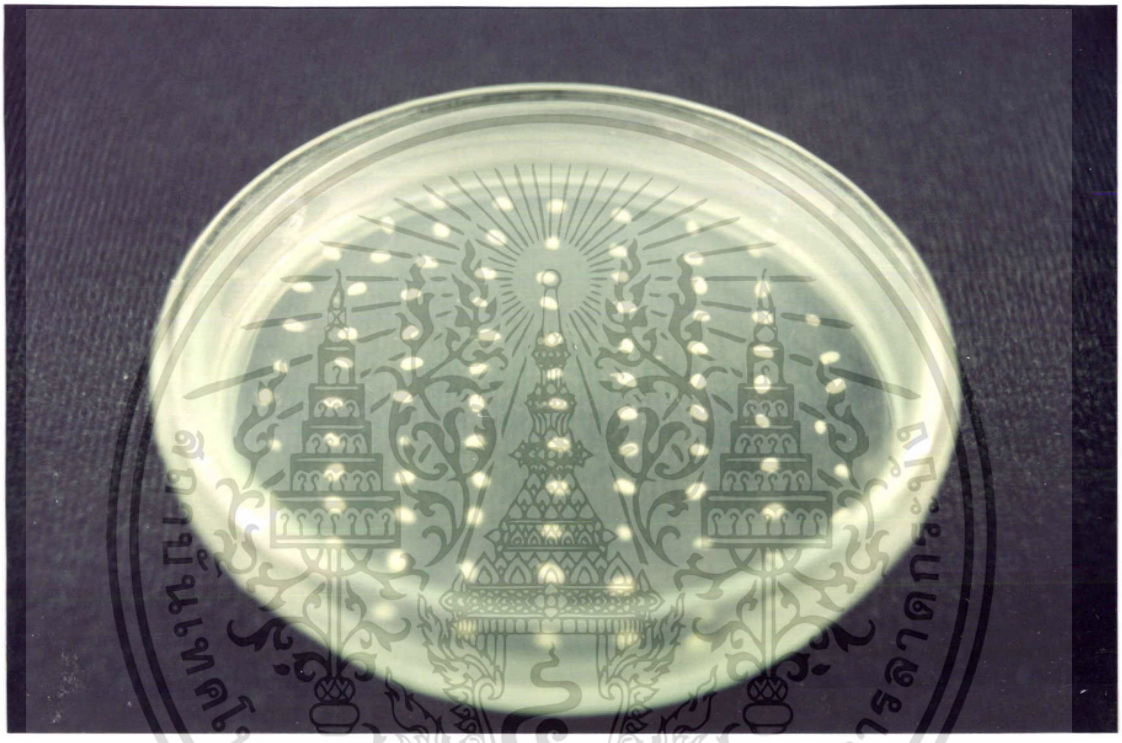
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้คัพภะของข้าวโพด 3 พันธุ์คือ สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีท พัฒนาเป็นแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีท ในอาหารสูตร N_6 ที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตดังตารางที่ 1 พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไปประมาณ 7 วัน พบว่าในอาหารแต่ละสูตรจะมีการงอกของแคลลัส typeI และ typeII (ดังรูปที่ 4) ภายใน 2 สัปดาห์จะสังเกตเห็นลักษณะของแคลลัสเกิดขึ้นดีที่สุดของข้าวโพดทุกพันธุ์ในสูตรอาหาร N_6 ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสีเหลืองอ่อนประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ มีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น (typeI) และแบบที่เซลล์เกาะกันหลวมๆ (typeII) (ดังรูปที่ 5) บางแคลลัสพบว่าจะมีทั้งสองแบบอยู่รวมกัน และพบการเจริญของรากรวมทั้งยอดภายในก้อนแคลลัส (ดังรูปที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงลักษณะคัพภะของข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง N_6

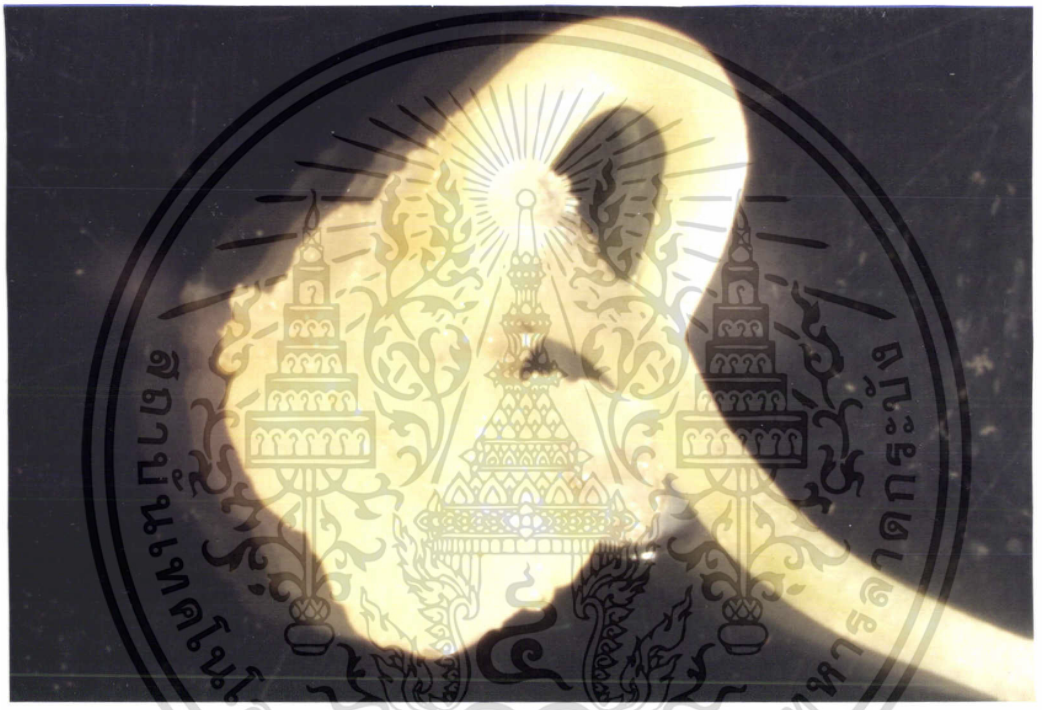
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของแคลลัสที่พัฒนาจากคัพภะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง N_6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 แสดงลักษณะของแคลลัสแบบ compact callus และ friable callus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แสดงลักษณะการพัฒนาของแคลลัสโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

จากการทดลองได้ผลดังนี้ (ดังรูปที่ 8,9)

2.1 อาหารสูตร R_2 ที่เติมกลูโคสและมอลโตส และ N_6ที่เติมกลูโคสและมอลโตส

สูตรอาหาร	ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้
R_2 มอลโตส	ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นมาก เซลล์มีขนาดใหญ่สมบูรณ์ มีลักษณะสีเหลืองอ่อน กลุ่มเซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มแบบหลวม ๆ
R_2 กลูโคส	ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่า R_2 มอลโตส เซลล์มีขนาดปานกลางเกาะกลุ่มกันแน่นและมีสีเหลืองซีด
N_6มอลโตส	ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นมากเซลล์ขนาดปานกลางถึงใหญ่ สีเหลืองอ่อน
N_6 กลูโคส	ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นมาก ขนาดเซลล์ใหญ่เกาะกันหลวมๆ สีเหลืองอ่อน

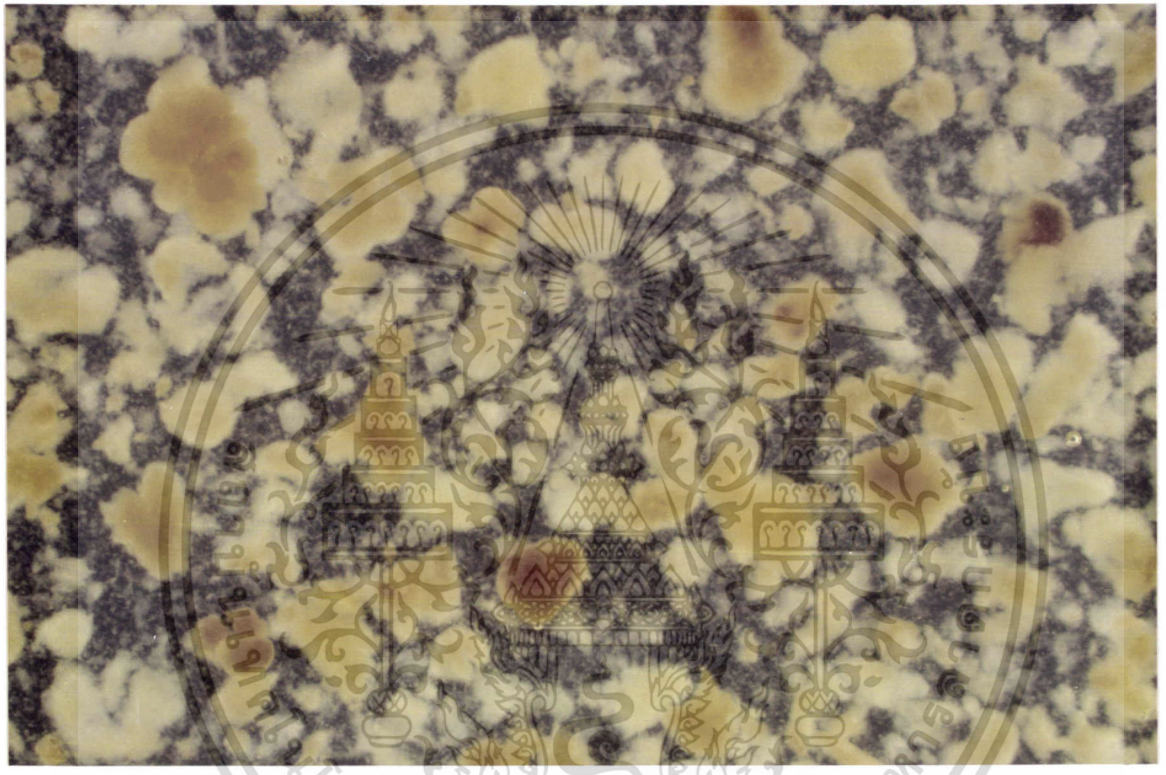
2.2 ในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังตารางที่ 1 ได้ผลดังนี้

ชนิดของอาหาร	ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้
N_0	เซลล์เจริญดีมาก ขนาดเซลล์ใหญ่อวบ สีเหลืองอ่อน มีเซลล์ตายน้อย ปริมาณเซลล์เพิ่มจากเดิมมากและเกาะกันอย่างหลวมๆ
N_1	เซลล์เจริญดีมาก ขนาดเซลล์ใหญ่อวบ สีเหลืองอ่อน มีเซลล์ตายน้อย ปริมาณเซลล์เพิ่มจากเดิมมากและเกาะกันอย่างหลวม ๆ
N_2	เซลล์เจริญน้อยและขนาดเล็กกว่า N_0 และ N_1 สีเหลืองอ่อนเกาะกันหลวมๆ
N_3	ปริมาณเซลล์เพิ่มน้อยมาก มีการตายของเซลล์มากสังเกตได้จากสีดำที่เกิดขึ้น ขนาดเซลล์ปานกลางเกาะกันอย่างหลวม ๆ
N_4	ปริมาณเซลล์เพิ่มน้อยมาก มีการตายของเซลล์มากสังเกตได้จากสีดำที่ เกิดขึ้น ขนาดเซลล์ปานกลางเกาะกันอย่างหลวมๆ
N_5	ปริมาณเซลล์เพิ่มน้อยมาก มีการตายของเซลล์มากสังเกตได้จากสีดำที่ เกิดขึ้น ขนาดเซลล์ปานกลางเกาะกันอย่างหลวม ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในขวดรูปชมพู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของเซลล์แขวนลอยเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 แสดงลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 การหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด 3 พันธุ์คือ พันธุ์สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีทโดยการหากราฟน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

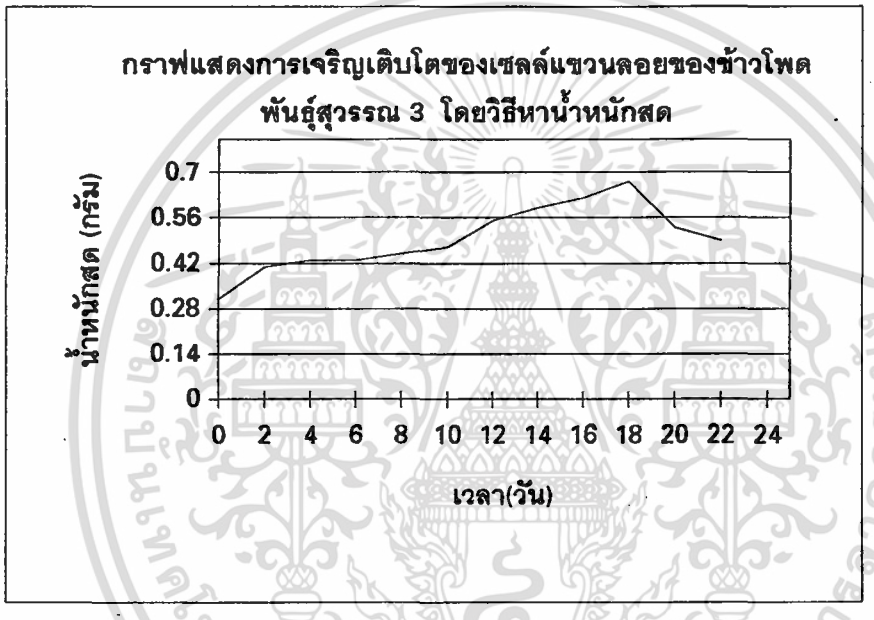
จากการหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดทั้งสามสายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25±2 องศาเซลล์เซียสและทำการวัดหาค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (ดังตารางที่ 3, 4 และ 5) ในแต่ละระยะเวลาคือ 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 22 วัน ตามลำดับ เมื่อนำผลที่วัดค่าน้ำหนักแห้งและค่าน้ำหนักสดมาเขียนกราฟการเจริญ พบว่าเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-14 วัน (รูปที่ 10,11) เซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 2-16 วัน (รูปที่ 12,13) สำหรับเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 4 -16 วัน (รูปที่ 14,15) ซึ่งช่วงที่เซลล์แขวนลอยมีการเจริญอย่างรวดเร็วจะเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์และทำการเปลี่ยนอาหารใหม่รวมทั้งการชักนำให้เกิดเป็นต้น

ตารางที่ 3 แสดงน้ำสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

ตารางแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสด

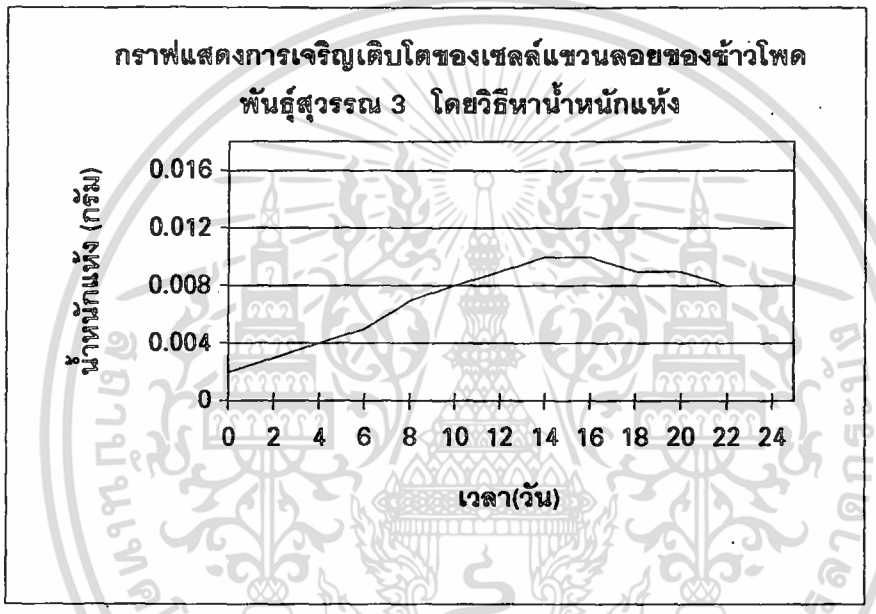
วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)
0	0.002	0.31
2	0.003	0.41
4	0.004	0.43
6	0.005	0.43
8	0.007	0.45
10	0.008	0.47
12	0.009	0.55
14	0.01	0.59
16	0.01	0.62
18	0.009	0.67
20	0.009	0.53
22	0.008	0.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยการหาน้ำหนักสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 โดยการหาน้ำหนักแห้ง

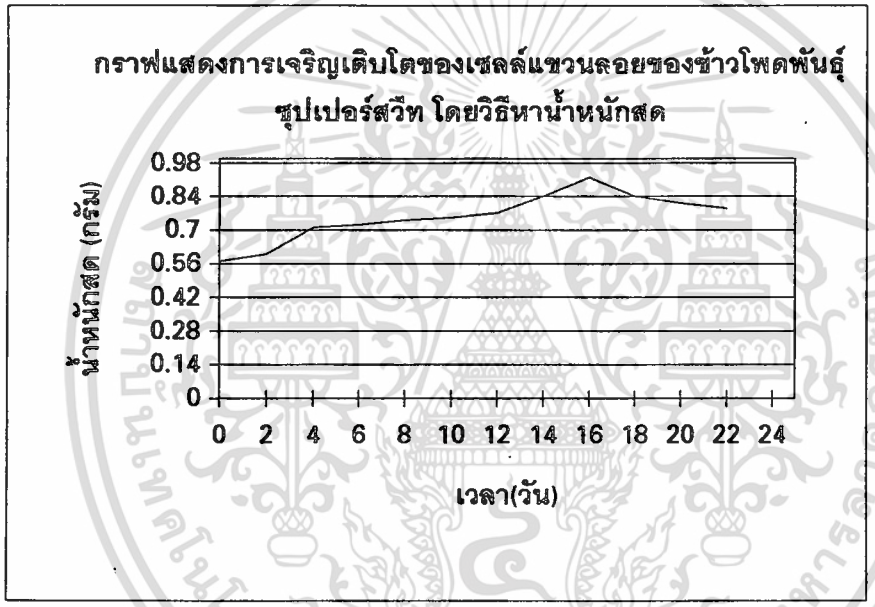
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

ตารางแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์เปอร์สวีท
โดยวิธีหาน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสด

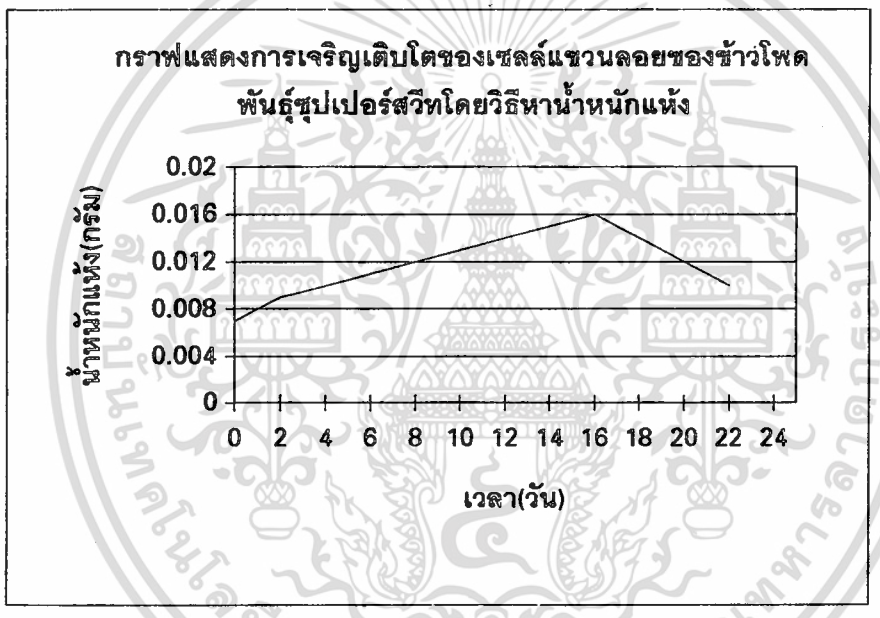
วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)
0	0.007	0.057
2	0.006	0.6
4	0.001	0.71
6	0.011	0.72
8	0.012	0.74
10	0.013	0.75
12	0.014	0.77
14	0.015	0.54
16	0.016	0.92
18	0.014	0.84
20	0.013	0.81
22	0.01	0.79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีทโดยการหาน้ำหนักสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีทโดยการหาน้ำหนักแห้ง

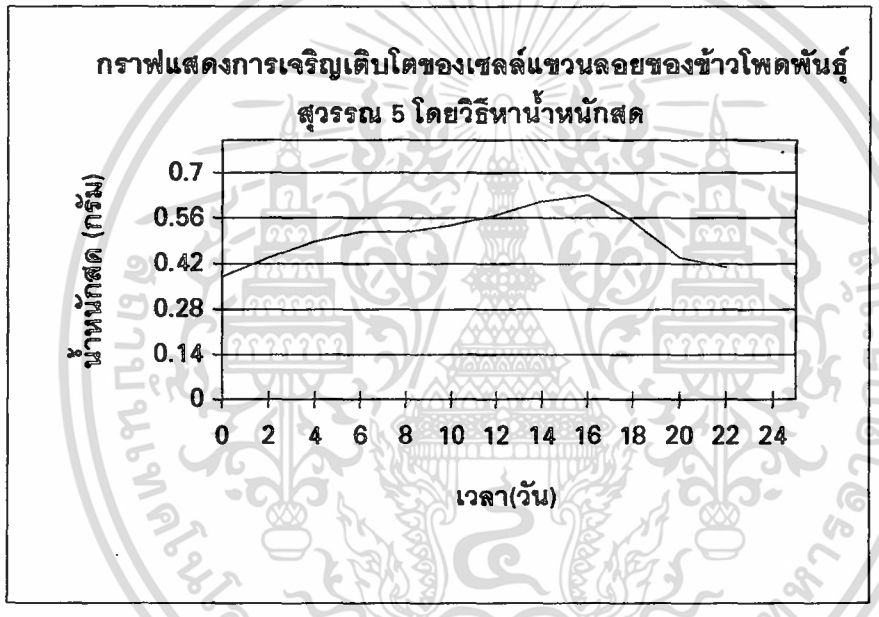
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5

ตารางแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 โดยวิธีหาน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสด

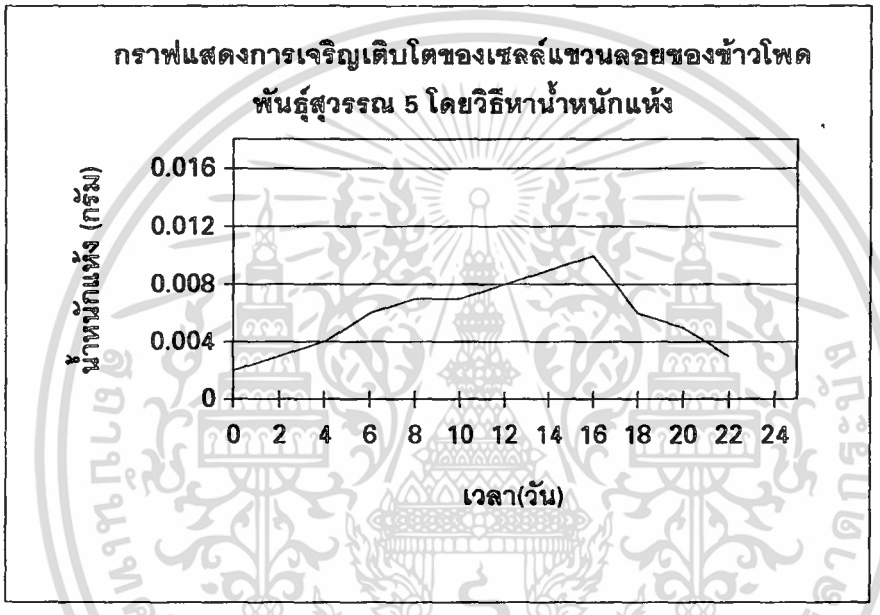
วันที่	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)
0	0.002	0.38
2	0.003	0.44
4	0.004	0.49
6	0.006	0.52
8	0.007	0.52
10	0.007	0.54
12	0.008	0.57
14	0.009	0.61
16	0.01	0.63
18	0.006	0.55
20	0.005	0.44
22	0.003	0.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 โดยการหาน้ำหนักสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



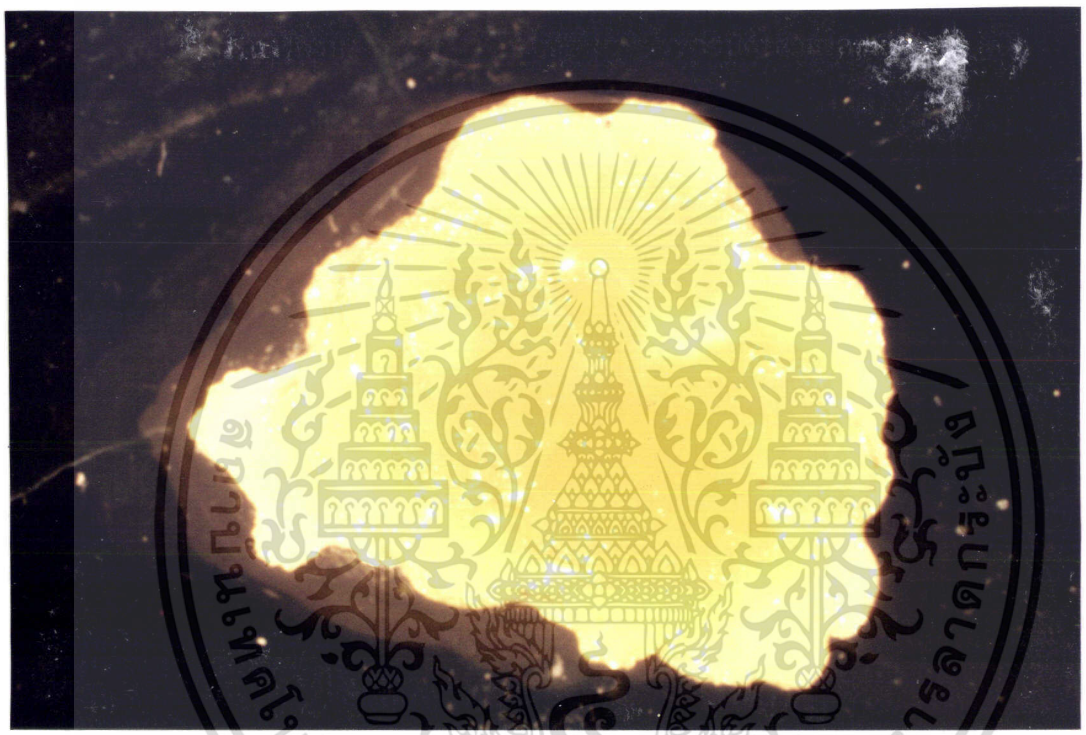
รูปที่ 15 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 โดยการหาน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด 3 พันธุ์คือ สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีท

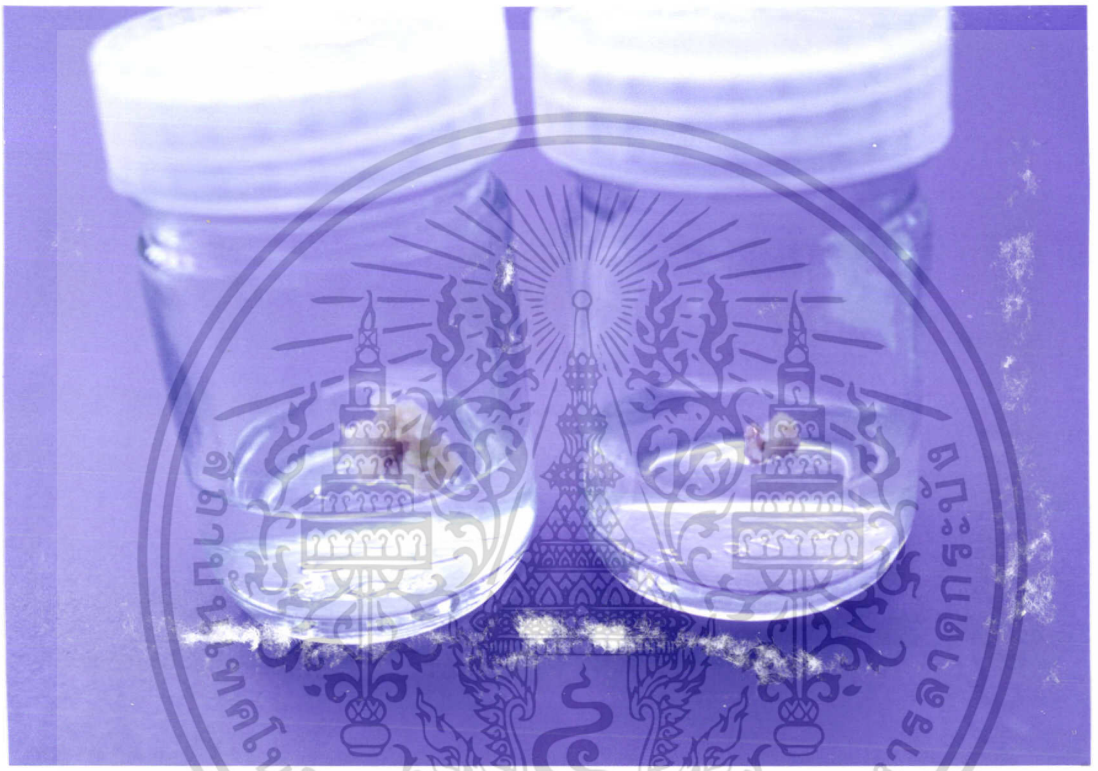
เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 7 วัน ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS N_6ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต R_2 ที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโตสโดยไม่มีการสารควบคุมการเจริญเติบโต N_6ที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโตสที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NBR ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NBR ที่ประกอบด้วย NAA ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.1 0.25 และ 0.5 และ NBR ที่เพิ่มความเข้มข้นของไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงไปได้ 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร NBR ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และ NBR ที่เพิ่มไฟทาเจลเป็น 5.2 กรัมต่อลิตร จะมีการพัฒนาไปเป็นส่วนของยอดและรากและมีสีเขียว ส่วน R_2 ที่เติมมอลโตสเซลล์ที่ได้จะมีการเพิ่มจำนวนและมีการพัฒนาของยอดรวมทั้งมีสีเขียว ส่วน N_6 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเซลล์มีการเพิ่มจำนวน เกาะกันอย่างแน่น และมีสีเขียวเกิดขึ้น และอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากเกาะกลุ่มกันหลวม ๆและมีสีเขียว ซึ่งในการพัฒนาของไมโครแคลลัสโดยการเลี้ยงในอาหารแข็งของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และซุปเปอร์สวีท พบว่า R_2 ที่เติมมอลโตสมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 มากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอื่น (ดังรูปที่ 16,17,18,19)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



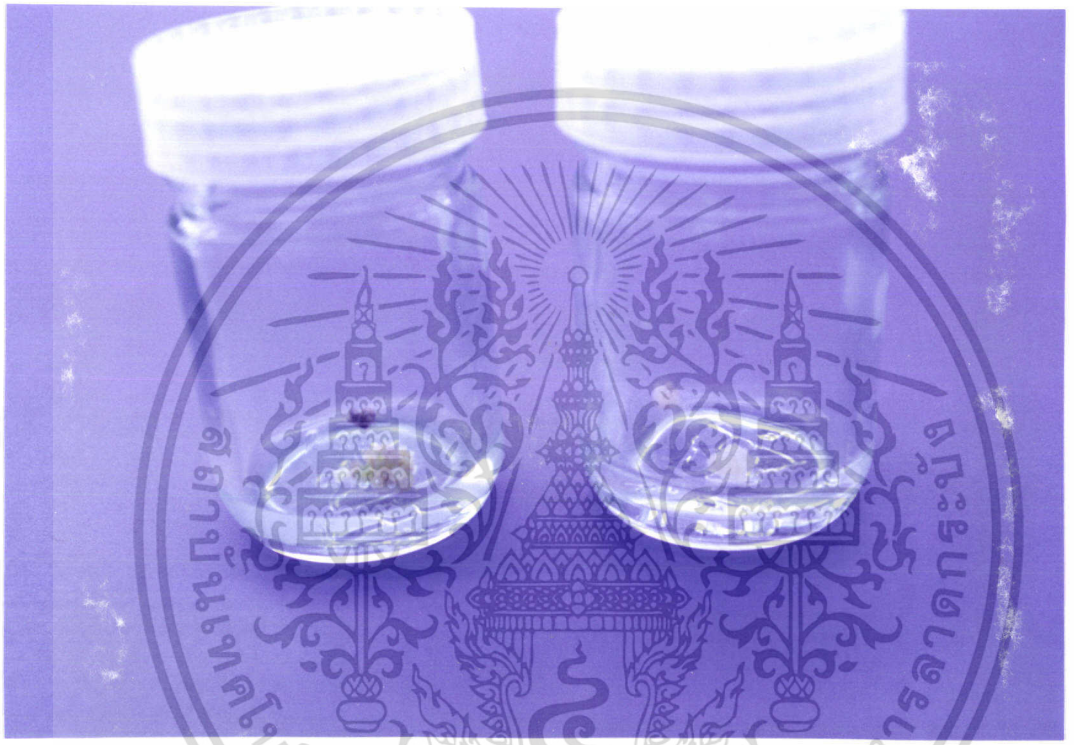
รูปที่ 16 ลักษณะของไมโครแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญของไมโครแคลลัสเมื่อเลี้ยงในอาหาร R_2 และ N_6 ที่ประกอบด้วยมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของไมโครแคลลัสเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร NBR ที่ประกอบด้วย NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และ NBR ที่ประกอบด้วย NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 19 ลักษณะการพัฒนาของไมโครแคลลัสเพื่อจะเจริญเป็นต้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด 3 พันธุ์ คือ สุวรรณ 3 สุวรรณ 5 และ ซุปเปอร์สวีท

5.1การหาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอยข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และ แคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ กับเอนไซม์เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย CPW และแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 0.4 0.5 และ 0.6 โมลาร์ มาผสมรวมกับเซลล์แขวนลอย ทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นที่ 0.4 และ 0.5 โมลาร์ จะได้สภาพเซลล์ที่ไม่ดี รวมทั้งโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีปริมาณน้อย และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำให้ได้เซลล์ที่มีสภาพดี เหมาะสำหรับข้าวโพดทั้งสองพันธุ์ที่จะนำไปทำการเพาะเลี้ยงและได้โปรโตพลาสต์ปริมาณมาก

5.2 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยนำสารละลายที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 1.5 1.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์เพคติเนสที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมรวมกับเซลล์แขวนลอยของพันธุ์สุวรรณ 3 และแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีท สารละลาย CPW และแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 และซุปเปอร์สวีทจนสามารถเห็นแถบของโปรโตพลาสต์ได้ชัดเจน (ดังรูปที่ 20, 21) หลังการแยกด้วยสารละลายซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ จะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ เพคติเนส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ดังตารางที่ 6, 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3

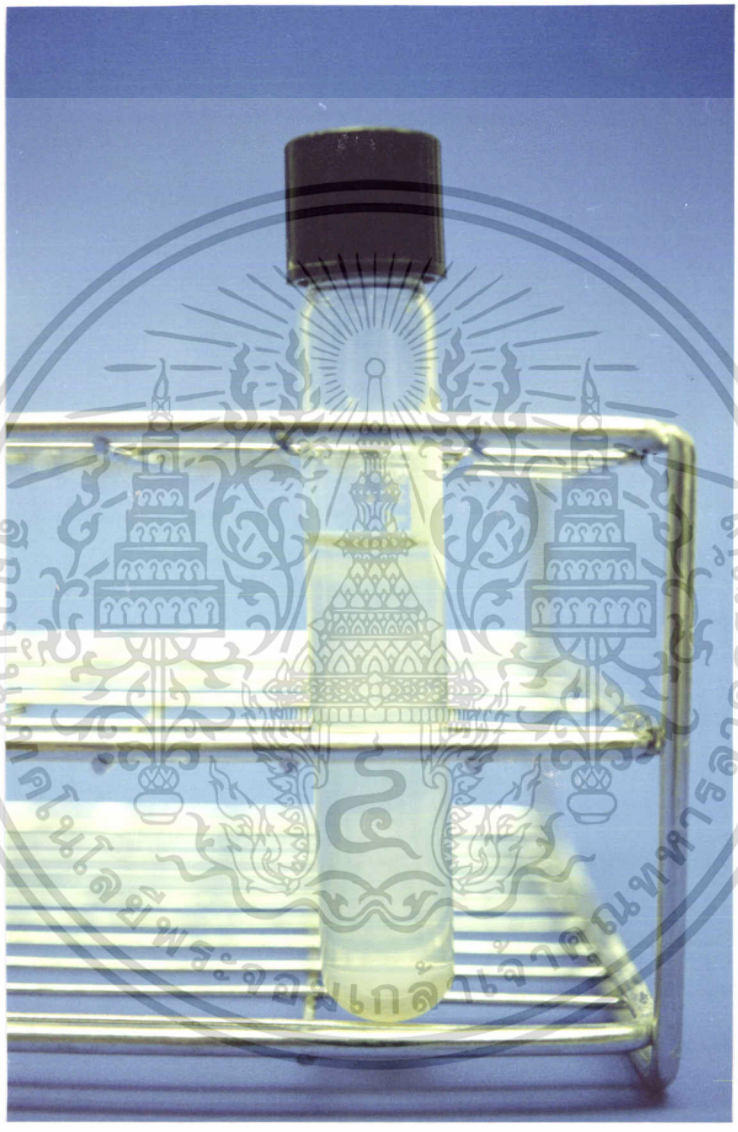
เซลลูเลส:เพคติเนส /ชั่วโมง	2	3	4	5	6
1.5:0.5	0.825	2.035	3.75	2.9	12.9
1.0:0.5	0	0.825	1.65	2.5	9.15
0.5:0.5	0	2.075	1.25	3.75	4.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

เซลลูเลส:เพคติเนส /ชั่วโมง	2	3	4	5	6
1.5:0.5	2.5	4.175	3.75	8.325	13.75
1.0:0.5	0	1.25	1.65	2.5	3.33
0.5:0.5	0	1.25	1.25	2.08	2.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 แสดงแถบของโปรโตพลาสต์ที่ได้หลังจากการแยกด้วยสารละลายซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 21 แสดงโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย FDA

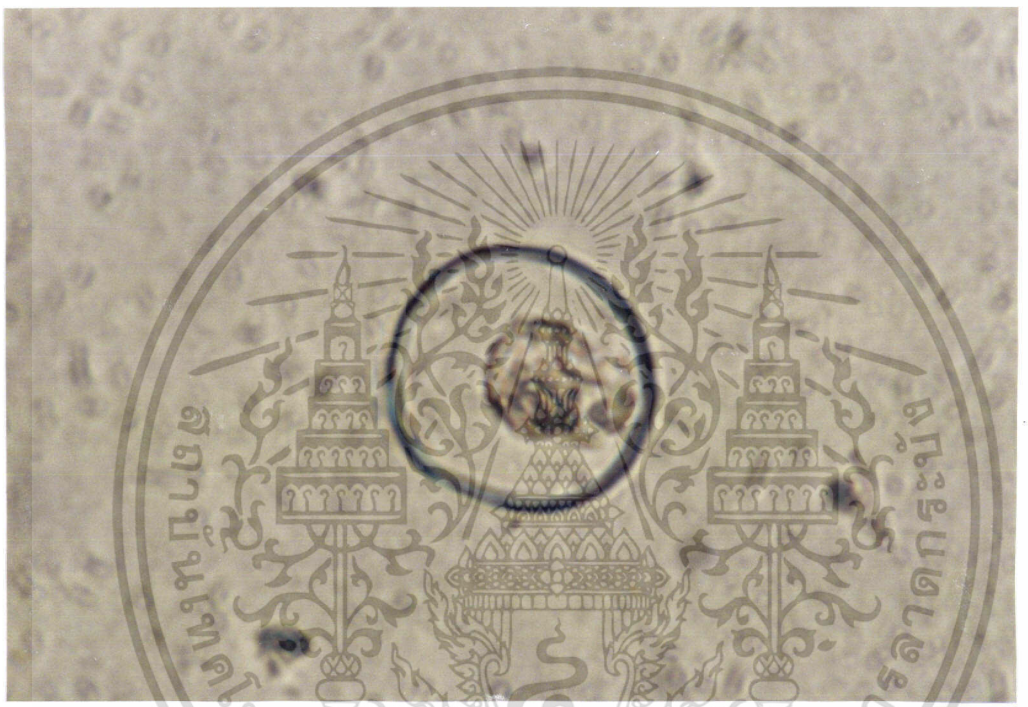
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 6 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีทข้าวโพดในอาหารเหลว

เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากข้าวโพดทั้งสองพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NBR โดยทำการเลี้ยงในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิในช่วง 25-27 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน ในอาหารเหลวทั้ง 3 สูตร คือ NBR ที่ประกอบด้วย 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตพบการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (ดังรูปที่ 22, 23, 24)

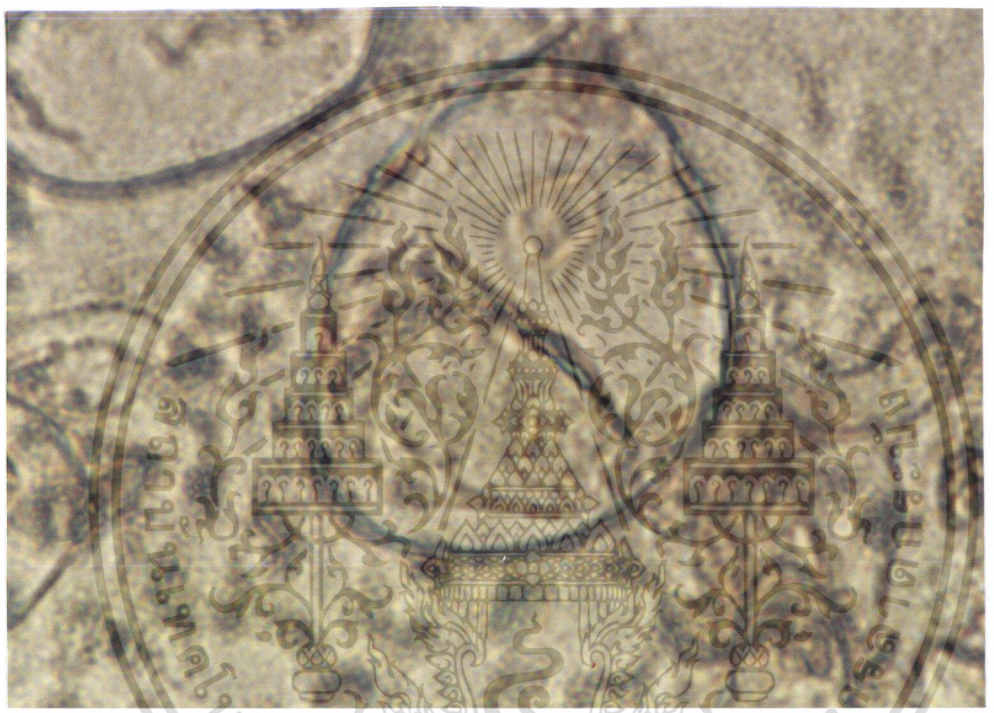
รูปที่ 22 แสดงการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร NBR สูตรต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 23 แสดงการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1-2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 แสดงการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 25 แสดงการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เอ็มบริโอของข้าวโพด 3 พันธุ์ คือ สุวรรณ 3 ซุปเปอร์สวีท และ สุวรรณ 5 เจริญเป็นแคลลัสได้ดี มีลักษณะเป็นทั้งแบบ friable และ compact callus คือ อาหารสูตร N_6ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 2

การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสุวรรณ 3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2เปอร์เซ็นต์ และ R_2 ที่ประกอบด้วย มอลโตส 2เปอร์เซ็นต์ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 25 ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้เซลล์ที่เหมาะสมต่อการนำไปชักนำให้เป็นต้นและแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 3

การเจริญของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 ซุปเปอร์สวีท และ สุวรรณ 5 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-14 วัน 2-16 วัน และ 4-16 วัน ในข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 ซุปเปอร์สวีท และ สุวรรณ 5 ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารใหม่และการนำมาแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองที่ 4

ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของไมโครแคลลัสของข้าวโพด 3 พันธุ์ พบว่าได้ผลดีเพียงพันธุ์เดียว คือสุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร R_2 ที่ประกอบด้วย มอลโตส 2 เปอร์เซ็นต์ แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่พร้อมจะพัฒนาเป็นยอด ลำต้น และราก

การทดลองที่ 5

จากการทดลองพบว่าที่สภาวะความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.6 โมลาร์และที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเพคติเนส 1.5:0.5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และจากแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีท

การทดลองที่ 6

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ3 และจากแคลลัสของพันธุ์ซุปเปอร์สวีทในอาหารเหลวสูตร NBR ทั้ง 3 สูตร คือ NBR ที่ประกอบด้วย 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์และมีการแบ่งเซลล์ภายใน 1-2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kathleen D'Halluin, Els Bonne, Martinr Bossut, Marc De Beuckeleer, and Jan Leemans. "Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation". The Plant Cell. 4. (1992) : 1495-1505.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

Rhodes C. A., K. S. Lowe, and K. L. Ruby. " Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures". Bio/Technology. 6. (1988) : 56-60.

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 สารเคมีในอาหารสูตร N_6 medium (Chu Medium) 1966

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

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

pH 5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 สารเคมีในอาหารสูตรR_2

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$(NH_4)SO_4$	8.25
KNO_3	100
$MgSO_4.7H_2O$	6.25
$CaCl_2.H_2O$	7.5
$MnSO_4.4H_2O$	0.5
$ZnSO_4.7H_2O$	0.55
H_2BO_3	0.715
KI	0.2
$CuSO_4$	0.049
NaH_2PO_4	75
$Na_2MoO_42H_2O$	0.0315
$CuCl_2.6H_2O$	0.00625
Na_2EDTA	0.83
$FeSO_4.7H_2O$	0.62
nicotinic acid	0.25
pyridoxine-HCl	0.25
thiamine-HCl	0.5
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 สารละลาย CPW ที่ใช้ล้างโปรโตพลาสต์ Frearson และคณะ (1973)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 สารละลายเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ Frearson และคณะ(1973)

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	1	**2**	**3**
KH_2PO_4	27.2	27.2	27.2
KNO_3	101	101	101
$CaCl_2.2H_2O$	1480	1480	1480
$MgSO_4.7H_2O$	246	246	246
KI	0.16	0.16	0.16
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025
MES	1013	1013	1013
Mannitol	78200	78200	78200
pH	5.8	5.8	5.8
Cellulase from Tricoderma (เปอร์เซ็นต์)	1.5	1.0	0.5
Pectinase from Mould (เปอร์เซ็นต์)	0.5	0.5	0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่5 สารเคมีในสูตรอาหารNBR

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้