การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและโปรโตพลาสต์ของข้าว

Embryo and Protoplast Culture of Rice (*Oryza sativa* L.)

กฤษณา สุดทะสาร

Krissana Sudtasarn

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QH470.R52 N45 2541 ก.2

Bib Key 141021

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงเยื่อบริเวณและโปรโตพลาสต์ของข้าว

ผู้เขียน นางกฤษณา สุดทะสาร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(ดร. อารักษ์ จันทศิลป์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ)

.....กรรมการ
(ดร.อารักษ์ จันทศิลป์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์)

.....กรรมการ
(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและโปรโตพลาสต์ของข้าว

ผู้เขียน นางกฤษฎา สุดทะสาร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2540

บทคัดย่อ

ในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้น พบว่า เอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Linsmaier และ Skoog (LS) ที่เติม 2,4-D 2 มก/ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล ในสภาพที่มีแสง สามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูง (92.9 เปอร์เซนต์) และแคลลัสมีลักษณะแบบ compact ขนาดใหญ่จำนวนมากที่สุด (35.9 เปอร์เซนต์) แคลลัสเมื่อทำให้แห้งโดยการพักไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่า สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอัตราที่สูงกว่าแคลลัสที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารโดยทันทีโดยไม่ผ่านการทำให้แห้งก่อน สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นนั้น มี 2 สูตร คือ อาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin 4 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอัตราสูงสุด (36.7 เปอร์เซนต์) แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.4 ยอด และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้ 35.5 เปอร์เซนต์ โดยแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (8.6 ยอด)

เมื่อนำกาบใบของต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 3 สัปดาห์ มาทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์ , มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์, ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์, น้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ , โปแทสเซียมคลอไรด์ 336 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 13.6 มิลลิโมลาร์ และเมส 3.59 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กาบใบที่มีน้ำหนักสด 0.5 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 2.9 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเริ่มต้น 1x10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มก/ล , kinetin 0.5 มก/ล และกลูโคส 0.4 โมลาร์ ในที่มืด มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ภายใน 24 ชั่วโมง และเริ่มแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1-3 วัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปไม่พบการเจริญของกลุ่มเซลล์

Thesis Title	Embryo and Protoplast Culture of Rice (*Oryza sativa* L.)
Author	Ms. Krissana Sudtasarn
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	1997

Abstract

The optimum media for callus induction and plant regeneration from embryos of rice (*Oryza sativa* L.) variety Khao Dawk Mali 105 were studied. It was found that embryos cultured on Linsmaier and Skoog (LS) agar medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin under light condition produced the high percentage of callus formation (92.9%) with the highest percentage of large compact texture (35.9 %). The calli dehydrated by placing in petridish sealed with Parafilm for 7 days before being transferred to regeneration medium produced higher frequency of plant regeneration than non-dehydrated calli. There were 2 suitable media for plant regeneration. The first medium was Murashige and Skoog (MS) agar medium supplemented with 15 % (v/v) coconut water and 4 mg/l kinetin which induced the highest percentage of calli forming plants (36.7%) and each callus produced an average of 5.4 shoots. The second medium was MS agar medium supplemented with 1 mg/l IAA and 3 mg/l BA which induced the high percentage of calli forming plants (35.5%) and each callus produced the highest number of shoots (average of 8.6 shoots).

Protoplasts were isolated from 3 weeks old leaf sheath collected from aseptically grown plantlets. Half gram fresh weight of

leaf sheath was digested with 5 ml of enzyme solution containing 2 % (w/v) Cellulase "Onozuka" R-10, 1% (w/v) Macerozyme R-10 , 0.5% (w/v) Driselase , 0.4 M mannitol, 336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl \cdot 2H_2O$ and 3.59 mM MES. The mixture of leaf sheath and enzyme solution was incubated at 30-32°C under dark condition for 3 hours on a gyratory shaker with an agitation speed of 80 rpm. The average yield of isolated protoplasts was 2.9×10^6 protoplasts/g fresh weight. The protoplasts were cultured at a density of 1×10^5 protoplasts/ml in LS liquid medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D , 0.5 mg/l kinetin and 0.4 M mannitol under dark condition. Within 24 hours in culture, wall formation was clearly visible. After 1-3 days in culture, cell division was started ; however, cell colony was not evident.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ก็ด้วยความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาช่วยจัดหาเอกสารประกอบการวิจัยเป็นจำนวนมาก อีกทั้งได้ให้คำปรึกษาและข้อคิดอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยแนะนำแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ อย่างใกล้ชิดและเอาใจใส่ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร.อารักษ์ จันทศิลป์ กรรมการที่ปรึกษาและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์ และ ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณคุณปิยรัตน์ บุษบงก์ไพฑูรย์ และน้อง ๆนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการวิจัย ขอขอบคุณคุณบุญเสริม ทองไสย ที่ช่วยดูแลรักษาต้นข้าวที่ปลูกภายในเรือนปลูกทดลอง ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ขอขอบคุณคุณวัลภา ชูช่วย ที่ช่วยจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และสุดท้ายขอขอบคุณคุณรงค์ สุดทะสาร และ ด.ช.กษิดิ์เดช สุดทะสาร ที่คอยเป็นแรงใจและกำลังใจที่สำคัญยิ่ง

กฤษฎา สุดทะสาร

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(14)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	21
2 วิธีการวิจัย	22
วัสดุ	22
อุปกรณ์	23
วิธีดำเนินการ	24
3 ผล	32
4 บทวิจารณ์	65
5 บทสรุป	78
บรรณานุกรม	80
ภาคผนวก	90
ประวัติผู้เขียน	93

รายการตาราง

ตาราง หน้า

1. ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ที่เวลาต่าง ๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์ 32
2. การเกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส สูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 35
3. การพัฒนาของแคลลัสที่ไม่ผ่านการทำให้แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 42
4. การพัฒนาของแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 43
5. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกาบใบข้าว โดยใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัมที่ระดับออสโมลาริตี้ต่าง ๆ เมื่อวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 48
6. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ โดยวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 55
7. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดยวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 56

ตาราง หน้า

8. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อใช้เอนไซม์ E_A ที่มีเซลลูเลสความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 58

9. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที 58

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	ส่วนต่าง ๆ ของหน่อแรกและหน่อที่ 2 ของข้าว	4
2.	ส่วนต่าง ๆ ของช่อดอกข้าว (ภาพแสดงให้เห็นเพียงบางส่วน)	5
3.	ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว	6
4.	ส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดข้าว	7
5.	เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
6.	เมล็ดข้าวจากภาพที่ 5 แสดงแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณเยื่อบริเวณใกล้กับส่วนโคนของยอดอ่อน	34
7.	แคลลัสที่มีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีครีม เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)	36
8.	แคลลัสที่มีลักษณะร่วนซุย เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)	36
9.	แคลลัสที่มีจุดสีเขียวเกิดขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 1 สัปดาห์	39
10.	แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์	39
11.	แคลลัสที่พัฒนาเป็นจุดสีเขียวและรากบนก้อนเดียวกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์	40
12.	แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์	40
13.	แคลลัสที่พัฒนาเป็นทั้งยอดและรากบนก้อนเดียวกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์	41
14.	แคลลัสที่พัฒนาเป็นทั้งจุดสีเขียว ยอด และรากบนก้อนเดียวกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์	41

ภาพที่ หน้า

15. ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถเจริญเป็นต้นมีรากที่สมบูรณ์ได้ 44

16. ต้นข้าวที่พัฒนามาจากแคลลัส เมื่อย้ายปลูกลงดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกทดลอง มีการเจริญเติบโตปกติ 45

17. ต้นข้าวจากภาพที่ 16 แสดงการออกรวงติดเมล็ด 45

18. ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุ 3 สัปดาห์ สำหรับใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ 47

19. กาบใบ (leaf sheath) จากต้นข้าวอายุ 3 สัปดาห์ ที่นำมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ 47

20. โปรโตพลาสต์หลุดออกมาตรงบริเวณรอยตัดของกาบใบข้าว ที่เวลา 1 ชั่วโมง (x250) 49

21. โปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวในสารละลายเอนไซม์ที่มีแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ (x250) 49

22. โปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวในสารละลายเอนไซม์ที่มีแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ (x250) 50

23. โปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวในสารละลายเอนไซม์ที่มีแมนนิทอล 0.8 โมลาร์ (x250) 50

24. โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วเซลล์ (x750) 51

25. โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่กลางเซลล์ (x750) 52

26. โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (x750) 52

27. โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลม ใส ไม่มีคลอโรพลาสต์ (x750) 53

28. โปรโตพลาสต์ที่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น กระจายอยู่ทั่วเซลล์ (x1000) 53

29. โปรโตพลาสต์ที่มีไซโทพลาสซึมรวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (x750) 54

ภาพที่ หน้า

30. โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงสีเขียว (x250) 59

31. โปรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (x500) 62

32. โปรโตพลาสต์ข้าวที่แบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 เซลล์ (x750) 63

33. โปรโตพลาสต์ข้าวในภาพที่ 32 ที่แบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 เซลล์ เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีการเรืองแสงที่ขอบของเซลล์แบ่งเป็น 2 เซลล์ (x750) 63

34. โปรโตพลาสต์ข้าวที่แบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 3 เซลล์ (x750) 64

35. โปรโตพลาสต์ข้าวที่แบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็นหลายเซลล์ (x750) 64

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ซม	=	เซนติเมตร
มม	=	มิลลิเมตร
กก	=	กิโลกรัม
ก	=	กรัม
มก	=	มิลลิกรัม
ล	=	ลิตร
<	=	น้อยกว่า
>	=	มากกว่า
%	=	เปอร์เซนต์
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2,4,5-T	=	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
ABA	=	abscissic acid
BA	=	benzyladenine
BAP	=	benzylaminopurine
IAA	=	indole acetic acid
IBA	=	indole butyric acid
2iP	=	2-iso-pentyl adenine
NAA	=	1-naphthalene acetic acid
B_5	=	Gamborg, et al. (1970)
LS	=	Linsmaier and Skoog (1965)
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
MES	=	2(N-morpholinoethanesulfonic acid)
ppm	=	parts per million

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย คือ นอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารหลักประจำวันของคนไทยแล้ว ยังเป็นสินค้าออกสำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศอีกด้วย โดยในปี 2538 มีมูลค่าการส่งออกทั้งสิ้น 4.62 หมื่นล้านบาท (ธนาคารกรุงไทยจำกัด, 2539)

พันธุ์ข้าวที่ทำชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทยและมีราคาสูงสุดคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวหอมพันธุ์หนึ่งที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้มีฐานะดี มีกำลังซื้อสูง คุณสมบัติที่ส่งให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นที่นิยมของผู้บริโภค ก็คือ กลิ่น-หอม และข้าวสุกที่นุ่มนวล การส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศมีสูตางในการขยายตลาดสดใสกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ เพราะ ขณะนี้ประเทศไทยยังไม่มีคู่แข่ง ตลาดใหญ่ของข้าวพันธุ์นี้ได้แก่ ฮ่องกง สิงคโปร์ และสหรัฐอเมริกา

ลักษณะโดยทั่วไปของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือเป็นข้าวเจ้าที่ปลูกแบบข้าวนาสวน ลำต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่สูงประมาณ 140 ซม เป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะฤดูนาปี เก็บเกี่ยวประมาณกลางเดือนพฤศจิกายน ผลผลิตเก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองเฉลี่ยประมาณ 510 กก/ไร่ ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ดข้าวกล้องยาวประมาณ 7.5 มม รูปร่างเรียว ลักษณะข้าวสุกนุ่ม และมีกลิ่นหอม ลักษณะเด่นคือคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม รสชาติดีและอ่อนนุ่ม คุณภาพการสีดี เมล็ดข้าวสารใส แกร่ง ลำต้นสามารถทนต่อสภาพดินเปรี้ยวและดินเค็ม ทนแล้ง แต่มีข้อเสียบ้าง คือ ต้นอ่อน ล้มง่าย น้ำหนักเมล็ดเบา ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ โรคใบสีส้ม โรคจู๋ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว และหนอนกอ (วราภรณ์, 2533)

ปัจจุบันได้มีการพยายามปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีความต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญ ๆ เพื่อให้สามารถปลูกได้ตลอดปีในเขตที่มีการชลประทาน และมีปัญหาโรคแมลงระบาดเป็นประจำ ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพดีและผลผลิตสูงโดยวิธีการผสมพันธุ์และคัดเลือกลูกผสม ถึงแม้จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง

และใช้กันมานาน แต่ก็มีข้อเสียหลายประการ เช่น ต้องใช้เวลานาน (10-12 ปี) จึงจะสามารถผลิตพันธุ์ข้าวพันธุ์หนึ่งได้ ทำให้สิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ อับละอองเกสร เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ เข้ามาใช้ร่วมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยมีวัตถุประสงค์แตกต่างกันไป เช่น ผลิตข้าวสายพันธุ์แท้ ผลิตพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคและแมลง ผลิตพันธุ์ข้าวทนเค็ม ทนต่อสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง ทนต่อความแห้งแล้ง และปรับปรุงพันธุ์ข้าวโปรตีนสูง เป็นต้น สำหรับเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวด้านต่าง ๆ เช่น การผลิตลูกผสมระหว่างข้าวต่างชนิดหรือต่างสกุลกันโดยการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (Kyozuka และคณะ, 1989) การสร้างพันธุ์ใหม่ที่ทนต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่จำกัด โดยการถ่ายทอดจีนหรือดีเอนเอที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการให้กับเซลล์ข้าว (Datta และคณะ,1990 ; Peng และคณะ, 1990) เป็นต้น

การที่จะนำโปรโตพลาสต์ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงเทคนิคขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เสียก่อน เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีคุณภาพและจำนวนมากเพียงพอ ตลอดจนสามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้ทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวให้เจริญเป็นแคลลัส และชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ เพื่อใช้เป็นสูตรอาหารพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว ตลอดจนหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว โดยใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์และงานพัฒนาการผลิตมากที่สุด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยโดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

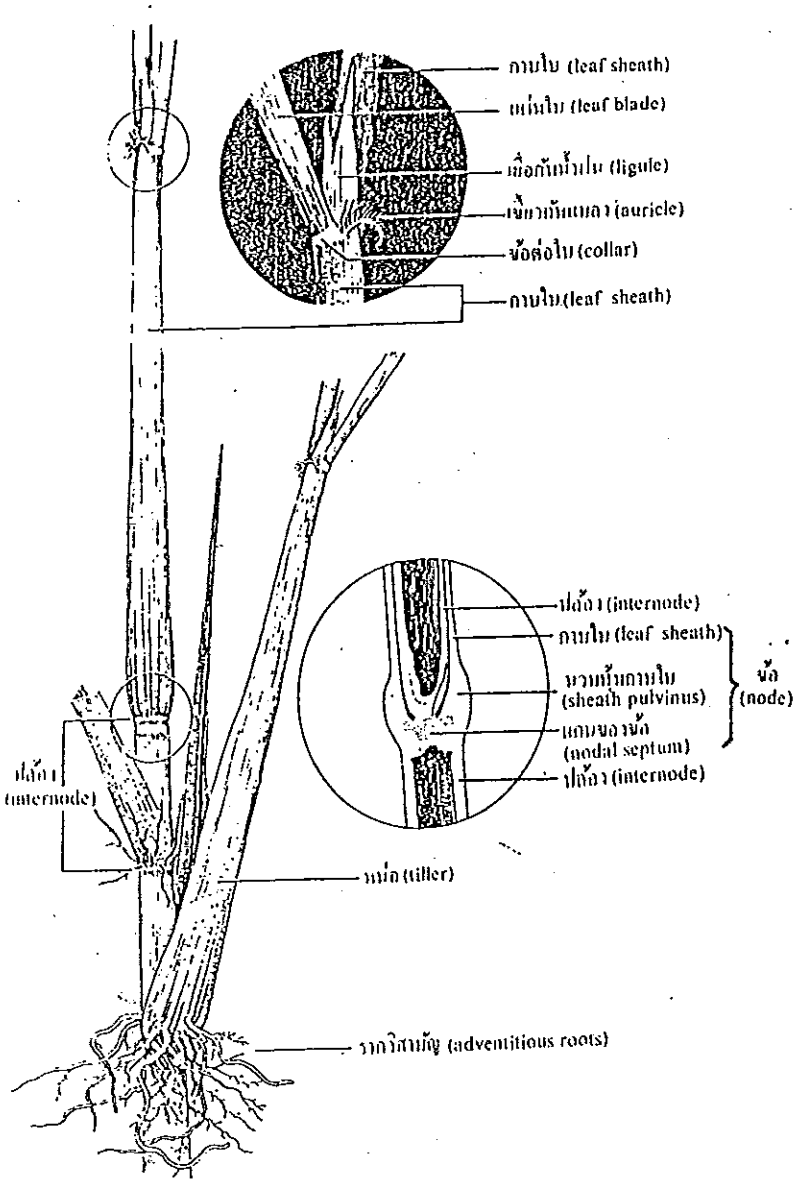
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ตระกูลหญ้า จัดอยู่ใน family Poaceae genus Oryza มีอยู่ประมาณ 25 ชนิด (species) แต่มีอยู่เพียง 2 ชนิดเท่านั้น ที่ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหาร (cultivated varieties)คือ *Oryza sativa* มีปลูกกันทั่วไป และ *Oryza glaberrima* มีปลูกเฉพาะในทวีปแอฟริกาเท่านั้น ส่วนชนิดที่เหลือเป็นข้าวป่า (ชาญ,2536)

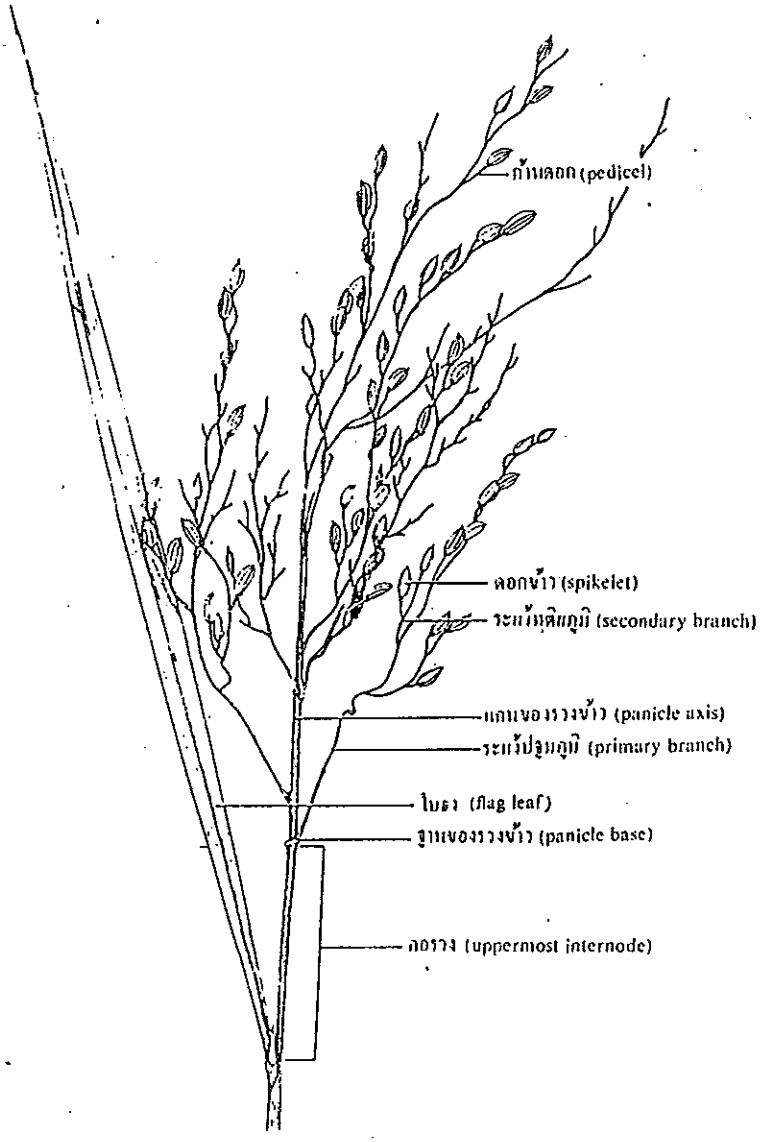
ข้าวชนิด *Oryza sativa* ซึ่งมีปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศที่ปลูกข้าวต่าง ๆ นั้น มีความแตกต่างกันในบางลักษณะ เช่น ทรงต้น ลักษณะของเมล็ด และปริมาณแป้งอะไมโลสในเมล็ด จึงแบ่งข้าวชนิดนี้ออกได้เป็น 3 พวกคือ จาโปนิกา (japonica) อินดิกา (indica) และจาวานิกา (javanica) จาโปนิกาเป็นข้าวที่ปลูกในประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น ข้าวอินดิกาปลูกในประเทศต่าง ๆในเขตร้อน เช่น จีนตอนใต้และตอนกลาง อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ ไทย เวียดนาม ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ส่วนจาวานิกาเป็นข้าวที่พบในประเทศอินโดนีเซียบางท้องที่เท่านั้น (ประพาส,2531)

ข้าวมีลักษณะคล้ายพืชตระกูลหญ้าทั่วไปคือ มีระบบรากฝอย มีข้อ ปล้องเห็นชัดเจน ลำต้นภายในกลวง ใบเรียวยาวเหมือนใบหญ้า มีกาบใบ (leaf sheath) หุ้มลำต้นไว้ และมีเยื่อใบ (auricle) 1 คู่ อยู่ตรงบริเวณส่วนต่อของแผ่นใบและกาบใบ (ภาพที่ 1) จึงทำให้ข้าวแตกต่างจากพืชอื่น ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของข้าวคือข้อที่อยู่ใกล้พื้นดินประมาณข้อที่ 5 สามารถแตกต้นใหม่หรือที่เรียกว่า แตกกอ ได้เป็นจำนวนมาก ข้าวมีช่อดอกเป็นแบบ panicle เกิดขึ้นตรงส่วนปลายยอดของลำต้น ประกอบด้วยดอกย่อย (spikelet) เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 2) ซึ่งดอกย่อยแต่ละดอกจะให้ผลแบบ caryopsis 1 ผลก็คือข้าวเปลือก 1 เมล็ดนั่นเอง (ภาพที่ 3) เมล็ดข้าว (grain) ประกอบด้วย lemma และ palea หุ้มอยู่รวมเรียกว่า เปลือก (hull) เมื่อเอาเปลือกออกส่วนที่ได้คือ เมล็ดข้าวกล้อง (brown rice) หลังจากขัดเอาส่วนของ seed coat และ pericarp ออกแล้ว เรียกว่า เมล็ดข้าวสาร (kernel) ส่วนหัวของเมล็ดข้าวสารจะมีสีขาวขุ่นเรียกว่า จมูกข้าว ซึ่งก็คือ เอ็มบริโอ ส่วนที่เหลือคือ เอนโดสเปิร์ม มีลักษณะเป็นแป้งสีขาวหรือใส (ภาพที่ 4) ข้าวเหนียวจะมีเอนโดสเปิร์มสีขาวขุ่น ส่วนข้าวเจ้ามีเอนโดสเปิร์มใสกว่า ที่เอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวเจ้าอาจมีสีขาวขุ่นที่ด้านข้างหรือตรงกลางเมล็ด ซึ่งเรียกว่า ท้องปลาชิวหรือท้องไข่ (abdominal white)



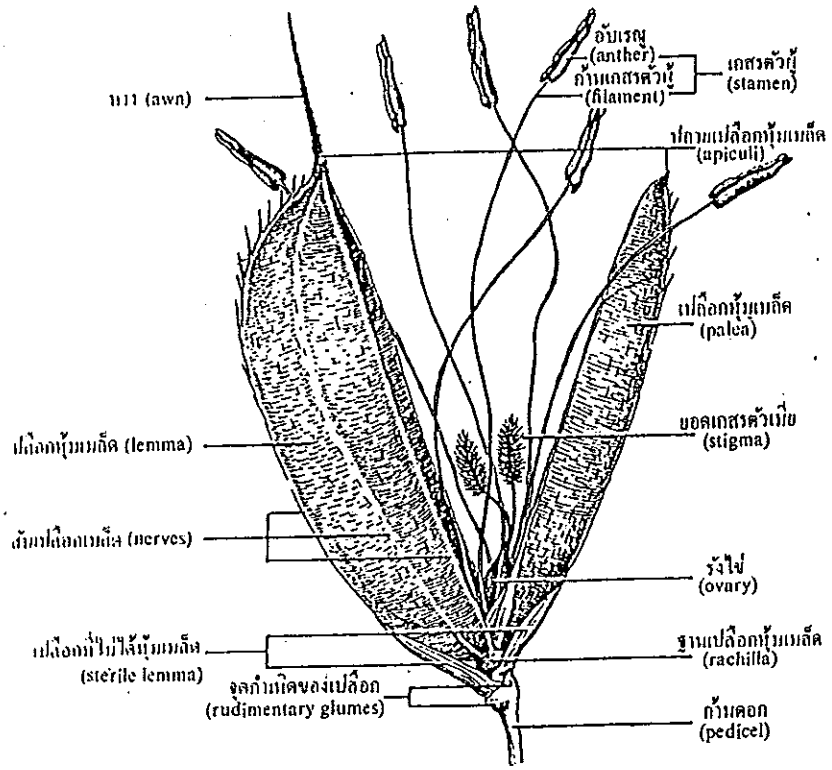
ภาพที่ 1 ส่วนต่าง ๆ ของหน่อแรกและหน่อที่ 2 ของข้าว

(ที่มา : ประพาส, 2531)



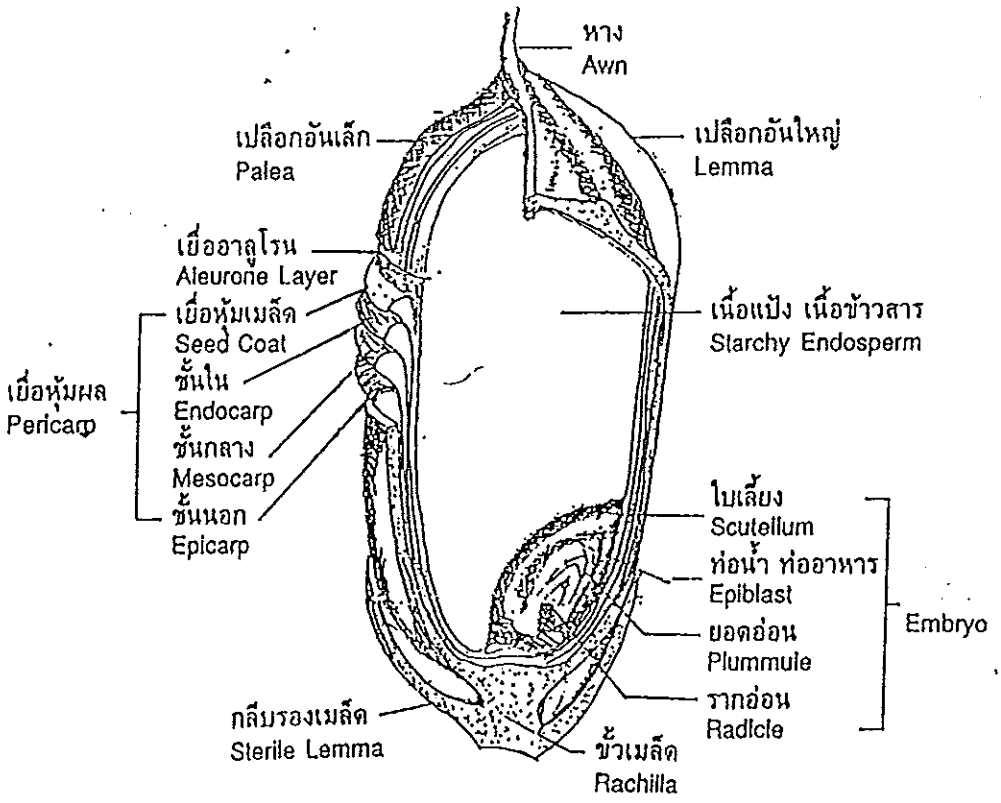
ภาพที่ 2 ส่วนต่าง ๆ ของช่อดอกข้าว (ภาพแสดงให้เห็นเพียงบางส่วน)

(ที่มา : ประพาส, 2531)



ภาพที่ 3 ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว

(ที่มา : ประพาส, 2531)



ภาพที่ 4 สวนต่าง ๆ ของเมล็ดข้าว

(ที่มา : ประพาส, 2531)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

ได้มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาศึกษาในข้าวกันอย่างแพร่หลาย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเริ่มในปี 1955 โดย Fujiwara และ Ojima ได้ใช้ชิ้นส่วนจากรากข้าวมาเพาะเลี้ยง (อ้างโดย Oono, 1983) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนของต้นข้าวเกือบทุกส่วนสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้สร้างแคลลัสและชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ในสูตรอาหารที่เหมาะสม (Wu และ Li, 1970; Reddy, 1981) แต่เมล็ดนับว่าเป็นส่วนที่เหมาะสมที่สุด เพราะ ทนทานต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ได้ดี ทำงานได้สะดวก ชักนำให้เกิดแคลลัสได้มาก แคลลัสที่ได้สามารถชักนำให้เกิดต้นได้เป็นอย่างดีและอัตราการเกิดต้นเผือก (albino) ต่ำ (Ogawa และคณะ, 1982)

Nishi และคณะ (1968) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Kyoto asahi บนอาหารสูตร LS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ภายใต้สภาพที่มีแสง อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือนย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากฮอร์โมนออกซินภายใต้สภาพที่มีแสง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 เดือน พบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ถึง 100 เปอร์เซนต์ แต่ถ้านำแคลลัสไปเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) 1 และ 2 ครั้ง ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่า ความสามารถในการเกิดต้นใหม่จะลดลงเหลือ 91 และ 64 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

Wu และ Li (1970) ศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ในข้าวพันธุ์ Taichung No.65 พบว่า การชักนำส่วนต่าง ๆของข้าวให้เกิดแคลลัสได้ดีนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2,4-D โดยใบอ่อนและข้อจะเกิดแคลลัสในอาหารที่มี 2,4-D 8 มก/ล รากจะเกิดแคลลัสในอาหารที่มี 2,4-D 0.5 มก/ล ใบเลี้ยง (scutellum) จะเกิดแคลลัสในอาหารที่มี 2,4-D 6 มก/ล กาบหุ้มยอดอ่อน (coleoptile) จะเกิดแคลลัสในอาหารที่มี 2,4-D 2 มก/ล

Hendre และคณะ (1975) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารต่อการเจริญของแคลลัสพบว่า อาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแคลลัสข้าว คือ อาหารสูตร MS ความเข้มข้นของวุ้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.8 เปอร์เซนต์ ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมเท่ากับ 2 เปอร์เซนต์ pH ของอาหารที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.0-8.0 นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนก็มีผลต่อการเจริญของแคลลัสคือ แคลลัสจะเจริญได้ดี ถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) 100 มก/ล แต่ถ้าใช้ปริมาณสูงถึง 1500 มก/ล จะเป็นอันตรายต่อแคลลัส สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินนั้นพบว่า แคลลัสจะเจริญได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D, IBA และ NAA ส่วน kinetinไม่มีผลต่อการเจริญ ถ้าใช้ปริมาณ 0.1 มก/ล จะไปยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้

Maeda (1980) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Aichi asahi และ Kinmaze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซนต์ โดยพบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 15 วัน จะเกิดแคลลัสบริเวณ scutellum และหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 20 เท่า นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าแคลลัสในข้าวมี 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า non-embryogenic (NE) ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างยาว ขนาดใหญ่ เกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ ไม่มีคุณลักษณะเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) คือ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนแคลลัสอีกชนิดหนึ่ง เรียกว่า embryogenic (E) ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กเกาะกันแน่น มีสีขาวหรือฟางอ่อน ผิวแห้งมีปุ่มเล็ก ๆจำนวนมาก เจริญเติบโตช้ากว่าแคลลัสชนิด NE สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย แม้จะผ่านการเพาะเลี้ยงชั่วระยะเวลาหนึ่ง

Reddy (1981) พบว่าเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของข้าวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D 2 มก/ล สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ และเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่เติม NAA 2 มก/ล และ kinetin 4 มก/ล แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้

Dykes และ Nabors (1986) พบว่า ชิ้นส่วนของอัญพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงแล้วมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสชนิด E สูงสุด คือ scutellum และพบว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างแคลลัสชนิด E และการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ ได้แก่ จีโนไทป์ (genotype) ของพืช, อายุและชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง, องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยง, สภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง และ สภาพของอาหารสังเคราะห์

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวอินดิกาพันธุ์ IR 8 และ Pokkali ข้าวจาโปนิกาพันธุ์ G-159 และ Calrose 76 และข้าวลูกผสมระหว่างอินดิกากับจาโปนิกา คือ Mahsuri พบว่าปัจจัยภายนอก เช่น ความเข้มแสง มีความสำคัญต่อการเกิดแคลลัส โดยข้าวพันธุ์ Calrose 76, G-159 และ Pokkali สามารถเกิดแคลลัสชนิด E ได้มากเมื่อเลี้ยงในที่มืด ตรงข้ามกับข้าวพันธุ์ Mahsuri และ IR 36 ต้องเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง จึงจะเกิดแคลลัสชนิด E ได้มาก นอกจากนี้ยังพบว่าทริฟโทเฟน (tryptophan) มีส่วนช่วยในการชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด E ในข้าวพันธุ์ Calrose 76, IR 8 และ Pokkali แต่ไม่มีผลต่อข้าวพันธุ์ G-159 และ Mahsuri

Vajrabhaya และคณะ (1986) ศึกษาผลของการชักนำและการเจริญของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ RD 8, RD 23, RD 25, ขาวดอกมะลิ 105, ขาวตาแห้ง และเหนียวสันป่าตอง พบว่า อาหารสังเคราะห์ที่ดีที่สุดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสคือ LS เติม 2,4-D 2-4 ppm และ kinetin 0.3 ppm เลี้ยงในที่มีแสงสว่าง อุณหภูมิ 23-26 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำมะพร้าวและทริฟโทเฟนไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

ในปีเดียวกัน Vajrabhaya และคณะ ได้ศึกษาผลของออกซินและไซโทไคนินต่อการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัส พบว่า การตอบสนองต่อออกซินและไซโทไคนินแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ 17.5 เปอร์เซนต์ เมื่อเติม IAA 0.5 ppm และ kinetin 0.4 ppm ส่วน RD 23 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ชักนำให้เกิดต้นได้ยากนั้นจะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด (12.5 เปอร์เซนต์) เมื่อใช้ IAA 0.5 ppm และ BAP 0.1 ppm

Raina และคณะ (1987) ศึกษาการเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 พบว่า สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสคือ MS ที่เติม 2,4-D หรือ 2,4,5-T 1 หรือ 2 มก/ล เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมทริฟโทเฟน 50-100 มก/ล แคลลัสสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

เผดิมและคณะ (2532) เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ 2,4-D, NAA และ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ 2,4-D 2 มก/ล, NAA 2 มก/ล และkinetin 0.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด (33.33 เปอร์เซนต์) หลังจากย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากน้ำมะพร้าว และสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ประมาณ 30 เปอร์เซนต์

สุพรรณี (2532) เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ 2,4-D, NAA และ kinetin ความเข้มข้น 2, 2 และ 1 มก/ล ตามลำดับ ภายใต้สภาพมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเกิดแคลลัสเฉลี่ย 30.1 เปอร์เซนต์

ธิดารัตน์ (2533) หาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เอ็มบริโอสร้างแคลลัส ในข้าวพันธุ์ กข 21, กข 25, ปทุมธานี 60 และขาวดอกมะลิ 105 พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D 1.5 มก/ล เป็นสูตรที่เหมาะสมซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด embryogenic ได้ดีที่สุด ส่วนการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นนั้นพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมคือ MS เติม NAA 1 มก/ล และ kinetin 3 มก/ล โดยทำให้แคลลัสขาดน้ำเป็นเวลา 7 วันก่อนย้ายลงอาหาร

เผดิมและคณะ (2536) ชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าว โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์, เคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate) 1 ก/ล, NAA 3,4,5 มก/ล และ kinetin 0.5,1 มก/ล พบว่า เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงเจริญเป็นแคลลัสได้ดีกว่าในสภาพมืด แคลลัสที่ได้มีจุดสีเขียว (green spots) เกิดขึ้นที่ผิวด้วย เมื่อนำแคลลัสที่มีบริเวณจุดสีเขียวเกิดขึ้น ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์, เคซีนไฮโดรไลเสท 1 ก/ล และ kinetin 0,1,2,3 มก/ล เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่า แคลลัสของข้าวทุกพันธุ์สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดี จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า ข้าวแต่ละสายพันธุ์มีการเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นอ่อนในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

สุรินทร์และคณะ (2537) เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ เคซีนไฮโดรไลเสท 1 ก/ล 2,4-D, NAA และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin อย่างละ 1 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (62.5 เปอร์เซนต์) เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MS เติม kinetin 2 มก/ล พบว่า แคลลัสสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ 30 เปอร์เซนต์

ประภาและพรทิพย์ (2537) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต, สารอินทรีย์ และปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการชักนำให้เอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ พบว่า เอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 2 มก/ล ร่วมกับ เคซีนไฮโดรไลเสท 300 มก/ล ในสภาพที่มีแสง สามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูง (96.3 เปอร์เซนต์) และแคลลัสมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด (9.4 มม) แคลลัสเมื่อทำให้แห้งโดยการพักไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วันแล้วจึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่า สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าแคลลัสที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารทันทีโดยไม่ทำให้แคลลัสแห้งก่อน สำหรับอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นมี 2 สูตรคือ MS เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 4 มก/ล ซึ่งสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดได้ในอัตราสูงสุด (45.8 เปอร์เซนต์) แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.9 ยอด และ สูตร MS เติม IAA 1 มก/ล, BA 4 มก/ล และ yeast extract 1 ก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดได้ 45.5 เปอร์เซนต์ แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 8.7 ยอด

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าว

โปรโตพลาสต์ (protoplast) คือ เซลล์พืชที่ถูกย่อยเอาผนังเซลล์ (cell wall) ออกไปโดยวิธีกล (mechanical isolation) หรือ โดยการใช้เอนไซม์ (enzymetic isolation) จึงเหลือเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) บาง ๆ เท่านั้น (Goh, 1993) ปัจจุบันการแยกโปรโตพลาสต์นิยมกระทำโดยการใช้เอนไซม์ เนื่องจากสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้อย่างสมบูรณ์และมีปริมาณมาก โดยการนำเนื้อเยื่อพืชแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลส (Cellulase) และเพคติเนส (Pectinase) อยู่ปนกัน เอนไซม์ทั้งสองจะย่อยสลายมิดเดิลลาเมลลา (middle lamella) ที่เชื่อมระหว่างเซลล์และผนังเซลล์พร้อม ๆกันไป ทำให้โปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์อย่างรวดเร็ว เนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของพืชสามารถใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ได้ เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบ ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และ ผล หรืออาจแยกได้จากเซลล์แขวนลอยและแคลลัส แต่เนื้อเยื่อมีโซฟิลล์ (mesophyll tissue) ของใบ และ เซลล์แขวนลอย เป็นที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากแหล่งทั้งสองให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงและโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดี โปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จะมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ภายใน 2-3 วัน หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์ และเจริญเป็นแคลลัสซึ่งสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในที่สุด (ประภา, 2535)

การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชจะประสบผลสำเร็จมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ แหล่งของโปรโตพลาสต์ ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ สารปรับแรงดันออสโมซิสหรือออสโมติคัม (osmoticum) สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ความมืด-สว่าง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส (pH) ความเร็วในการเขย่า และเวลาที่ใช้ในการบ่ม เป็นต้น

หลังจากแยกโปรโตพลาสต์ได้แล้ว ต้องมีการทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ (purification) เพื่อแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ (debris) ซึ่งนิยมใช้วิธีการกรองร่วมกับการปั่นแยก (filtration-centrifugation method) แต่การกรองมีข้อเสียคือ โปรโตพลาสต์อาจจะแตกได้ขณะผ่านรูตะแกรง วิธีนี้จึงไม่เหมาะกับโปรโตพลาสต์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์บาง เช่น

โปรโตพลาสต์จากใบจึงใช้วิธีการลอยตัว (floatation method) แทน ซึ่งทำได้โดยการนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการกรอง ผสมกับสารละลายน้ำตาลซูโครสที่เข้มข้น 0.3-0.6 โมลาร์ แล้วนำไปปั่นแยก โปรโตพลาสต์ซึ่งมีความหนาแน่นน้อยกว่าจะลอยตัวอยู่ข้างบน ส่วนเศษเซลล์ซึ่งหนักกว่าจะตกตะกอนอยู่ข้างล่าง (Lal และ Lal, 1990)

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ได้แก่ ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง (plating density) อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture medium) ชนิดของออสโมติคัม วิธีการเพาะเลี้ยง และสภาพการเก็บรักษาโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง (storage condition)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจาก โปรโตพลาสต์เป็นหน่วยของสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ก็ใช้ในการผลิตลูกผสม (somatic hybrid) ระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลกันโดยการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) การถ่ายจีนหรือดีเอนเอที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการให้กับเซลล์พืชโดยตรง การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ และเป็นตัวทดสอบความอ่อนแอหรือทนทานต่อโรค (ประภา, 2535)

ได้มีการทดลองแยกโปรโตพลาสต์ของข้าวเป็นครั้งแรกในปี 1971 โดย Maeda ซึ่งสามารถแยกโปรโตพลาสต์จากรากข้าวชนิดจาโปนิกาได้เป็นผลสำเร็จ

ต่อมา ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวกันอย่างกว้างขวางโดยส่วนใหญ่มักทำการศึกษาในข้าวชนิดจาโปนิกา ดังนี้

Maeda และ Hagiwara (1974) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ราก และแคลลัส ของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Aichi asahi โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส,มาเซอโรไซม์ และเดกซ์แตรนซัลเฟต (dextran sulfate) มีน้ำตาลแมนนิทอลเป็นออสโมติคัม ปั่นไว้ในสภาพมืด อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่า ความเข้มข้นของเซลลูเลสที่เหมาะสมต่อทุกชิ้นส่วนคือ 5 เปอร์เซนต์

สวนมาเซอโรไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.5-1.5 เปอร์เซนต์ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ, ราก และแคลลัส คือ 0.5,1.5 และ 1 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ สำหรับน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ, ราก และแคลลัส คือ 0.7, 0.6 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ เวลาในการย่อยที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าอายุของต้นกล้าและแคลลัสมีความสำคัญต่อการแยกโปรโตพลาสต์ โดยในต้นกล้าที่อายุน้อยจะได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าต้นกล้าที่มีอายุมาก และโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสอายุ 15-20 วันมีจำนวนมากที่สุด ขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสและรากมีขนาดใหญ่กว่าที่แยกได้จากใบ

Deka และ Sen (1976) ทำการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จากกาบใบ (leaf sheath) ของข้าวที่ปลูกในสภาพแปลงปลูก พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมงและแบ่งเซลล์ภายใน 5 วันหลังจากเพาะเลี้ยง ค่าความถี่ในการเกิดแคลลัสเท่ากับ 30 เปอร์เซนต์ แคลลัสเจริญพัฒนาไปเป็นรากเท่านั้นไม่มีการเจริญเป็นยอด

ในปี 1985 Fujimura และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวจาโปนิกาเป็นครั้งแรก

Yamada และคณะ (1986) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวจาโปนิกา จำนวน 25 พันธุ์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส"โอโนซูกะ"อาร์เอส (Cellulase "Onozuka" RS) 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ อาร์-10 (Macerozyme R-10) 2 เปอร์เซนต์, เพคโตไลเอส วาย 23 (Pectolyase Y 23) 0.1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 1 เปอร์เซนต์ ซึ่งละลายอยู่ใน washing medium (อาหารเหลวสูตร LS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติม calf serum 0.8 เปอร์เซนต์, แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 80 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 0.125 มิลลิโมลาร์, เมส (MES) 0.5 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 0.3 โมลาร์ pH 5.6) บ่มไว้ในสภาพมืด โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลานาน 9 ชม นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร RY-2 ที่มีสารอนินทรีย์ (inorganic elements) เช่นเดียวกับอาหารสูตร LS และมีวิตามินและสารอินทรีย์ (organic elements) เช่นเดียวกับอาหารสูตร Kao (1974) เก็บโปรโตพลาสต์

ไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วางทิ้งไว้โดยไม่ต้องเขย่า จากการทดลองพบว่า ชนิดของออสโมติคัม และ ความเข้มข้นของ NH_4^+ และ Fe_3^+ ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ โดยโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแมนนิทอลและซอร์บิทอลเป็นออสโมติคัม จะตายภายหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ส่วนในอาหารที่มีกลูโคสและซูโครสเป็นออสโมติคัม โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์เจริญเป็นโคโลนีได้แต่กลูโคสให้เปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสูงกว่าซูโครส สำหรับ NH_4^+ และ Fe_3^+ถ้าใช้ในความเข้มข้นปกติพบว่า โปรโตพลาสต์ไม่มีการเจริญเป็นโคโลนี แต่ถ้าลดความเข้มข้นลงโปรโตพลาสต์สามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ เมื่อย้ายโคโลนีไปยังอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ได้ต้นข้าวปกติจำนวน 8 ต้น จากข้าวเพียง 2 พันธุ์เท่านั้น

Toriyama และคณะ (1986) แยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากยับละอองเกสรของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Yamahoushi พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร AA (amino acid) ที่มีกรดอะมิโน 4 ชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ สามารถนำมาแยกได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร B_5 ดัดแปลงที่มีไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าโปรโตพลาสต์มีการเจริญเป็นแคลลัสได้มาก แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่นและสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร N_6 ที่เติม 2,4-D 2 มก/ล, kinetin 1 มก/ล และซูโครส 3 เปอร์เซนต์ ต้นข้าวที่ได้มีทั้งที่เป็นต้นแฮพลอยด์ (haploid) และดิพลอยด์ (dipliod) ความสมบูรณ์ของเมล็ดมีค่าผันแปรระหว่าง 0-95 เปอร์เซนต์

Kyozuka และคณะ (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของข้าวชนิดจาโปนิกา โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีเซลลูเลส 4 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ วางไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่านาน 3-4 ชั่วโมงสำหรับเซลล์แขวนลอย และ 5-7 ชั่วโมงสำหรับแคลลัส ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยวิธี agarose bead method โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลงที่มีสารอนินทรีย์ของสูตร R_2 (Ohira และคณะ,1973 อ้างโดย Kyozuka และคณะ,1987), $FeSO_4$ 5.6 มก/ล, Na_2 EDTA 7.5 มก/ล, วิตามินจากสูตร MS, 2,4-D 2 มก/ล และซูโครส 0.4 โมลาร์

pH 5.6 พบว่า ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยอาศัยเซลล์แขวนลอยของ *Triticum monococcum* เป็นเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cell) ช่วยให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์เจริญเป็นแคลลัสได้ถึง 10 เปอร์เซนต์ ความถี่ในการเกิดแคลลัสขึ้นกับแหล่งโปรโตพลาสต์และจีโนไทป์

Li และ Murai (1990) ศึกษาสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากโปรโตพลาสต์ของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Nipponbare และ Taipei 309 โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตร N_6 ที่ใช้เพาะเลี้ยงยับละอองเกสรของข้าว กับอาหารสูตร MS , RY-2 , modified R_2 และ AA ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวได้เป็นผลสำเร็จ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารทั้ง 5 สูตรพบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมาคือในอาหารสูตร modified R_2, RY-2, MS และ AA ตามลำดับ เมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าเซลล์ในอาหารสูตร N_6 ให้โปรโตพลาสต์จำนวนมากที่สุด และโปรโตพลาสต์มากกว่า 95 เปอร์เซนต์มีไซโทพลาสซึมหนาแน่น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยอาศัยเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 มีอัตราการเจริญเป็นแคลลัสสูงสุด (7.3 เปอร์เซนต์) รองลงมาคือ ในสูตร R_2 (4.6 เปอร์เซนต์), RY-2, MS และ AA ตามลำดับ เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดและรากได้ภายใน 20 วัน และเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ภายใน 50 วัน อัตราการเกิดต้นเท่ากับ 67 เปอร์เซนต์ จำนวนยอดต่อแคลลัสเฉลี่ยเท่ากับ 7 ยอด

Xiang (1993) ได้ทำการศึกษาถึงสูตรอาหาร และ วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวจาโปนิกา โดยใช้อาหารสูตร simplified protoplast culture medium (SPCM) ซึ่งดัดแปลงมาจากสูตร MS โดยลดสารอนินทรีย์ลงครึ่งหนึ่ง เติม 2,4-D 0.5 มก/ล, NAA 1 มก/ล และ 6-BAP 0.2 มก/ล ใช้ซูโครสและมอลโตสเป็นออสโมติคัม เพาะเลี้ยงด้วยวิธี agarose bead method พบว่า โปรโตพลาสต์มีอัตราการแบ่งเซลล์ประมาณ 26 เปอร์เซนต์ และอัตราการเจริญเป็นแคลลัสประมาณ 14.8 เปอร์เซนต์ และพบว่าการใช้มอลโตสร่วมกับซูโครสเป็นออสโมติคัมช่วยในการแบ่งเซลล์และเจริญเป็นแคลลัสได้ดีกว่าเมื่อใช้ซูโครสเพียงอย่างเดียว การชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นโดยใช้อาหารสูตร MS และทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก 2-3 สัปดาห์ ช่วยให้แคลลัสเจริญเป็นต้นได้มากกว่ากรณีที่ไม่มีการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่

สำหรับข้าวชนิดอินดิกาซึ่งมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดในโลก และเป็นข้าวที่ใช้บริโภคมากที่สุด ในการใช้โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้น การศึกษาถึงวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับโปรโตพลาสต์ของข้าวอินดิกานับว่ามีความสำคัญ โดยได้มีผู้ทำการศึกษาดังนี้

ในปี ค.ศ.1988 Kyozuka และคณะ ได้ทำการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิกาจำนวน 14 พันธุ์ เป็นครั้งแรก โดยใช้สารละลายเอนไซม์และสภาวะในการบ่มเช่นเดียวกับที่ทดลองในข้าวจาโปนิกา (Kyozuka และคณะ, 1987) จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปทำการเพาะเลี้ยง โดยอาศัยเซลล์ที่เลี้ยงที่ได้จากเซลล์แขวนลอยของข้าวจาโปนิกาใช้อาหารสูตร R_2 ที่เติม 2,4-D 2 มก/ล และซูโครส 0.4 โมลาร์ เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที พบว่ามีโปรโตพลาสต์จากข้าวจำนวน 4 พันธุ์เท่านั้น ที่เจริญเป็นแคลลัสชนิดเอ็มบริโอเจนิกได้ (2-4.5 เปอร์เซนต์) โดยโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3-5 วันและเจริญเป็นแคลลัสภายใน 2 สัปดาห์ ความสามารถในพัฒนาเป็นต้นใหม่จะแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์ (2-35 เปอร์เซนต์)

Lee และคณะ(1989) สามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวอินดิกาพันธุ์ IR 54 จนเจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย ทำให้แยกได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากถึง $1x10^6$ - $15x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซนต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร Kao ดัดแปลง โดยวางโปรโตพลาสต์บน Millipore filter ซึ่งอยู่บนผิวหน้าของเซลล์แขวนลอยของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Calrose 76 ที่ใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยง พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ 0.5-3 เปอร์เซนต์ ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่อาศัยเซลล์ที่เลี้ยงไม่มีการเจริญเป็นแคลลัส เมื่อคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะเป็นเอ็มบริโอเจนิกไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร N_6 ที่เติม BAP สามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูงสุดถึง 80 เปอร์เซนต์ และพบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสของเอ็มบริโออ่อน (immature embryo) สามารถเจริญเป็นต้นได้ดีเช่นเดียวกับโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอย เมื่อเพาะเลี้ยงโดยวิธีเดียวกัน

Wang และคณะ (1989) สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้จากโปรโตพลาสต์ของข้าวอินดิกาและสายพันธุ์ที่เป็น cytoplasmic male sterile โดยทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เพคโตไลเอส วาย-23 0.5 เปอร์เซนต์, เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, เมส 5 มิลลิโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ 7 มิลลิโมลาร์ซึ่งละลายอยู่ในอาหารสูตร N_6 ที่มีกลูโคส 0.5 โมลาร์เป็นออสโมติคัม pH 5.6 เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D 1.5 มก/ล, zeatin 0.2 มก/ล, เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก/ล, กลูโคส 0.5 โมลาร์ และ อะกาโรส (agarose) 0.3 % ไว้ในสภาพมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน และเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ (colony) หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 25 วัน จากการศึกษาชนิดของออสโมติคัมโดยใช้น้ำตาลซอร์บิทอล แมนนิทอล และกลูโคส พบว่า อัตราการแบ่งเซลล์จะมากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นออสโมติคัม สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสชนิดเอ็มบริโอเจนิกนั้น ต้องย้ายกลุ่มเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D และ zeatin หรือ BA เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสที่ได้สามารถเจริญเป็นต้นสีเขียวปกติเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่เติม zeatin 1-2 มก/ล

Datta และคณะ (1992) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิกาพันธุ์ IR 72 และเพาะเลี้ยงด้วยวิธี agarose bead method โดยไม่อาศัยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 เติมโพรลีน (proline) 1 ก/ล , 2,4-D 1.5 มก/ล และ ซูโครส 0.4 โมลาร์ พบว่าโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 วัน และเจริญเป็นแคลลัสภายใน 12-16 วัน เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin 2 มก/ล, NAA 1 มก/ล และซูโครส 3 เปอร์เซนต์ แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้จำนวน 227 ต้น เมื่อย้ายต้นข้าวไปปลูกลงดินภายใต้สภาพเรือนกระจก พบว่า มีบางต้นเท่านั้นที่เจริญเติบโตปกติจนออกดอกและให้เมล็ดได้

Timothy และ Rangasamy (1993) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิกาพันธุ์ IR 50 โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซนต์ , แมกนีเซียมซัลเฟต 300 มก/ล , แคลเซียมคลอไรด์ 100 มก/ล, โปแทสเซียมคลอไรด์ 100 มก/ล , เมส 5 มิลลิโมลาร์ และ แมนนิทอล 0.5 โมลาร์

Central Library
Prince of Songkla University

จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีก่อน แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงโดยวิธี feeder layer technique ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 1 มก/ล , kinetin 0.5 มก/ล , แมนนิทอล 0.5 โมลาร์ , น้ำมะพร้าว 7 เปอร์เซนต์ และซูโครส 2 เปอร์เซนต์ พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง แบ่งเซลล์ครั้งแรกในวันที่ 5 และเจริญเป็นแคลลัสภายใน 6 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มก/ล, NAA 1 มก/ล และ ซูโครส 3 เปอร์เซนต์ สามารถเจริญเป็นต้นข้าวปกติ และให้เมล็ดที่สมบูรณ์

Yin และคณะ (1993) พบว่า ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิกา นอกจากความแตกต่างทางพันธุกรรมแล้ว ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดต้นได้แก่ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย, การเติม ABA ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยก่อนนำไปแยกโปรโตพลาสต์, วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และ การ preculture แคลลัสก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น จากการพัฒนาวิธีการเหล่านี้ ช่วยให้โปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเป็นแคลลัสได้ โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์พี่เลี้ยง และแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวปกติและให้เมล็ดที่สมบูรณ์ได้

Jain และคณะ (1995) ทำการแยกโปรโตพลาสต์ของข้าวชนิดอินดิกาพันธุ์ Pusa Basmati 1 และ Jaya และข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Taipei 309 จากเซลล์แขวนลอยซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร R_2 ดัดแปลงเติมโพรลีน 560 มก/ล และมอลโตส 1 เปอร์เซนต์ เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้โดยวิธี feeder layer technique ใช้เซลล์แขวนลอยของ *Lolium multiflorum* และ *Oryza ridleyi* เป็นเซลล์พี่เลี้ยง พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยอาศัยเซลล์พี่เลี้ยงสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ โดย *L.multiflorum* ช่วยให้เกิดแคลลัสได้มากกว่า *O. ridleyi* ถึง 6 เท่า ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่อาศัยเซลล์พี่เลี้ยงไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัส ในการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มก/ล และ NAA 0.5 มก/ล ร่วมกับน้ำตาลซูโครสและมอลโตสความเข้มข้นอย่างละ 1.5 เปอร์เซนต์ ช่วยเพิ่มอัตราการเกิดยอดสีเขียวได้ถึง 44 เปอร์เซนต์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

2. เพื่อศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว คือ
   - ระดับออสโมลาริตี้
   - ความเร็วในการเขย่า
   - ชนิดของเอนไซม์
   - ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่เหมาะสม

3. เพื่อศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว คือ
   - วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์
   - ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ ข้าว (*oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เมล็ดข้าวเปลือกจากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ที่มีอายุการเก็บรักษาไม่เกิน 1 ปี

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ

- เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ และ 95 เปอร์เซนต์

สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- เอธิลแอลกอฮอล์, คลอรอกซ์ และสารเปียกใบ ทวีน 20 (tween 20)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์

-สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (MS), Linsmaier และ Skoog (LS) และ RY-2 ดัดแปลง (ดูภาคผนวก)

-สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D, kinetin, IAA และ BA

สารเคมีที่ใช้ในการแยกและตรวจสอบโปรโตพลาสต์

-เอนไซม์ ได้แก่ Cellulase "ONOZUKA"R-10 (Yakult Honsha Co.,Ltd. Lot#201050), Driselase (Kyowa Hakko Co.,Ltd.Lot#4111) และ Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co.,Ltd.Lot# 202018)

-สารเคมีที่ใช้ปรับระดับแรงดันออสโมติก ได้แก่ น้ำตาลแมนนิทอล

-สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม salt solution ได้แก่ เมส (MES), แคลเซียม-คลอไรด์ และโปแทสเซียมคลอไรด์

-สารเคมีสำหรับย้อมตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (fluorescein diacetate, FDA) และ แคลคอฟลอร์ไวท์ (calcoflour white, CFW) ตามลำดับ

เครื่องแก้วและพลาสติก

ได้แก่ บีกเกอร์ ฟลาสก์ ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ขวดพลาสติก จานเลี้ยงเชื้อ กระบอกตวง ปิเปต พาสเจอร์ปิเปต หลอดเซนตริฟิวก์ สไลด์ กระจกปิดสไลด์ และสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer slide)

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (stirring hot plate)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
- หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)
- เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด จานเลี้ยงเชื้อ
- เครื่องเขย่าที่ปรับอุณหภูมิได้ (incubator shaker)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องกรองจุลินทรีย์
- กระดาษกรอง (Millipore filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด (the Olympus inverted research microscope model IMT-2) ที่มีอุปกรณ์ระบบ fluorescence, phase contrast และ differential interference contrast (DIC)

โทรทัศน์พร้อมเครื่องวีดีโอบันทึกภาพ

เครื่องพิมพ์ภาพจากวีดีโอ (video printer)

ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงติดหลอดไฟโกรลักซ์ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการ

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ

1. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอข้าว
2. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอข้าว

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวที่นำมาเพาะเลี้ยง

นำเมล็ดข้าวเปลือกมาแกะเอาเปลือกออก แล้วฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ นาน 2 นาที แล้วย้ายไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ร่วมกับทวีน 20 จำนวน 3-4 หยด ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 10,20 และ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ โดยบันทึกเปอร์เซนต์เมล็ดที่ปนเปื้อน, เมล็ดที่ปลอดเชื้อ และอัตราการงอกของเมล็ด

1.2 การชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกออกแล้ว มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ นาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ที่ผสมสารเปียกใบทวีน 20 จำนวน 3-4 หยด นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ชุดแรกเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก/ล อย่างเดียว ชุดที่สองเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก/ล ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก/ล ชุดที่สามเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ใช้เมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ดในแต่ละสูตรอาหาร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลอง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยนับจำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส สังเกตลักษณะ และวัดขนาดของแคลลัส โดยในส่วนการบันทึกผลขนาดของแคลลัสจะใช้วิธีการให้คะแนนดังนี้

+	แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง < 3 มม
++	แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มม
+++	แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง > 5 มม

1.3 การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

นำเมล็ดข้าวที่แกะเปลือกออกแล้ว มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอ โดยใช้อาหารสูตรที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองที่ 1.2 เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ แบ่งแคลลัสที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นโดยทันที โดยไม่ผ่านการทำให้แห้ง (non-dehydrated calli) กลุ่มที่สองย้ายไปพักไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิด วางไว้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 7 วัน เพื่อทำให้แคลลัสแห้ง (dehydrated calli) แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สำหรับอาหารชักนำให้เกิดต้นนั้นใช้อาหารแข็ง

สูตร MS โดยแบ่งเป็น 3 ชุด ชุดแรกไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชุดที่ 2 เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1,2,3 และ 4 มก/ล ชุดที่สาม เติม IAA ความเข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1,2,3 และ 4 มก/ล วางขวดเพาะเลี้ยงไว้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยการนับจำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด ราก และจุดสีเขียว (green spot) และนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละแคลลัส โดยใช้สัญลักษณ์แทนดังนี้

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

G หมายถึง แคลลัสมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

2.1 การแยกโปรโตพลาสต์ข้าว

พืชทดลอง

ใช้กาบใบ (leaf sheath) จากต้นข้าวอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้กาบใบน้ำหนักสด 0.5 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร

วิธีเตรียมสารละลายเอนไซม์

1. เตรียม salt solution ที่ประกอบด้วย โปแทสเซียมคลอไรด์ 336 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 13.6 มิลลิโมลาร์ และเมส 3.59 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH 5.7

2. ละลายเอนไซม์และเติมน้ำตาลแมนนิทอลตามความเข้มข้นและปริมาตรที่ต้องการ

3. นำสารละลายเอนไซม์ไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วที่ระดับ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใสของสารละลายเอนไซม์ ทิ้งตะกอนไป

4. นำสารละลายเอนไซม์ให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์ โดยกรองผ่านกระดาษกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอ็นไซม์ไว้ในตู้เย็นที่ของแข็ง

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

1. นำต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 3 สัปดาห์ มาลอกเอากาบใบออก ชั่งกาบใบหนัก 0.5 กรัม หั่น (slice) ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (strips) ตามขวางของใบ ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 15x60 มิลลิเมตร

2. ดูดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนของกาบใบอยู่

3. นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 80 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

4. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ใช้พาสเจอร์ปิเปดูดสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีโปรโตพลาสต์อยู่ นำไปปั่นแยกส่วนด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ใช้พาสเจอร์ปิเปดูดสารละลายเอนไซม์ออก ล้างโปรโตพลาสต์ด้วยวอชชิ่งโซลูชั่น (salt solution ที่ผสมแมนนิทอลตามความเข้มข้นที่เหมาะสม) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม ทำซ้ำอีกครั้ง

6. แขวนลอยโปรโตพลาสต์ไว้ในวอชชิ่งโซลูชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการเก็บผลการศึกษา

ใช้พาสเจอร์ปิเปดูดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในสไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด ซึ่งมีปริมาตรข้างละ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร สุ่มนับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำนับจำนวนโปรโตพลาสต์ 10 ครั้ง บันทึกผล

วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ข้าว

1. <u>ระดับออสโมลาริตี้</u>

- ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอร์โรไซม์ 1 เปอร์เซนต์, ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ และมีแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม

- วางย่อยบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

- เก็บผลการศึกษาที่เวลา 3 ชั่วโมง

2. <u>ความเร็วในการเขย่า</u>

- ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอร์โรไซม์ 1 เปอร์เซนต์, ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ (จากผลการศึกษาในข้อ 1)

- วางย่อยบนเครื่องเขย่า ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 0, 40 และ 80 รอบต่อนาที

- เก็บผลการศึกษาที่เวลา 3 ชั่วโมง

3. <u>ชนิดของเอนไซม์</u>

- ใช้สารละลายเอนไซม์ 2 ชนิด ชนิดแรก (E_A) ประกอบด้วยเซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ ชนิดที่สอง (E_B) ประกอบด้วยเซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์ และมาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ สารละลายเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม

- วางย่อยบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที (จากการศึกษาในข้อ 2) ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

- เก็บผลการศึกษาที่เวลา 3 ชั่วโมง

4. <u>ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่เหมาะสม</u>

- ใช้สารละลายเอนไซม์ E_A (จากการศึกษาในข้อ 3) นำมาปรับความเข้มข้นของเซลลูเลสให้มีความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซนต์

- วางย่อยบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

- เก็บผลการศึกษาที่เวลา 3 ชั่วโมง

- ใช้สารละลายเอนไซม์ E_A ที่ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วมาทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยปมในสภาวะเดิม เก็บผลการศึกษาที่เวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

2.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

วิธีเตรียมโปรโตพลาสต์สำหรับการเพาะเลี้ยง

1. นำโปรโตพลาสต์มาทำให้สะอาดโดยวิธีการลอยตัว(floatation method) ด้วยสารละลายซูโครส 0.6 โมลาร์ โดยดูดสารละลายซูโครสปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ซึ่งแขวนลอยอยู่ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ค่อย ๆปล่อยโปรโตพลาสต์ลงบนผิวหน้าของสารละลายซูโครส นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2. หลังจากปั่นแยก สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น โปรโตพลาสต์จะแขวนลอยอยู่ในวอชชิ่งโซลูชั่นซึ่งอยู่ส่วนบน ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ที่ลอยอยู่ข้างบนมาล้างด้วยอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 1 ครั้ง ปั่นแยกด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม

3. ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ตามต้องการ ในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยง

วิธีตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

1. เตรียมสารละลายสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ (โดยชั่งฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต 0.25 กรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 50 มิลลิลิตร) จากนั้นหยดสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตลงในแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ทีละหยดจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากลักษณะใสเป็นขุ่น และมีความขุ่นคงที่

2. หยดสารละลายสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจากข้อ 1 จำนวน 1 หยด ลงบนตัวอย่างโปรโตพลาสต์ที่อยู่บนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3. หลังจากทิ้งไว้ประมาณ 2-5 นาที นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ใช้ dichloic mirror, exciter filter unit blue (B) และ barrier filter L-435 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว สุ่มนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แรืองแสง} \times 100}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

วิธีตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์

1. เตรียมสารละลายสีแคลคอฟลอร์ไวท์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ ในสารละลายแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ (โดยชั่งแคลคอฟลอร์ไวท์ 0.02 กรัม ละลายในสารละลายแมนนิทอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร)

2. หยดสารละลายสีแคลคอฟลอไวท์ จำนวน 1 หยด ลงบนตัวอย่างโปรโตพลาสต์ที่อยู่บนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3. นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ dichloic mirror, exciter filter unit ultraviolet (U) และ barrier filter O-515 โปรโตพลาสต์ที่มีผนังเซลล์จะเห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์

วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

1. <u>วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์</u>

นำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มก/ล, kinetin 0.5 มก/ล และซูโครส 0.4 โมลาร์ จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยงคือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 15x60 มิลลิเมตร ปริมาตรอาหาร 2 มิลลิลิตร พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม

วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวแบบหยด (sitting drop) โดยหยดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวลงบนจานเลี้ยงเชื้อจานละ 5 หยด พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม

วิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่มีวุ้น 0.4 เปอร์เซนต์

วิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนอาหารแข็ง

สังเกตลักษณะ และ การเจริญของโปรโตพลาสต์ทุกวันหลังจากการเพาะเลี้ยง ตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ บันทึกผลภายใน 2 สัปดาห์

2. <u>ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์</u>

นำโปรโตพลาสต์จำนวน $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ดังนี้

สูตร 1 LS เติม 2,4-D 1 มก/ล , kinetin 0.5 มก/ล และซูโครส 0.4 โมลาร์

สูตร 2 อาหารสูตรที่ 1 แทนที่ซูโครสด้วยกลูโคส 0.4 โมลาร์

สูตร 3 MS เติม 2,4-D 1 มก/ล , kinetin 0.5 มก/ล , แมนนิทอล 0.4 โมลาร์, ซูโครส 2 เปอร์เซนต์ และน้ำมะพร้าว 7 เปอร์เซนต์

สูตร 4 RY-2 ดัดแปลง เติม 2,4-D 2 มก/ล และกลูโคส 0.4 โมลาร์

บันทึกผลโดย เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ในอาหารแต่ละสูตรโดยสังเกตลักษณะของโปรโตพลาสต์ ตรวจสอบความมีชีวิต การสร้างผนังเซลล์ใหม่และการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด บันทึกผลภายใน 3 สัปดาห์

บทที่ 3

ผล

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอข้าว

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวที่นำมาเพาะเลี้ยง

จากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ร่วมกับทวีน20 จำนวน 3-4 หยด เป็นเวลา 10,20 และ 30 นาที พบว่าเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อนาน 30 นาที ให้เปอร์เซนต์เมล็ดข้าวที่ปลอดเชื้อมากที่สุดคือ 88 เปอร์เซนต์ รองลงมาได้แก่ที่เวลา 20 และ 10 นาที เมล็ดข้าวมีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อ 85 และ 67 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพบว่า เมล็ดที่ใช้เวลาในการฟอกฆ่าเชื้อนาน 10 นาที มีเปอร์เซนต์การงอกมากที่สุด (100 เปอร์เซนต์) รองลงมาได้แก่ ที่เวลา 20 นาที (99 เปอร์เซนต์) และ 30 นาที (95 เปอร์เซนต์) ตามลำดับ (ตาราง 1) ดังนั้นในการศึกษาการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว จึงเลือกใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งให้เปอร์เซนต์การปลอดเชื้อใกล้เคียงกับที่เวลา 30 นาที แต่เมล็ดมีเปอร์เซนต์การงอกมากกว่า

ตาราง 1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ที่เวลาต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ (นาที)	เมล็ดข้าวที่ปนเปื้อน (เปอร์เซนต์)	เมล็ดข้าวที่ปลอดเชื้อ (เปอร์เซนต์)	อัตราการงอก (เปอร์เซนต์)
10	33	67	100
20	15	85	99
30	12	88	95

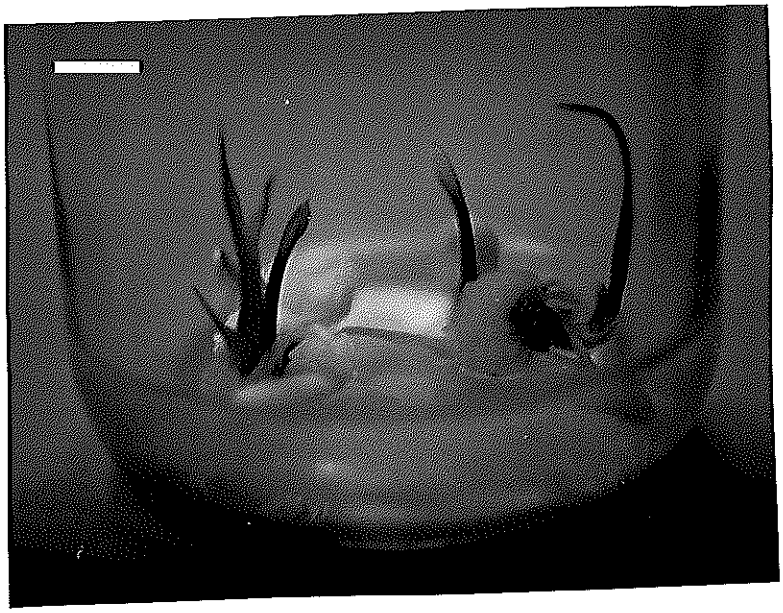
1.2 การชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอ

เมื่อนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น 3 ชุด คือ ชุดแรก เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1,2,3 และ 4 มก/ล ชุดที่ 2 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1,2,3 และ 4 มก/ล ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก/ล ชุดที่ 3 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1,2,3 และ 4 มก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ วางไว้ในที่มีแสง หลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ สังเกตเห็นแคลลัสเริ่มเกิดขึ้นตรงบริเวณเอ็มบริโอใกล้กับส่วนโคนของยอดอ่อน ต่อมาแคลลัสเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ยอดมีขนาดคงที่ (ภาพที่ 5-6) จึงนับจำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัสและวัดขนาดของแคลลัส พบว่า ในทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้เอ็มบริโอสร้างแคลลัสได้ เปอร์เซนต์เอ็มบริโอที่สร้างแคลลัสมีค่าอยู่ระหว่าง 80.0 ถึง 97.7 เปอร์เซนต์ (ตาราง 2) โดยการใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin สามารถชักนำให้เอ็มบริโอสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุด (92.9 ถึง 97.7 เปอร์เซนต์) รองลงมาได้แก่ การใช้ 2,4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าว (81.9 ถึง 94.1 เปอร์เซนต์) และ 2,4-D อย่างเดียว (80.0 ถึง 87.5 เปอร์เซนต์) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาขนาดของแคลลัส พบว่าสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก/ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ได้จำนวนมากที่สุด (35.9 เปอร์เซนต์) รองลงมาได้แก่ สูตรที่เติม 2,4-D 1 มก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ (23.1 เปอร์เซนต์) และ 2,4-D 2 มก/ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ (14.5 เปอร์เซนต์) ตามลำดับ

ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมี 2 แบบ แบบแรก แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีเหลืองครีม เซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact callus) (ภาพที่ 7) แบบที่สองแคลลัสมีลักษณะร่วนซุย สีครีม เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) (ภาพที่ 8) ในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวแคลลัสมีลักษณะแบบ friable ส่วนสูตรที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin และสูตรที่เติม 2,4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าว แคลลัสมีลักษณะทั้งแบบ friable และ compact แต่ส่วนใหญ่จะเป็นแบบ compact

จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในสภาพที่มีแสงบนอาหารสูตร LS เติม 2,4-D 1 มก/ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล เหมาะสำหรับการชักนำให้เอ็มบริโอสร้างแคลลัส เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอัตราที่สูง และแคลลัสที่ได้มีลักษณะแบบ compact ขนาดใหญ่จำนวนมากที่สุด



ภาพที่ 5 เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ; bar = 5 มม

ภาพที่ 6 เมล็ดข้าวจากภาพที่ 5 แสดงแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณเยื่อบริเวณใกล้กับส่วนโคนของยอดอ่อน ; bar = 5 มม

ตาราง 2 การเกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส สูตร LS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส	ขนาดของแคลลัส (เปอร์เซนต์)		
		+	++	+++
1. 1D[1/]	87.5	90.7	7.9	1.4
2. 2D	87.5	79.8	18.6	1.6
3. 3D	85.4	82.9	17.1	0
4. 4D	80.0	92.5	7.5	0
5. 1D+0.5K[2/]	92.9	34.6	29.5	35.9
6. 2D+0.5K	97.7	58.1	36.1	5.8
7. 3D+0.5K	96.4	88.9	8.6	2.5
8. 4D+0.5K	95.0	94.7	5.3	0
9. 1D+CW[3/]	81.9	40.4	36.4	23.1
10. 2D+CW	90.8	55.1	30.4	14.5
11. 3D+CW	94.1	73.4	21.9	4.7
12. 4D+CW	92.3	79.2	20.8	0

1/ D = 2,4-D หน่วยเป็น มก/ล

2/ K = kinetin หน่วยเป็น มก/ล

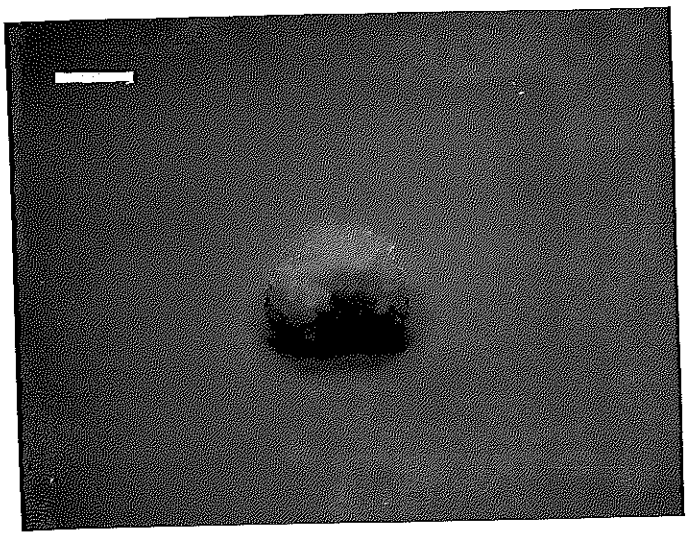
3/ CW = น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์

สัญลักษณ์ขนาดของแคลลัส

\+ แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง < 3 มม

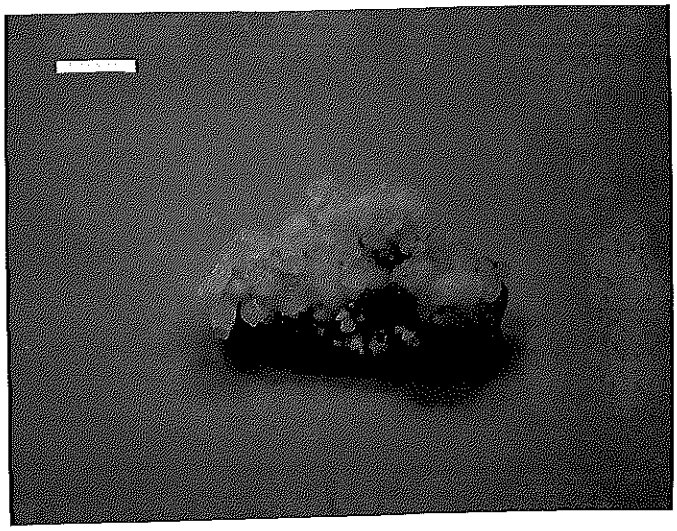
++ แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มม

+++ แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง > 5 มม



ภาพที่ 7 แคลลัสที่มีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีครีม เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

bar = 5 มม



ภาพที่ 8 แคลลัสที่มีลักษณะร่วนซุย เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

bar = 5 มม

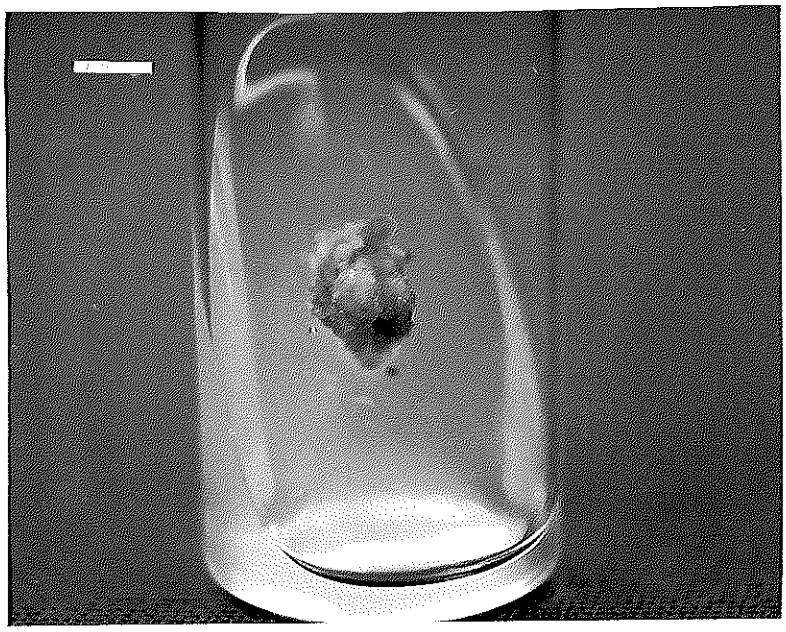
1.3 การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

เมื่อนำแคลลัสที่มีลักษณะแบบ compact ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 1.2 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงนานประมาณ 1 สัปดาห์ แคลลัสบางก้อนมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นที่บริเวณผิวแคลลัส (ภาพที่ 9) แคลลัสบางก้อนมีเฉพาะรากเกิดขึ้น (ภาพที่ 10) แคลลัสบางก้อนมีทั้งจุดสีเขียวและราก (ภาพที่ 11) ประมาณสัปดาห์ที่ 2 จุดสีเขียวจะพัฒนาไปเป็นยอด (ภาพที่ 12) แคลลัสบางก้อนพัฒนาไปเป็นทั้งยอดและราก (ภาพที่ 13) บางแคลลัสก็เกิดทั้งจุดสีเขียว ยอด และรากบนก้อนเดียวกัน (ภาพที่ 14) เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์ จุดสีเขียวบนแคลลัสบางก้อนไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอด ส่วนแคลลัสที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรือจุดสีเขียว บางก้อนมีการขยายขนาดโตขึ้น เซลล์เกาะกันแน่นสีเขียวอมเหลือง บางก้อนก็เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด

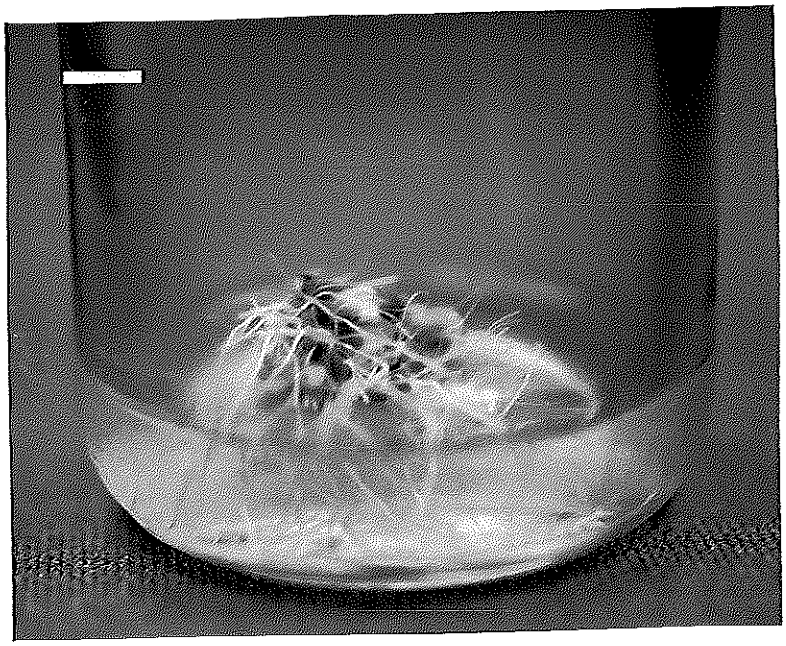
แคลลัสที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้พัฒนาเป็นต้นทันทีโดยไม่ผ่านการทำให้แห้งจะพัฒนาไปเป็นต้นในอัตราที่ต่ำมาก โดยในอาหารชุดที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ มีอาหารเพียง 2 สูตรที่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้คือ สูตรที่เติม kinetin ความเข้มข้น 1 และ 2 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นที่มีทั้งยอดและรากได้ 8.7 และ 9.1 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนในอาหารชุดที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ มีอาหารเพียงสูตรเดียวเท่านั้นที่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้ คือ สูตรที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นเฉพาะยอดได้เพียง 6.7 เปอร์เซนต์ ส่วนอาหารชุดที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่ต่ำเพียง 2.7 เปอร์เซนต์ (ตาราง 3) ในขณะที่แคลลัสซึ่งผ่านการทำให้แห้งแล้วเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้พัฒนาเป็นต้นทุกสูตรจะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอัตราที่สูงกว่ามาก โดยในอาหารชุดที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สูตรที่เติม kinetin ความเข้มข้น 4 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้มากที่สุดถึง 36.7 เปอร์เซนต์ แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.4 ยอด ส่วนในอาหารชุดที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สูตรที่เติม BA 3 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้มากที่สุดถึง 35.5 เปอร์เซนต์ แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 8.6 ยอด (ตาราง 4) ส่วนในอาหารชุดที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตก็สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้เช่นกันแต่มีอัตราต่ำเพียง 5.4 เปอร์เซนต์ แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.1 ยอด

ต้นข้าวที่ได้ทั้งหมดเป็นต้นที่มีสีเขียวปกติ ไม่พบยอดหรือต้นข้าวที่ขาดคลอโรฟิลล์ สำหรับยอดที่ไม่มีรากเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดรากได้ (ภาพที่ 15) เมื่อนำต้นข้าวที่มีรากสมบูรณ์ย้ายไปปลูกลงดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกทดลอง พบว่า ต้นข้าวทั้งหมดมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ สามารถออกรวงติดเมล็ดได้ (ภาพที่ 16-17)

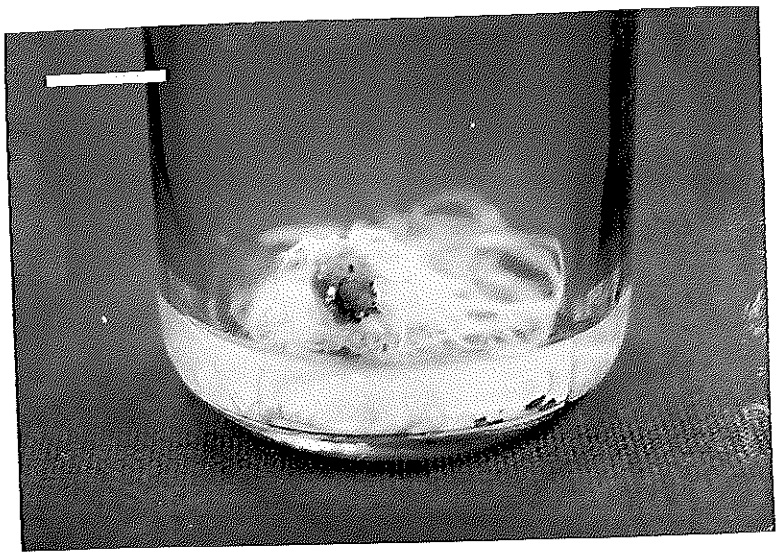
จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า การทำให้แคลลัสแห้งก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น จะช่วยทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้น และอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นมี 2 สูตร คือ สูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin 4 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้สูงสุด (36.7 เปอร์เซนต์) แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.4 ยอด และสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ 35.5 เปอร์เซนต์ แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.6 ยอด



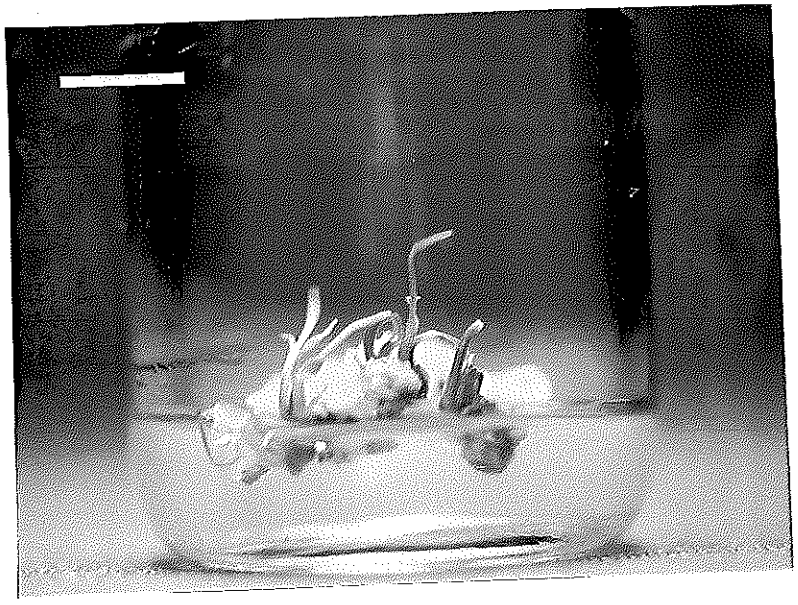
ภาพที่ 9 แคลลัสที่มีจุดสีเขียวเกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้น เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ; bar = 5 มม



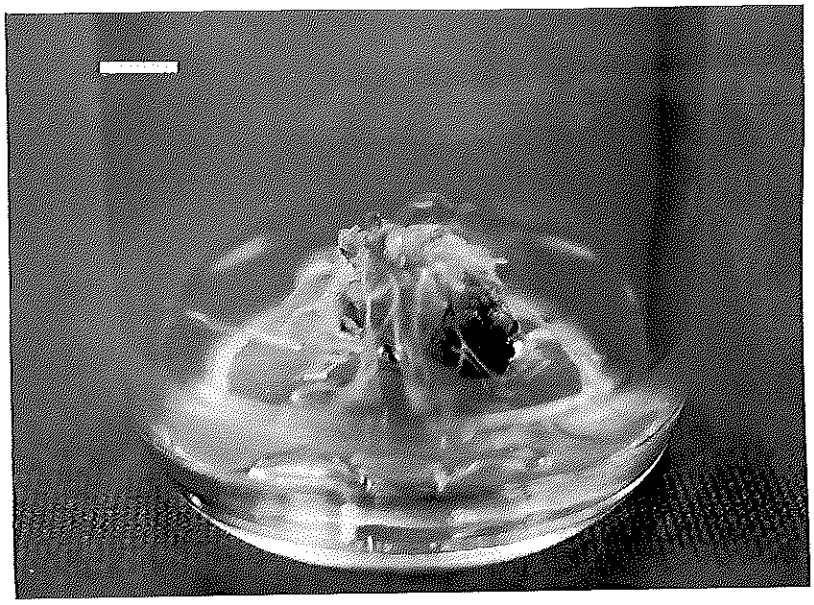
ภาพที่ 10 แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ; bar = 5 มม



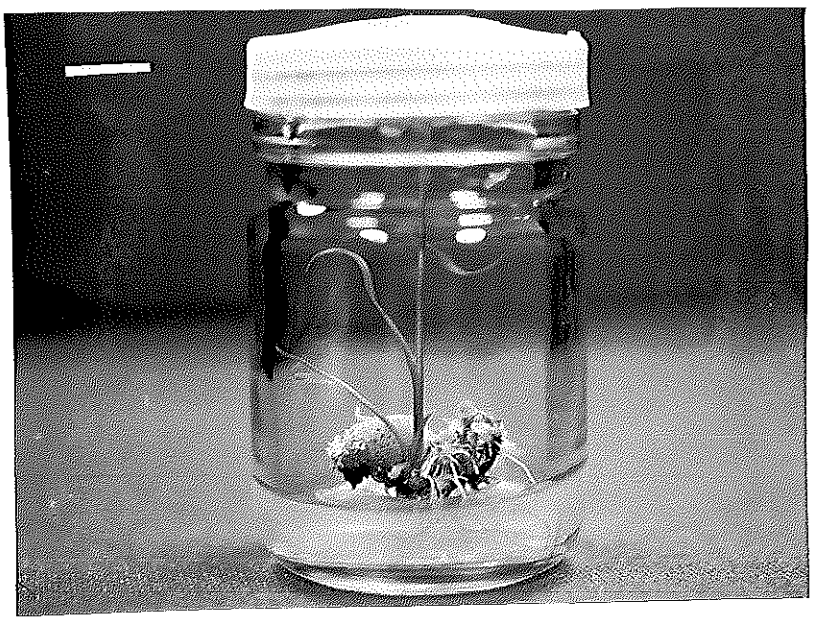
ภาพที่ 11 แคลลัสที่พัฒนาเป็นจุดสีเขียวและรากอยู่บนก้อนเดียวกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ; bar = 1 ซม



ภาพที่ 12 แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ; bar = 1 ซม



ภาพที่ 13 แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอดและรากบนก้อนเดียวกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดคัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ; bar = 5 มม



ภาพที่ 14 แคลลัสที่พัฒนาเป็นทั้งจุดสีเขียว ยอด และรากบนก้อนเดียวกัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดคัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

bar = 1 ซม

ตาราง 3 การพัฒนาของแคลลัสที่ไม่ผ่านการทำให้แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การพัฒนาของแคลลัส (เปอร์เซนต์)						จำนวนยอดต่อแคลลัส
		N	G	R	G+R	S	P	
1. -	32	76.3	10.5	10.5	0	2.7	0	1.3
2. CW[1/]+1K[2/]	30	60.9	0	17.4	13.0	0	8.7	5.1
3. CW+2K	31	77.3	0	13.6	0	0	9.1	4.2
4. CW+3K	31	90.9	0	9.1	0	0	0	0
5. CW+4K	30	90.9	0	9.1	0	0	0	0
6. 1I[3/]+1B[4/]	30	66.7	6.7	20.0	0	6.7	0	1.4
7. 1I+2B	33	88.2	5.9	5.9	0	0	0	0
8. 1I+3B	31	80.0	13.3	6.7	0	0	0	0
9. 1I+4B	31	87.5	6.3	6.2	0	0	0	0

1/ CW = น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์

2/ K = kinetin หน่วยเป็น มก/ล

3/ I = IAA หน่วยเป็น มก/ล

4/ B = BA หน่วยเป็น มก/ล

สัญลักษณ์การพัฒนาของแคลลัส

N แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

G แคลลัสมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น

R แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

S แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

P แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

ตาราง 4 การพัฒนาของแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การพัฒนาของแคลลัส (เปอร์เซนต์)						จำนวนยอดต่อแคลลัส
		N	G	R	G+R	S	P	
1. -	37	27.0	10.8	54.1	2.7	0	5.4	5.1
2. CW[1/]+1K[2/]	31	16.1	25.8	25.8	9.7	0	22.6	5.1
3. CW+2K	30	10.0	26.7	33.3	0	0	30.0	4.3
4. CW+3K	31	36.7	20.0	20.0	0	0	23.3	6.2
5. CW+4K	30	16.7	26.7	13.3	3.3	3.3	36.7	5.4
6. 1I[3/]+1B[4/]	31	3.2	51.6	9.7	12.9	6.5	16.1	7.1
7. 1I+2B	33	9.1	36.4	8.6	9.1	6.5	30.3	7.4
8. 1I+3B	31	16.1	29.0	9.7	0	9.7	35.5	8.6
9. 1I+4B	31	19.4	38.7	9.7	0	6.5	25.8	8.2

1/ CW = น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์

2/ K = kinetin หน่วยเป็น มก/ล

3/ I = IAA หน่วยเป็น มก/ล

4/ B = BA หน่วยเป็น มก/ล

สัญลักษณ์การพัฒนาของแคลลัส

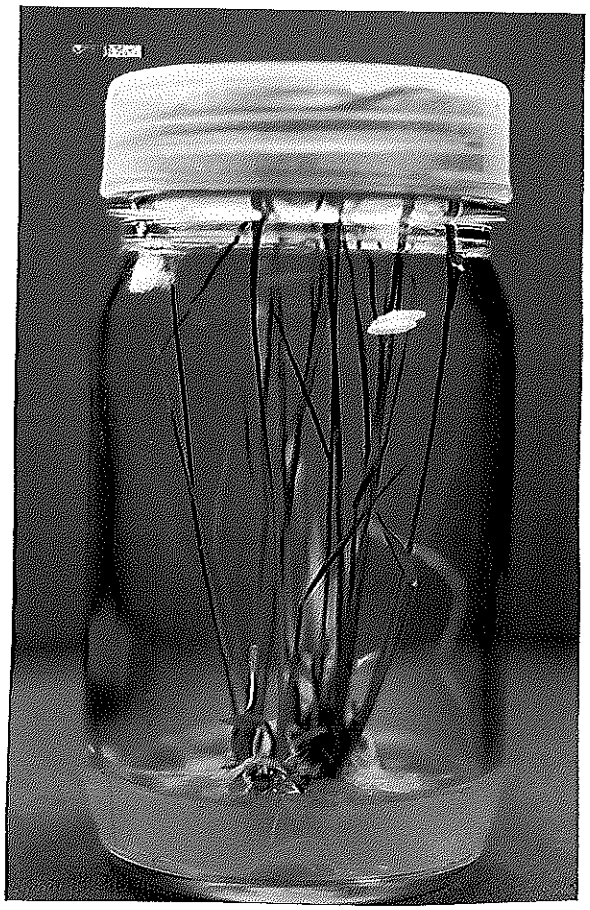
N แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

G แคลลัสมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น

S แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก



ภาพที่ 15 ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถเจริญเป็นต้นมีรากที่สมบูรณ์ได้ ; bar = 1 ซม

ภาพที่ 16 ต้นข้าวที่พัฒนามาจากแคลลัส เมื่อย้ายปลูกลงดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกทดลอง มีการเจริญเติบโตปกติ

ภาพที่ 17 ต้นข้าวจากภาพที่ 16 แสดงการออกรวงติดเมล็ด

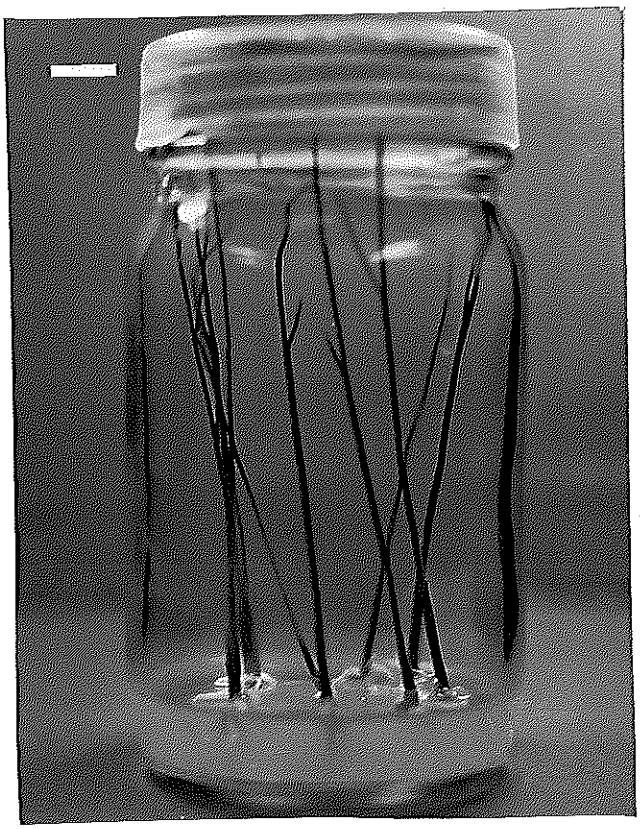
ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ข้าว

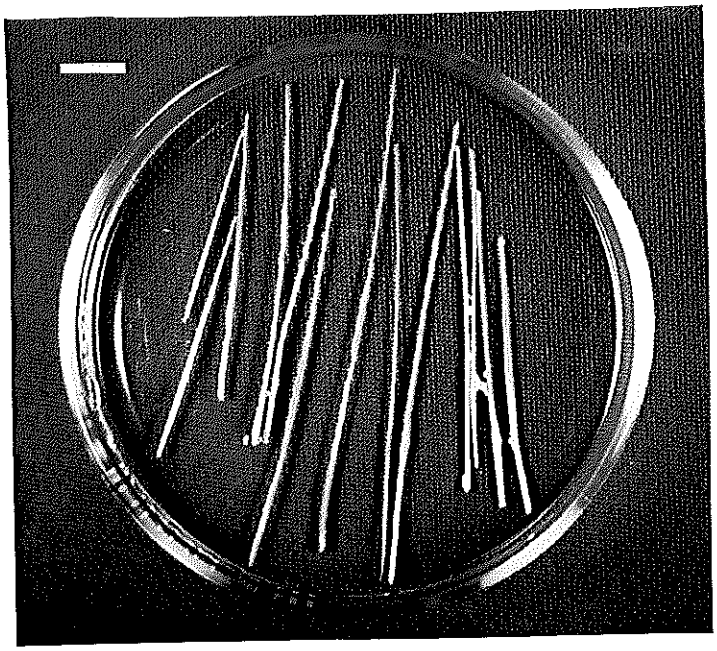
2.1.1 ระดับออสโมลาริตี้

เมื่อนำกาบใบจากต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 18-19) มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ มีแมนนิทอลเป็นออสโมติคัมโดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 โมลาร์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมง เริ่มมีโปรโตพลาสต์หลุดออกมาตรงบริเวณรอยตัดของกาบใบข้าว (ภาพที่ 20) เมื่อเวลาผ่านไปครบ 3 ชั่วโมง สังเกตลักษณะและนับจำนวนโปรโตพลาสต์ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งปรากฏว่า ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.2 โมลาร์ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยที่สุดเฉลี่ย 8.3×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด โปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะกลม เต่ง แต่มีจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แตกมาก สังเกตได้จากมีเมือคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วไปในวอชชิ่งโซลูชั่นที่โปรโตพลาสต์แขวนลอยอยู่ ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดเฉลี่ย 21.32×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง (ภาพที่ 21) ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.6 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ยังมีลักษณะกลม เต่ง แต่เริ่มมีการหดตัวของโปรโตพลาสต์ สังเกตได้จากบางโปรโตพลาสต์มีรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่กลม (ภาพที่ 22) ส่วนที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.8 โมลาร์ โปรโตพลาสต์มีการหดตัวเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 23) เนื่องจากระดับออสโมลาริตี้สูงเกินไป ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์

จากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่า ระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ 0.4 โมลาร์ ดังนั้นในการศึกษาสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ จึงเลือกใช้แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม



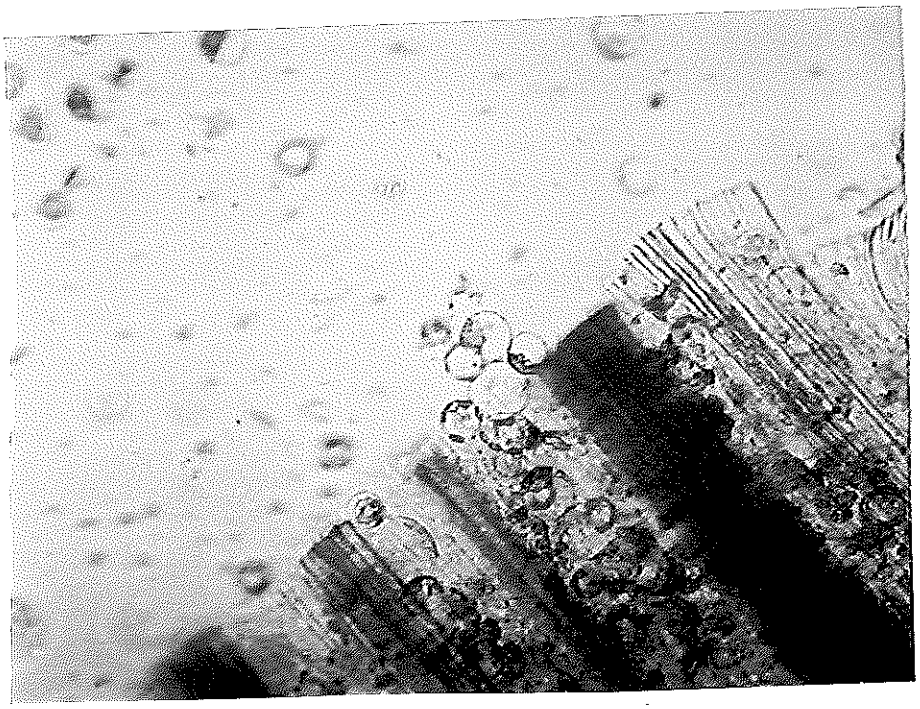
ภาพที่ 18 ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุ 3 สัปดาห์ สำหรับใช้เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ ; bar = 1 ซม



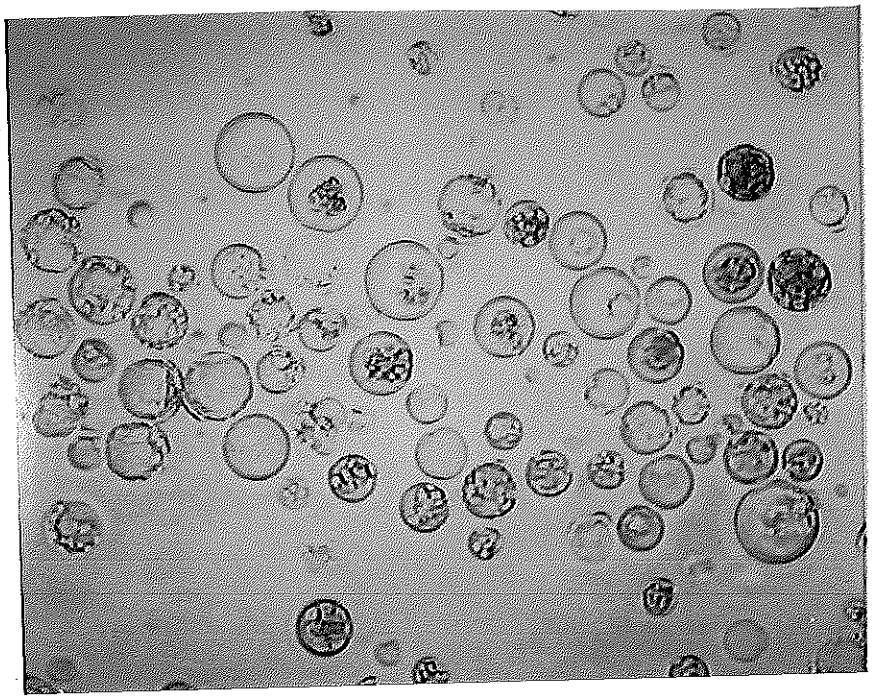
ภาพที่ 19 กาบใบ (leaf sheath) จากต้นข้าวอายุ 3 สัปดาห์ ที่นำมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ ; bar = 1 ซม

ตาราง 5 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกาบใบข้าว โดยใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัมที่ระดับออสโมลาริตี้ต่าง ๆ เมื่อวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

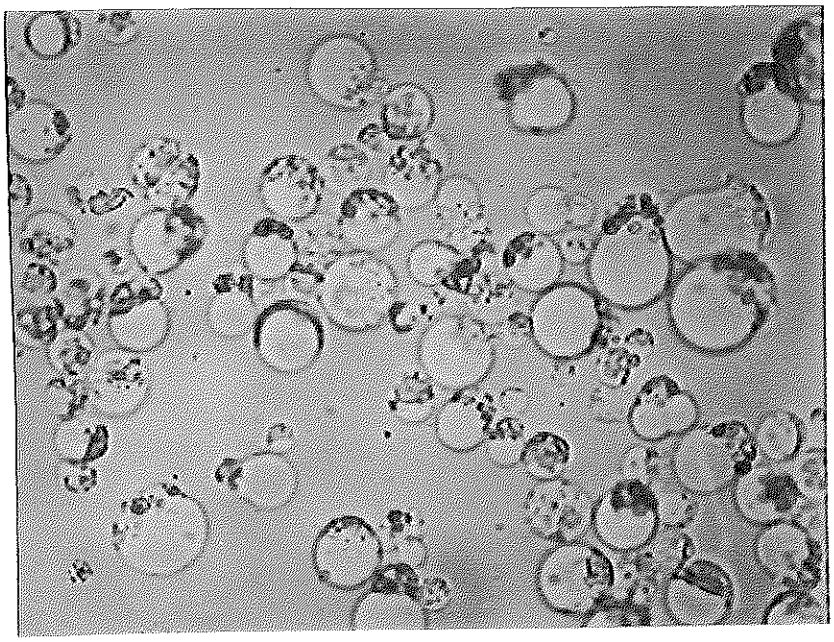
ระดับออสโมลาริตี้ (โมลาร์)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)				ลักษณะโปรโตพลาสต์
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$	
0.2	8.68	7.46	9.20	8.30±0.71	กลม เล็ง แตกมาก
0.4	19.78	22.84	21.36	21.32±0.71	กลม เล็ง แตกน้อย
0.6	18.64	19.72	17.84	18.73±0.77	กลม เล็ง บางอันหด รูปร่างบิดเบี้ยว
0.8	16.60	17.24	15.96	16.60±0.52	มีทั้งที่กลมและรูปร่างบิดเบี้ยวมีจำนวนมากขึ้น



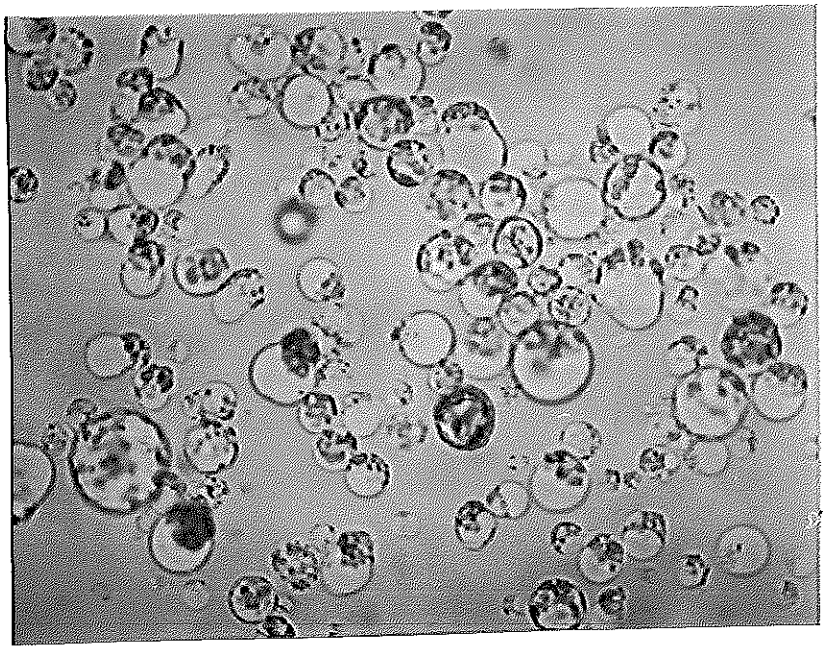
ภาพที่ 20 โปรโตพลาสต์หลุดออกมาตรงบริเวณรอยตัดของกาบใบข้าว ที่เวลา 1 ชั่วโมง (x250)



ภาพที่ 21 โปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว ในสารละลายเอนไซม์ที่มีแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ (x250)

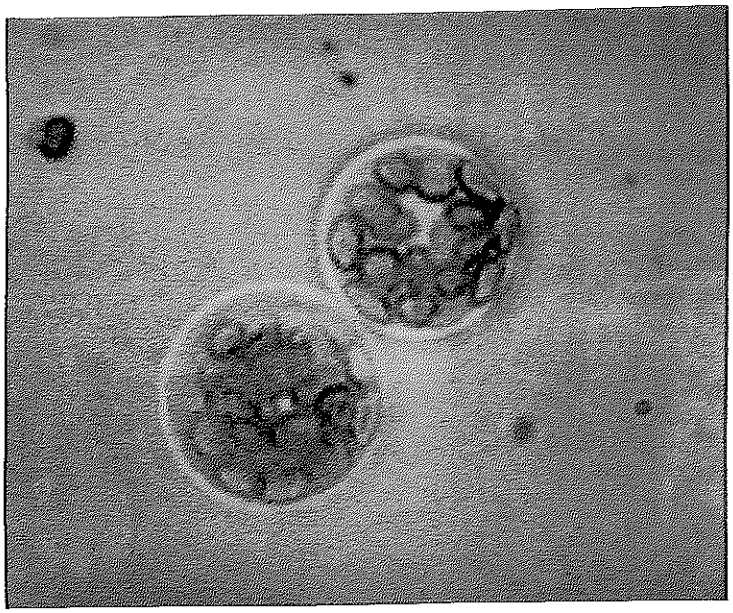


ภาพที่ 22 โปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว ในสารละลายเอนไซม์ที่มีแมนนิทอล 0.6 โมลาร์ (x250)

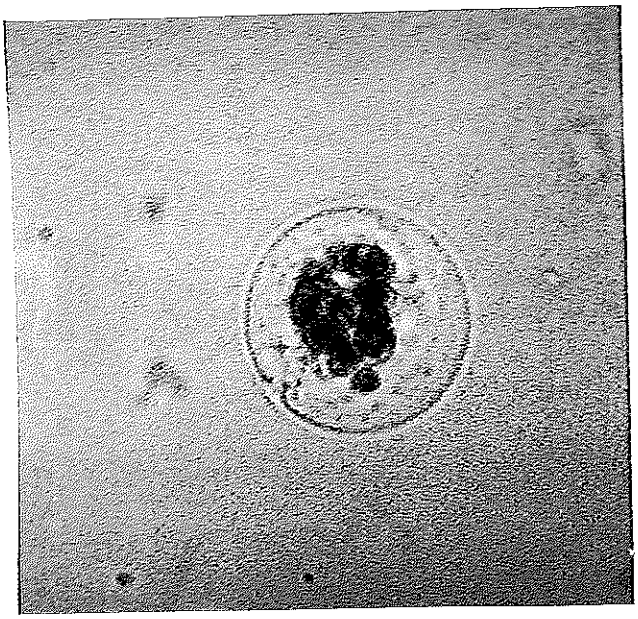


ภาพที่ 23 โปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว ในสารละลายเอนไซม์ที่มีแมนนิทอล 0.8 โมลาร์ (x250)

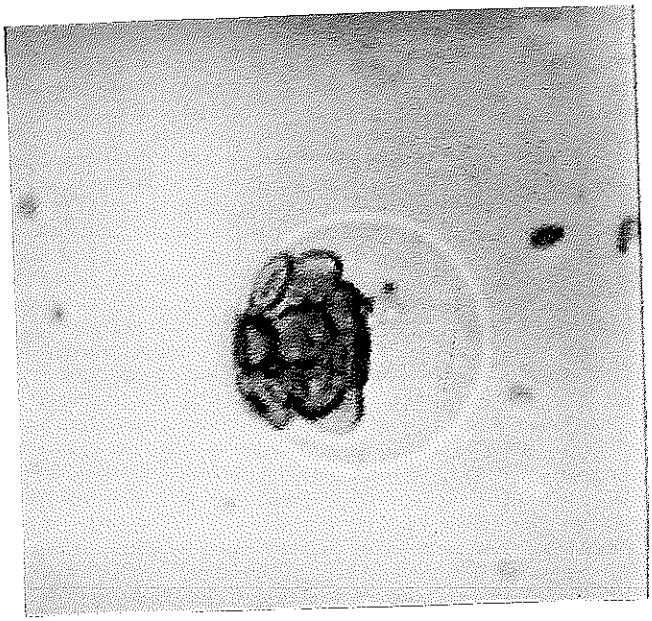
โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกาบใบข้าวมีขนาดแตกต่างกัน ลักษณะกลม เล่ง ส่วนใหญ่มีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวอยู่ภายใน มีการกระจายของเม็ดคลอโรพลาสต์หลายแบบ เช่น คลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วเซลล์ (ภาพที่ 24) คลอโรพลาสต์รวมตัวเป็นกลุ่มอยู่กลางเซลล์ (ภาพที่25) คลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 26) บางโปรโตพลาสต์ก็ไม่มีคลอโรพลาสต์อยู่เลย ลักษณะกลม ใส (ภาพที่ 27) บางโปรโตพลาสต์มีไซโทพลาสซึมเข้มข้นกระจายอยู่ทั่วเซลล์ (ภาพที่ 28) และบางโปรโตพลาสต์มีไซโทพลาสซึมรวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 29)



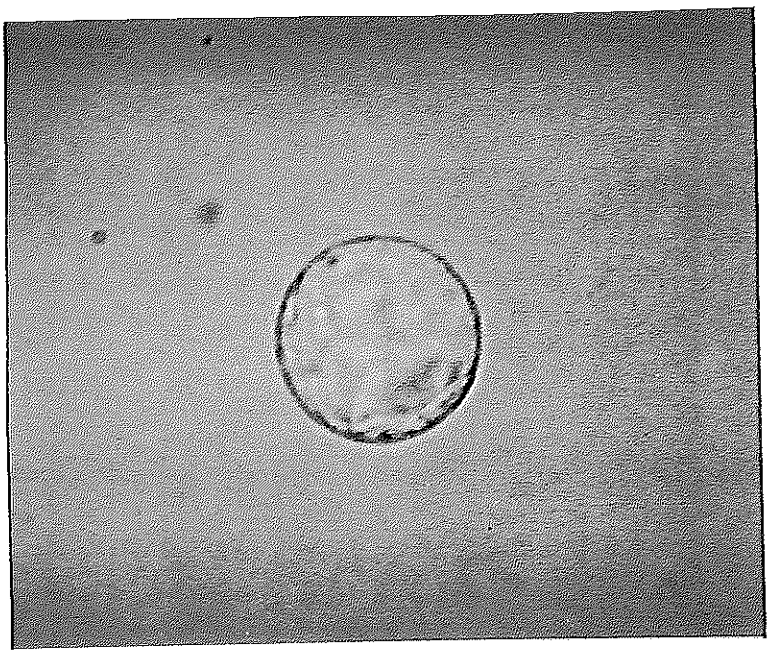
ภาพที่ 24 โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์กระจายอยู่ทั่วเซลล์ (x750)



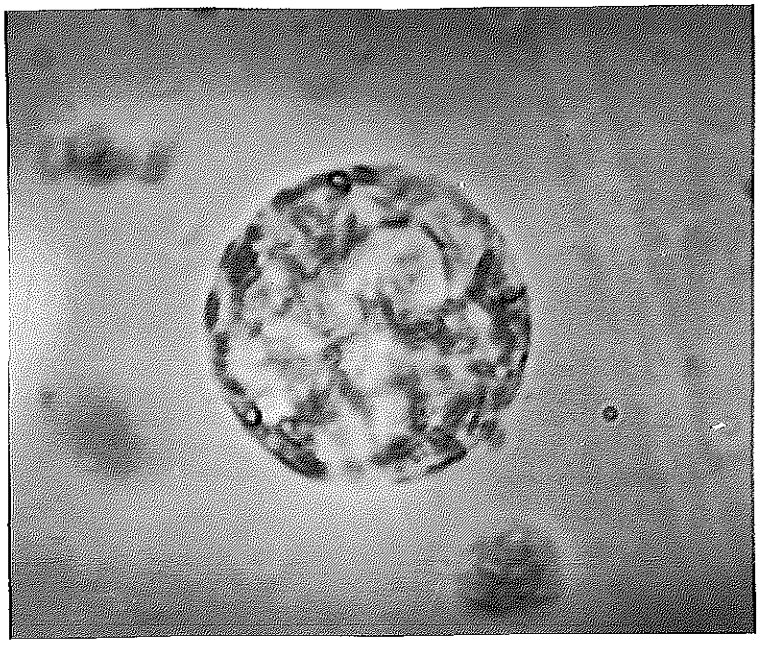
ภาพที่ 25 โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่กลางเซลล์ (x750)



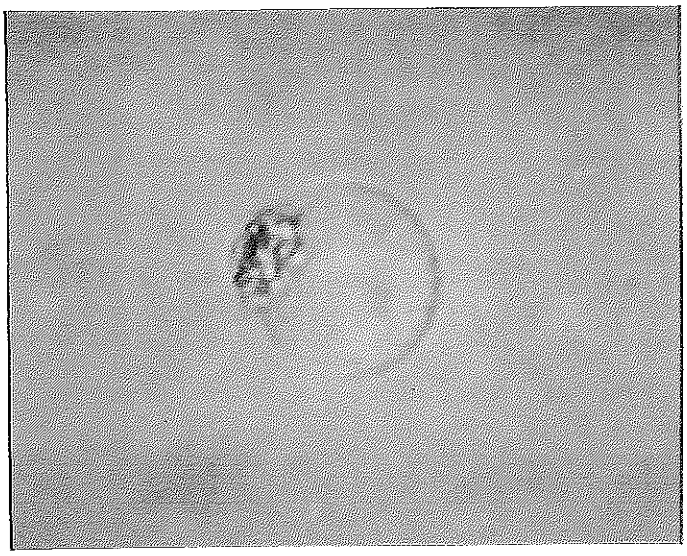
ภาพที่ 26 โปรโตพลาสต์ที่มีคลอโรพลาสต์รวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (x750)



ภาพที่ 27 โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะกลม ใส ไม่มีคลอโรพลาสต์ (x750)



ภาพที่ 28 โปรโตพลาสต์ที่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น กระจายอยู่ทั่วเซลล์ (x1000)



ภาพที่ 29 โปรโตพลาส์ที่มีไซโทพลาสซึมรวมกลุ่มอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (x750)

2.1.2 ความเร็วในการเขย่า

ในการทดลองหาความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสม สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว ได้ทำการศึกษา 3 สภาวะคือ ไม่เขย่า, เขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที และ 80 รอบต่อนาที โดยใช้เอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ วางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 6 ซึ่งปรากฏว่าการวางย่อยโดยไม่เขย่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยกว่าการวางย่อยโดยมีการเขย่า และการเขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที และได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดเฉลี่ย 21.32×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

ตาราง 6 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อใช้ เอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ โดยวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ความเร็วในการเขย่า (รอบต่อนาที)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0	5.66	4.06	4.74	4.82±0.66
40	11.68	10.40	9.18	10.42±1.02
80	19.78	22.84	21.36	21.32±1.24

2.1.3 <u>ชนิดของเอนไซม์</u>

เมื่อนำกากใบข้าวมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายเอนไซม์ 2 ชนิด คือ

E_A = เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์ + มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ + ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์

E_B = เซลลูเลส 1 เปอร์เซนต์ + มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์

สารละลายเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม วางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เมื่อทำการบ่มครบ 3 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 7 ซึ่งปรากฏว่าการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ E_A ให้โปรโตพลาสต์จำนวนมากกว่าเอนไซม์ E_B โดยเอนไซม์ E_A แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนเฉลี่ย 21.32×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนเอนไซม์ E_B แยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนเฉลี่ย 17.24×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อพิจารณาลักษณะของโปรโตพลาสต์ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน โดยโปรโตพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้เอนไซม์ E_A มีขนาดใหญ่ มีคลอโรพลาสต์และไซโตพลาสซึมหนาแน่นกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้เอนไซม์ E_B ซึ่งส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็ก ใส ไม่มีคลอโรพลาสต์และไซโตพลาสซึม หรือมีบ้างแต่ไม่หนาแน่น จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ E_A เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากกากใบข้าว เพราะ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากและโปรโตพลาสต์มีลักษณะดี

ตาราง 7 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดยวางบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ชนิดของเอนไซม์	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
E_A	19.78	22.84	21.36	21.32 ± 1.24
E_B	17.88	16.52	17.34	17.24 ± 0.56

2.1.4 <u>ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่เหมาะสม</u>

จากการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ E_A ที่ปรับความเข้มข้นของเซลลูเลสให้มีความเข้มข้นเป็น 1, 2 และ 3 เปอร์เซนต์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่มีระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสเท่ากับ 2 เปอร์เซนต์มีประสิทธิภาพดีกว่าความเข้มข้นระดับอื่น ๆ คือได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 28.74 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (ตาราง 8)

เมื่อทราบความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้ว ก็นำมาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ วางบ่มในสภาวะเดิม ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง แยกได้โปรโพตลาสต์จำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 29.02 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาได้แก่ที่เวลา 4 ชั่วโมง และที่เวลา 2 ชั่วโมง ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยที่สุด (ตาราง 9)

ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว คือ เซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง

จากการศึกษาเรื่อง สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นั้น สรุปได้ว่าการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ มีแมนนิทอลที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์เป็นออสโมติคัม โดยวางบ่มในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะให้โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะดีและมีจำนวนมากพอที่จะนำไปศึกษาในเรื่องการเพาะเลี้ยงต่อไป

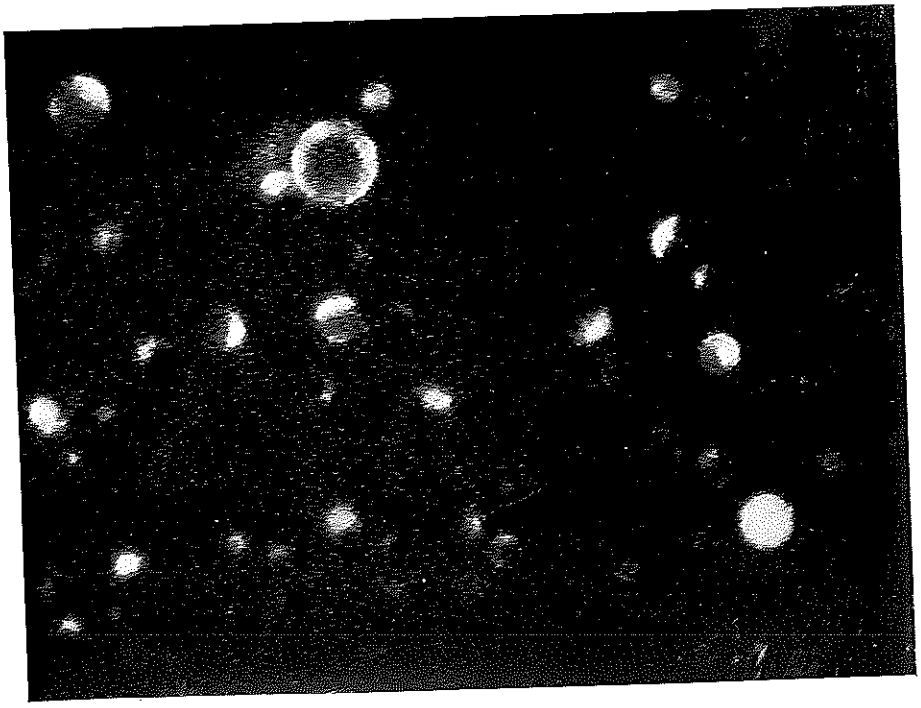
โปรโตพลาสต์ที่แยกได้นั้น ก่อนนำไปศึกษาสภาวะต่าง ๆที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงได้มีการตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า เป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซนต์ ซึ่งจะเรืองแสงสีเขียว (รูปที่ 30)

ตาราง 8 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อใช้เอนไซม์ E_A ที่มีเซลลูเลสความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวางปมในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของเซลลูเลส (เปอร์เซนต์)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
1	19.38	23.04	23.22	21.88±1.76
2	29.40	27.90	28.92	28.74±0.62
3	19.56	18.74	18.60	18.99±0.40

ตาราง 9 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยวางปมในที่มืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที

ระยะเวลาในการแยกโปรโตพลาสต์ (ชั่วโมง)	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ($x10^5$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
2	13.38	12.24	12.22	12.62±0.54
3	28.76	28.12	30.20	29.02±0.87
4	28.92	26.34	27.16	27.46±1.08



ภาพที่ 30 โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต เมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงสีเขียว (x250)

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

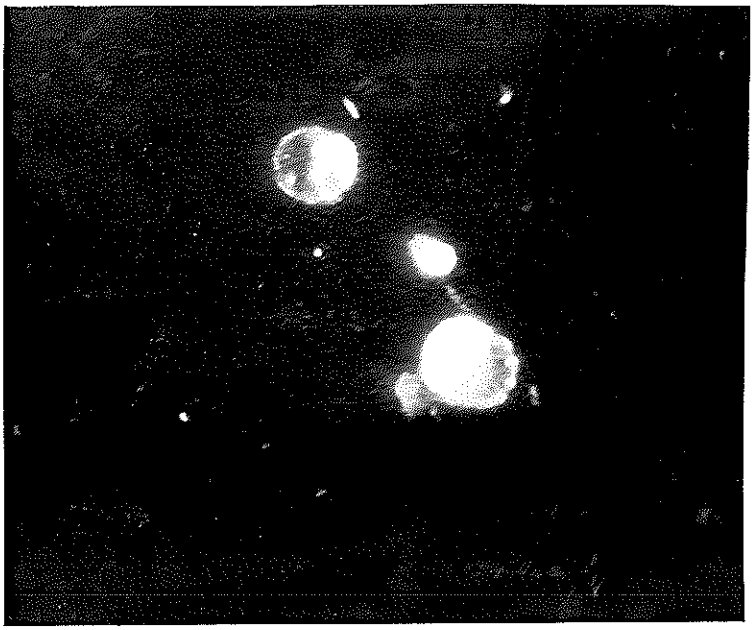
2.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการนำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มก/ล, kinetin 0.5 มก/ล และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยงคือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาทำการเพาะเลี้ยงโดยวิธีต่าง ๆ 4 วิธี พบว่า วิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการทดลองนี้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์สามารถเจริญได้ดีกว่าวิธีอื่น หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์ยังมีลักษณะกลมอยู่ ส่วนใหญ่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางโปรโตพลาสต์ลอยอยู่เดี่ยว ๆ เมื่อตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์โดยการย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ แต่ยังไม่พบการแบ่งเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 2 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์เสียรูปกลม ลักษณะปิดเบี้ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตพบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่ไม่มีการเรืองแสง แสดงว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่ตายแล้ว ส่วนที่วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบหยด พบว่าโปรโตพลาสต์เจริญได้ไม่ดี เนื่องจาก เมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ 3 วันหยดอาหารที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะแบนราบติดกับจานเลี้ยงเชื้อ โปรโตพลาสต์เสียรูปกลมและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตพบว่าโปรโตพลาสต์ตายทั้งหมด สำหรับวิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปได้นาน 3 วัน โปรโตพลาสต์ยังมีลักษณะกลม เต่ง และยังมีสีเขียวอยู่ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์จะเสียรูปกลม และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และวิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงได้เพียง 1 วัน โปรโตพลาสต์จะแตก สังเกตเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวกระจายอยู่ทั่วบนผิวหน้าอาหารวุ้น และไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์หรือหุ้มโปรโตพลาสต์

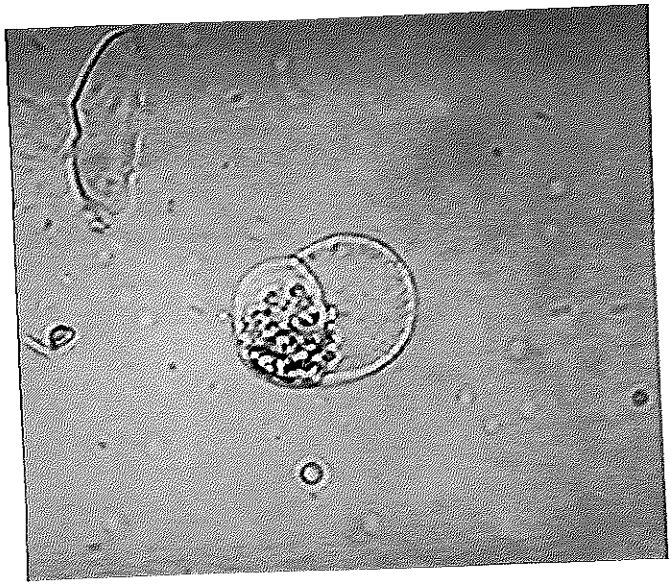
จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเป็นวิธีที่ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาเรื่องชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสม จึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

2.2.2 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

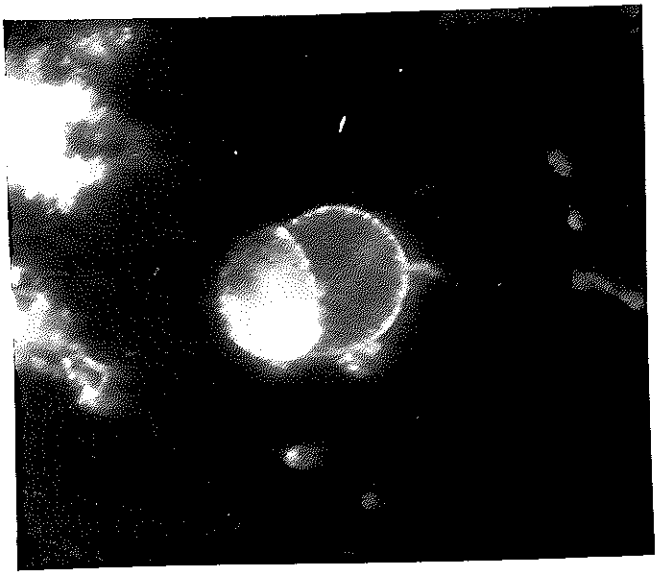
จากการนำโปรโตพลาสต์จำนวน $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ 4 สูตร พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ จะเห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 31) โปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1-3 วัน โดยจะสังเกตเห็นรอยคอดเว้าคล้ายเลขแปด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (ภาพที่ 32) แต่เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์จะสังเกตเห็นการเรืองแสงของเซลล์เพลท (cell plate) ที่กั้นระหว่างเซลล์ 2 เซลล์อย่างชัดเจน (ภาพที่ 33) โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 1 (LS เติม 2,4-D 1 มก/ล, kinetin 0.5 มก/ล และซูโครส 0.4 โมลาร์) และสูตรที่ 3 (MS เติม 2,4-D 1 มก/ล, kinetin 0.5 มก/ล, แมนนิทอล 0.4 โมลาร์, ซูโครส 2 เปอร์เซนต์ และน้ำมะพร้าว 7 เปอร์เซนต์) สามารถเจริญแบ่งเซลล์ได้เป็น 2 เซลล์เท่านั้น ไม่พบการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกาะอยู่กับเศษเซลล์เป็นกลุ่มลอยอยู่ในอาหาร และมีโปรโตพลาสต์จำนวนมากตกตะกอนอยู่ที่ก้นจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ไม่พบการเรืองแสงแสดงว่าเป็นโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิต ส่วนโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 4 (RY-2 ดัดแปลง เติม 2,4-D 2 มก/ล และกลูโคส 0.4 โมลาร์) สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 2 สัปดาห์ แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับในอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 2 (LS เติม 2,4-D 1 มก/ล, kinetin 0.5 มก/ล และกลูโคส 0.4 โมลาร์) พบว่าสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นหลายเซลล์ได้ (ภาพที่ 34-35) แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปยังไม่พบการเจริญของกลุ่มเซลล์ โดยเซลล์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์



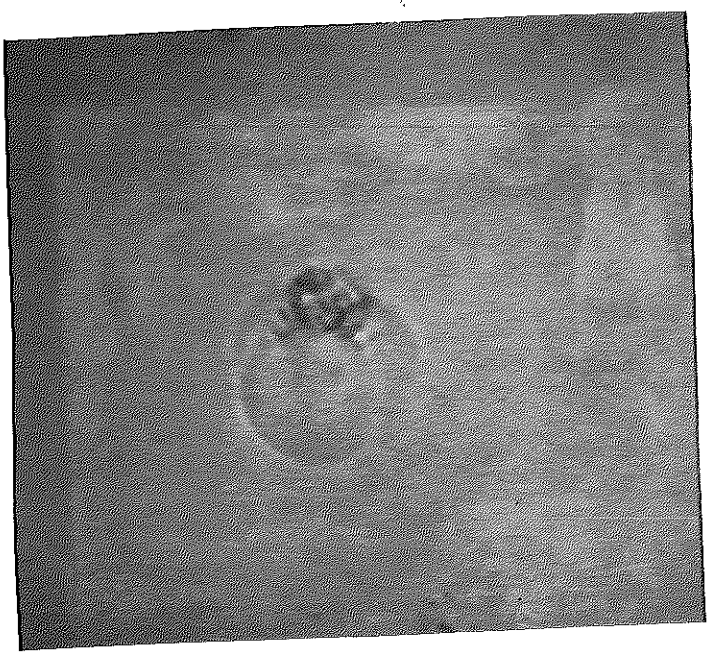
ภาพที่ 31 โปรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (x500)



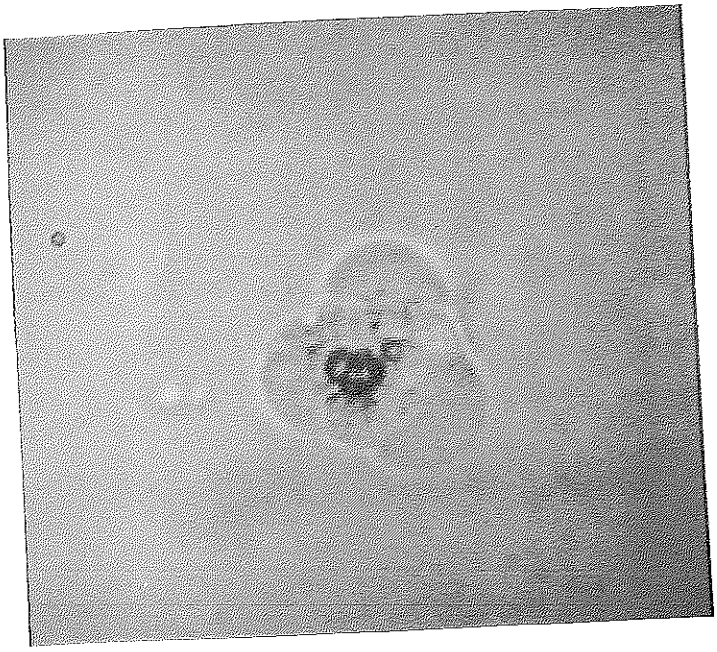
ภาพที่ 32 โปรโตพลาสต์ข้าวที่แบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 เซลล์ (x750)



ภาพที่ 33 โปรโตพลาสต์ข้าวในภาพที่ 32 ที่แบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 เซลล์ เมื่อย้อมด้วยสีแคลคอฟลอไวท์ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ เห็นการเรืองแสงที่ขอบของเซลล์แบ่งเป็น 2 เซลล์ (x750)



ภาพที่ 34 โปรโตพลาสต์ข้าวที่แบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 3 เซลล์ (x750)



ภาพที่ 35 โปรโตพลาสต์ข้าวที่แบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์ เป็นหลายเซลล์ (x750)

บทที่ 4

บทวิจารณ์

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอข้าว

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวที่นำมาเพาะเลี้ยง

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก แช่ในเอธิล-แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ขั้นตอนที่สองแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ซึ่งขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อดังกล่าวนี้คล้ายกับรายงานของ Yamada และคณะ (1986) ; Li และ Murai (1990) แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอรอกซ์ที่ใช้และเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ สำหรับในการทดลองนี้ได้ใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซนต์ ร่วมกับทวีน 20 จำนวน 3-4 หยด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ซึ่งพบว่าเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อนาน 30 นาที สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเมล็ดได้ดีที่สุด เมล็ดมีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อมากที่สุด แต่มีเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดน้อยกว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่เวลานาน 10 และ 20 นาที สอดคล้องกับรายงานของ Anonymous (1982) (อ้างโดย ธิดารัตน์, 2533) ที่พบว่า การใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสูงและระยะเวลานาน มีผลต่อการงอกของเมล็ดโดยจะไปทำลายการพัฒนาดังกล่าว ดังนั้นในการทดลองนี้ใช้สารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ เวลานาน 20 นาที เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเมล็ดมีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อสูง และมีเปอร์เซนต์การงอกสูงเช่นเดียวกัน

1.2 การชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอ

ในการชักนำให้เอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร LS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 1-4 มก/ล, เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล และเติม 2,4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าว

10 เปอร์เซนต์ จากผลการทดลองซึ่งพบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหาร โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดได้ 1 สัปดาห์ สังเกตเห็นแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณเอ็มบริโอ ใกล้กับส่วนโคนของยอดที่งอกออกมา ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเหมือนกับผลการทดลองของ Maeda (1980), Nabor และคณะ (1983) และ ประภาและพรทิพย์ (2537) ที่พบว่ามี 2 แบบคือ แบบ compact แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีครีมหรือสีเหลือง เซลล์เกาะตัวกันแน่น ซึ่งเป็นลักษณะของ embryogenic callus มีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ และแบบ friable แคลลัสมีลักษณะร่วนฟู สีครีม เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งเป็นลักษณะของ non-embryogenic callus ไม่มีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้น จากการที่อรัญญาและคณะ (2531) (อ้างโดย ธิดารัตน์, 2533) ได้ศึกษาการเกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอในข้าวโดยการทำเซคชั่นแบบฝังในพาราฟิน และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนพบว่า แคลลัสมี 2 ชนิดคือ ชนิด E (embryogenic callus) เกิดจากเซลล์ในชั้นผิวของ scutellum ส่วน แคลลัสอีกชนิดหนึ่งคือ NE (non-embryogenic callus) เกิดจาก mesocotyl นอกจากนี้ Maeda (1980) ก็รายงานเช่นกันว่า แคลลัสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอของข้าว ส่วนใหญ่จะเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วน scutellum และ mesocotyl ของเอ็มบริโอ โดยเซลล์เนื้อเยื่อทั้งสองมีการขยายขนาดและแบ่งตัวอย่างรวดเร็วจนกลายเป็นแคลลัส ดังนั้นจึงคาดว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นี้ น่าจะเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วน scutellum และ mesocotyl ของเอ็มบริโอเช่นเดียวกัน

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตรต่าง ๆ ซึ่งพบว่า อาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกัน แต่มีอัตราสูงในทุกสูตรอาหาร (80-98 เปอร์เซนต์) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารทุกสูตรมี 2,4-D ผสมอยู่ด้วย ซึ่ง 2,4-D จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อข้าวเจริญเป็นแคลลัส แต่ความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อ (Raina, 1989) เช่น ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอควรใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-4 มก/ล ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของข้าวแต่ละพันธุ์ด้วย (Ketchum และคณะ, 1987) จากผลการทดลองนี้พบว่าในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด แคลลัสส่วนใหญ่เป็นแบบ friable ซึ่งจัดเป็นชนิด non-embryogenic

สอดคล้องกับผลการทดลองของสมคิด (2534) ที่พบว่า ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ กข 23 และขาวดอกมะลิ 105 นั้น การใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองของประภาและพรทิพย์ (2537) ที่พบว่า การใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก/ล สามารถชักนำให้เอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุดและแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่เป็นชนิด non-embryogenic Raghava Ram และNabors (1984) ก็พบว่า ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ Mahsuri ภายใต้สภาพที่มีแสงบนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว แคลลัสที่ได้ส่วนมากเป็นชนิด non-embryogenic เช่นกัน สำหรับสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล นั้น พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด แคลลัสส่วนใหญ่เป็นแบบ compact ซึ่งจัดเป็นชนิด embryogenic มีขนาดใหญ่และจำนวนมากกว่าที่ใช้ 2,4-D อย่างเดียว สอดคล้องกับการทดลองของ Raghava Ram และ Nabors (1984) ที่พบว่า ถ้าเติม kinetin ความเข้มข้น 0.1-0.5 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-1 มก/ลในอาหาร จะช่วยให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสชนิด embryogenic เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ ธิดารัตน์ (2533) และ ประภาและพรทิพย์ (2537) ที่พบว่า การใช้ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มก/ล ร่วมกับ 2,4-D ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าวได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งไซโทไคนินมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการควบคุมการสร้างอวัยวะ โดยปกติเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีออกซินอยู่ด้วย เมื่อใส่ไซโทไคนินเข้าไปจะช่วยให้มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (พรทิพย์, 2528) สำหรับสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอัตราที่สูงกว่าสูตรที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว และได้แคลลัสที่มีลักษณะแบบ compact ขนาดใหญ่จำนวนมาก เช่นเดียวกับอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin สอดคล้องกับการทดลองของประภาและพรทิพย์ (2537) ที่พบว่า เมื่อใช้ 2,4-D 2 มก/ล ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่กว่า(เฉลี่ย 8.5 มม) การใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว (เฉลี่ย 7.8 มม) ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่า น้ำมะพร้าวมีองค์ประกอบเป็นสารพวกไซโทไคนินรวมอยู่ด้วย (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1986) นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนและเกลือแร่ละลายอยู่ น้ำมะพร้าวจึงอาจส่งเสริมการเกิดและการเจริญของแคลลัส (Guzman, 1983)

1.3 การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

ในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น ได้ใช้แคลลัสที่มีลักษณะแบบ compact ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1.2 โดยแบ่งแคลลัสออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกย้ายลงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นทันทีโดยไม่ผ่านการทำให้แห้งก่อน กลุ่มที่ 2 ย้ายไปพักไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิด วางไว้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วันก่อน เพื่อทำให้แคลลัสแห้ง แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น จากผลการทดลองซึ่งพบว่า การทำให้แคลลัสแห้งก่อนที่จะย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ช่วยให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการทำให้แห้ง สอดคล้องกับการทดลองของธิดารัตน์ (2533) ที่พบว่า แคลลัสข้าวที่ผ่านการทำให้แห้งก่อน มีเปอร์เซนต์การพัฒนาเป็นต้นมากกว่าแคลลัสที่ไม่ผ่านการทำให้แห้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจาก การพักแคลลัสไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิดซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าความชื้นภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการคายน้ำ ปริมาณน้ำในเซลล์จึงลดลง และพร้อมที่จะรับน้ำหรือสารอื่น ๆ จากภายนอกเข้าไปในเซลล์ได้อีกครั้งหนึ่ง เมื่อย้ายแคลลัสนี้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น แคลลัสจึงสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้มากขึ้น (Gray, 1987 อ้างโดย ธิดารัตน์, 2533)

สำหรับอาหารที่ใช้ในการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นนั้น ใช้อาหารแข็งสูตร MS โดยแบ่งเป็น 3 ชุดคือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต, เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin 1- 4 มก/ล และเติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 1-4 มก/ล ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า อาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นทุกสูตรสามารถชักนำให้แคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วพัฒนาเป็นต้นได้ โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นมี 2 สูตร คือ สูตรที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล และ สูตรที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin 4 มก/ล โดยอาหารทั้งสองสูตรสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าสูตรอื่น ๆ และมีเปอร์เซนต์การเกิดต้นใกล้เคียงกัน ซึ่งจากผลการทดลองที่พบว่า อาหารชุดที่เติม IAA ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดีนั้น สอดคล้องกับการทดลองของ Ketchum และคณะ(1987) และ ประภาและพรทิพย์ (2537) ที่รายงานว่าแคลลัสข้าวมีการพัฒนาเป็นต้นได้ดี เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ BAP หรือ BA

สวนอาหารชุดที่เติมน้ำมะพร้าว ร่วมกับ kinetin ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดีเช่นกันนั้น สอดคล้องกับการทดลองของ เผดิมและคณะ (2536) ที่รายงานว่า สามารถชักนำให้แคลลัสข้าวพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดีเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว ร่วมกับ เคซีนไฮโดรไลเสท และ kinetin เช่นเดียวกับ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1986) ที่รายงานว่า น้ำมะพร้าวซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสารพวกไซโทไคนินรวมอยู่ด้วยก็สามารถกระตุ้นให้แคลลัสเกิดต้นได้ดี ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าน้ำมะพร้าวนอกจากจะมีไซโทไคนินแล้ว ยังมีสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอีกด้วย สำหรับอาหารชุดที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งพบว่า สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้เช่นกัน ถึงแม้จะมีเปอร์เซนต์การเกิดต้นน้อยกว่าในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สอดคล้องกับการทดลองของ Henk และคณะ (1978) และ รัชนีและคณะ (2529) ที่พบว่าการย้ายแคลลัสข้าวลงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้เช่นกัน

จากการพิจารณาจำนวนยอดต่อแคลลัสพบว่า สูตรอาหารที่เติมไซโทไคนิน ไม่ว่าจะเป็น kinetin หรือ BA สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดได้หลาย ๆ ยอดต่อแคลลัส แต่ในสูตรอาหารที่เติม BA สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด โดยมีจำนวนยอดต่อแคลลัสมากกว่าในสูตรที่เติม kinetin สอดคล้องกับการทดลองของประภา (2532) ที่ได้ทดลองใช้ไซโทไคนิน 3 ชนิด คือ BA, kinetin และ2iP เพื่อชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างยอดหลาย ๆ ยอด ซึ่งพบว่า ไซโทไคนินทั้ง 3 ชนิดสามารถชักนำให้เมล็ดข้าวสร้างยอดหลาย ๆ ยอดได้ โดยเฉพาะ BA ชักนำให้เมล็ดสร้างยอดได้มากที่สุด (เฉลี่ย 10.7 ยอด) รองลงมาได้แก่ 2iP (เฉลี่ย 7.1 ยอด) และkinetin (เฉลี่ย 6.7 ยอด) ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากไซโทไคนินมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic region) และจากผลการทดลองนี้พบว่า อาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตก็สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดได้หลาย ๆ ยอดต่อแคลลัสเช่นกัน (เฉลี่ย 5 ยอดต่อแคลลัส) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก แคลลัสที่นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดต้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ทำให้แคลลัสมีการสะสมของ kinetin อยู่ เมื่อนำมาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นจึงสามารถสร้างยอดได้หลาย ๆ ยอดบนแคลลัสก้อนเดียวกัน

ในการทดลองนี้ การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสเกิดจาก ขบวนการ organogenesis เนื่องจากแคลลัสบางก้อนมีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากเพียงอย่างเดียว แคลลัสบางก้อนมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่มีทั้งยอดและราก แต่การพัฒนาไปเป็นยอดและรากนี้ไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมกันจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน สอดคล้องกับ Abe และ Futsuhara (1989) ที่พบว่าการพัฒนาของแคลลัสข้าวไปเป็นต้นเป็นแบบ organogenesis แตกต่างจาก Ling และคณะ (1983) ที่รายงานว่า แคลลัสที่ได้จากเมล็ดข้าวลูกผสม (hybrid) มีการพัฒนาไปเป็นต้นโดยผ่านขบวนการ embryogenesis ซึ่งแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้นที่มีทั้งยอดและรากเกิดขึ้นพร้อมกันโดยมีกำเนิดมาจากเซลล์ ๆ เดียว แล้วมีการแบ่งตัวเกาะกันเป็นกลุ่มและพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอโดยผ่านระยะ globular, heart และ torpedo-shaped ตามลำดับ

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ข้าว

2.1.1 ระดับออสโมลาริตี้

เมื่อต้องการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์พืช สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ ระดับความดันภายนอกและภายในเซลล์ หรือที่เรียกว่า ระดับออสโมลาริตี้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่ถูกแยกออกมาแล้วไม่มีผนังเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ทำให้น้ำหรือสารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกสู่โปรโตพลาสต์ได้ง่าย ซึ่งมีผลต่อแรงดันออสโมซิสภายในโปรโตพลาสต์ ดังนั้นแรงดันออสโมซิสของสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ล้อมรอบโปรโตพลาสต์จะต้องอยู่ในสภาพสมดุล มิฉะนั้นโปรโตพลาสต์จะเที่ยวหรือแตก โดยทั่วไปการปรับแรงดันออสโมซิสของสารละลายเอนไซม์ทำได้โดยการเติมออสโมติคัม ออสโมติคัมที่นิยมใช้มากที่สุดคือ น้ำตาลแมนนิทอลและซอร์บิทอล ในการศึกษาระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว เลือกใช้น้ำตาลแมนนิทอลเนื่องจาก น้ำตาลแมนนิทอลเหมาะสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของใบ (Kao and Michayluk, 1974)

จากการศึกษาโดย ใช้น้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 โมลาร์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.2 โมลาร์ ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยที่สุดและมีโปรโตพลาสต์แตกมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นระดับออสโมลาริตี้ที่ต่ำเกินไป การที่ระดับออสโมลาริตี้ต่ำ จะทำให้น้ำจากสารละลายภายนอกโปรโตพลาสต์ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าสารละลายภายในโปรโตพลาสต์ แพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์มาก ทำให้โปรโตพลาสต์เต่งขึ้นและแตกในที่สุด (Evans และ Bravo, 1983) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.6 และ 0.8 โมลาร์มีจำนวนโปรโตพลาสต์น้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ และเริ่มมีการหดตัวของโปรโตพลาสต์ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.6 โมลาร์ และการหดตัวของโปรโตพลาสต์เพิ่มมากขึ้นที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.8 โมลาร์ เนื่องจาก ที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.6 และ 0.8 โมลาร์ เป็นระดับที่สารละลายภายนอกโปรโตพลาสต์มีความเข้มข้นมากกว่าสารละลายภายใน จึงทำให้เกิดกระบวนการ plasmolysis โดยน้ำภายในโปรโตพลาสต์จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ภายนอก ทำให้โปรโตพลาสต์หดตัวแฟบลง จึงพบว่ามีจำนวนโปรโตพลาสต์ลักษณะกลม เต่ง สมบูรณ์น้อยกว่าที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ ซึ่งได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากที่สุดและโปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง สมบูรณ์ แสดงว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์เป็นระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของมยุรี (2539) ที่พบว่าระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล็อกซิเนีย คือ 0.4 โมลาร์ และเสาวรัตน์ (2539) ที่พบว่า ระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ คือ 0.4 โมลาร์เช่นกัน แต่แตกต่างจาก Maeda และ Hagivara (1974) ที่พบว่า ความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของข้าวชนิดจาโปนิกา พันธุ์ Aichi asahi คือ 0.7 โมลาร์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างในด้านชนิดและพันธุ์ข้าว รวมทั้งชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์

2.1.2 <u>ความเร็วในการเขย่า</u>

ในการทดลองหาความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสม สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวนั้น พบว่า การวางย่อยโดยไม่เขย่าจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยกว่าการวางย่อยโดยการเขย่า และการเขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ให้จำนวนโปรโตพลสต์มากกว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบต่อนาที ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ

การทดลองของอารยา (2537) ที่พบว่า ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของใบกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส การวางย่อยโดยไม่เขย่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยกว่าการวางย่อยโดยมีการเขย่า และการเขย่าด้วยความเร็วรอบสูง (100 รอบต่อนาที) ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบต่ำ (50 รอบต่อนาที) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการวางย่อยโดยการเขย่าทำให้เอนไซม์สัมผัสกับชิ้นส่วนพืชได้มากขึ้น และเป็นการกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ จึงทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าการวางย่อยโดยไม่เขย่า เมื่อใช้เวลาเท่ากัน และการเขย่าด้วยความเร็วรอบสูงจะช่วยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาจากเซลล์ได้เร็วกว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบต่ำ เป็นการลดระยะเวลาในการแยกโปรโตพลาสต์ ช่วยให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตสูง เพราะ ระยะเวลาในการบ่มยิ่งนานเท่าไร สิ่งเจือปนในเอนไซม์อาจเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ได้มากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์โดยเขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ใช้ระยะเวลาเพียง 3 ชั่วโมง ก็สามารถแยกได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากเพียงพอ และเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มีค่ามากกว่า 85 เปอร์เซนต์

2.1.3 <u>ชนิดของเอนไซม์</u>

เอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์พืชมี 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มเซลลูเลส เช่น เซลลูเลส, ไครซีเลส และ เซลลูไลซิน (Cellulysin) กลุ่มเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) เช่น เฮมิเซลลูเลส และ โรไซม์ (Rhozyme) และกลุ่มเพคติเนส เช่น เพคติเนส, มาเซอโรไซม์ และ เพคโตไลเอส (Evans และ Bravo, 1983) ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นกับ ชนิดของพืช และ เนื้อเยื่อที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้อาจจะเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ จารุวัฒน์ (2534) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของโกโก้ได้โดยใช้ไครซีเลสเพียงอย่างเดียว สำหรับในการทดลองนี้ได้ใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 2 ชนิดคือ ชนิดแรกประกอบด้วยเซลลูเลส, มาเซอโรไซม์ และไครซีเลส ชนิดที่ 2 ประกอบด้วยเซลลูเลส และ มาเซอโรไซม์ จากผลการทดลองพบว่าสารละลายเอนไซม์ผสมชนิดแรกซึ่งมีไครซีเลสอยู่ด้วยให้โปรโตพลาสต์จำนวนมากกว่าสารละลายเอนไซม์ผสมชนิดที่ 2 ซึ่งไม่มีไครซีเลส สอดคล้องกับการทดลองของ Koh และคณะ (1988) ที่พบว่า การเติมไครซีเลสร่วมกับเซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของใบกล้วยไม้ลูกผสมอะแรนด้า ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์

มากขึ้น และสอดคล้องกับการทดลองของอารยา (2539) ที่พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสด้วยสารละลายเอนไซม์ผสมที่มี เซลลูเลส, มาเซอโรไซม์ และไดรซีเลส จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าสารละลายเอนไซม์ผสมที่มี เฉพาะ เซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ แตกต่างจาก Maeda และ Hagiwara (1974) ที่สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบข้าวได้โดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสมที่มี เฉพาะ เซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ เท่านั้น แต่ใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลสสูงถึง 5 เปอร์เซนต์ การที่สารละลายเอนไซม์ผสมที่มีทั้งเซลลูเลส, มาเซอโรไซม์ และไดรซีเลส สามารถแยกได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากกว่าสารละลายเอนไซม์ผสมที่มี เฉพาะเซลลูเลส และมาเซอโรไซม์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากไดรซีเลส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเพคติเนสด้วย การมีไดรซีเลสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์ได้ดียิ่งขึ้น โดยใช้ร่วมกับเซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ และใช้ได้ดีกับเซลล์ใบ (Koh และคณะ, 1988)

2.1.4 <u>ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่เหมาะสม</u>

เมื่อทราบชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อ การแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวแล้วนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่า สารละลายเอนไซม์ที่มีเซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าวได้จำนวนมากที่สุด แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลสสูงกว่า 2 เปอร์เซนต์ จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลลูเลสที่ใช้ในการทดลอง (Cellulase "Onozuka" R-10) เป็นเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ มีสารและเอนไซม์อย่างอื่นปนอยู่ด้วย ได้แก่ cellobiase, xylanase, glucanase, pectinase, lipase, phospholipase และ nuclease (Tomita และคณะ, 1968) ซึ่งเอนไซม์ lipase และ phospholipase จะทำหน้าที่ย่อยสลายไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วยชั้นของไขมัน และโปรตีน (Evans และ Cocking, 1977) ดังนั้นเมื่อใช้เซลลูเลสความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ lipase และ phospholipase สูงขึ้นจึงทำการย่อยสลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ทำให้โปรโตพลาสต์บางส่วนแตกสลายได้

เวลาที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ก็เป็นปัจจัยสำคัญ ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองนี้ที่พบว่า เวลา 3 ชั่วโมงเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถแยกได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากที่สุด ส่วนที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง แยกได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อยที่สุด เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่น้อยเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้มีจำนวนน้อย และที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าจะแยกได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก แต่ก็มีจำนวนน้อยกว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่นานเกินไป ถึงแม้ว่าจะได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากขึ้น แต่จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาได้ มีโอกาสถูกย่อยสลายจากเอนไซม์ lipase และ phospholipase ที่ประกอบอยู่ในเอนไซม์เซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ได้มากขึ้น จึงทำให้โปรโตพลาสต์แตกสลายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ถ้าใช้เวลาในการแยกนานเกินไป จะทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงด้วย เพราะการที่โปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์นานเกินไป จะทำอันตรายต่อโปรโตพลาสต์โดย ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย (Theodoropoulos และ Rubelakis-Angelakis, 1990) การทดสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ทำได้โดยการนำโปรโตพลาสต์ไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต โมเลกุลของสีจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในโปรโตพลาสต์ ถ้าเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตดทำให้เกิดสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) ทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียว เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ (Dixon,1985) เมื่อโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตสูง โอกาสที่โปรโตพลาสต์จะเจริญแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัสย่อมมีสูงเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อไป

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง (plating density) จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ (plating efficiency) ของโปรโตพลาสต์ เนื่องจาก โปรโตพลาสต์แต่ละอันมีการแพร่สารพวกเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่จำเป็นลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสารเหล่านี้จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao และ Michayluk, 1975) โดยทั่วไปโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงควรมีความหนาแน่น $1x10^4$ ถึง $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร การ

เพาะเลี้ยงโดยจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ไม่เหมาะสม เช่น จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงที่น้อยเกินไป จะทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แบ่งตัวและตายในเวลาต่อมา Yamada และคณะ (1986) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสของข้าวพันธุ์ A-58 MS โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น $2.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Yin และคณะ (1993) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวชนิดอินดิกา พันธุ์ 8706 โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร Jain และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวชนิดอินดิกาและจาโปนิกา โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น $0.1-20x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองนี้ ได้ใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ข้าว

2.2.1 <u>วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์</u>

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทั้ง 4 วิธี พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีที่ดีที่สุด เนื่องจากโปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และมีชีวิตรอดได้นานที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากวิธีนี้โมเลกุลของสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ทันที ทำให้ไม่ขาดแคลนสารอาหาร นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวยังช่วยรักษาระดับออสโมติกโพเทนเชียล(osmotic potential) ของโปรโตพลาสต์ที่ละน้อย และช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เกิดใหม่ด้วย (Evans และ Cocking, 1979) เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์แล้ว จึงค่อยทำการย้ายเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว จึงเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ดังเช่น Wallin และคณะ (1977) พบว่า การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวช่วยให้โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้เร็วขึ้น และแบ่งตัวได้เร็วกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง Yamada และคณะ (1986) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวจาโปนิกาในอาหารเหลว โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และเจริญเป็นโคโลนีได้ Toriyama และคณะ (1986) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวชนิดจาโปนิกา พันธุ์ Yamahoushi ในอาหารเหลว พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้มาก Yan-Xiu และคณะ (1991) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ของชะบาจีน (*Hibiscus syriacus*) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จะเกิดการแบ่งเซลล์ได้ถึง 64 เปอร์เซนต์ มากกว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธีอื่น ๆ

2.2.2 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชทั่ว ๆ ไป อาจมีการดัดแปลงสูตรอาหารตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด จากผลการทดลองพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกาบใบข้าวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ 4 สูตร โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ และเจริญแบ่งเซลล์ได้ในทุกสูตรอาหาร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้ทดลองเป็นอาหารสูตร LS, MS และ RY-2 ดัดแปลง ซึ่งอาหารทั้งสามสูตรนี้จะมีองค์ประกอบพื้นฐานพวกสารอินทรีย์, สารอนินทรีย์ และเหล็กคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเล็กน้อยตรงปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ และชนิดของวิตามินที่ใช้ จึงมีผลทำให้การเจริญของโปรโตพลาสต์คล้ายคลึงกัน โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่เกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับการทดลองของ Deka และ Sen(1986) ที่ทำการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากกาบใบของข้าวชนิดจาโปนิกา พบว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง และสอดคล้องกับ Timothy และ Rangasamy (1993) ที่รายงานว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยของข้าวชนิดอินดิกา เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin และน้ำมะพร้าว สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงได้นาน 24 ชั่วโมง

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จะต้องใส่ออสโมติคัมเพื่อควบคุมแรงดันออสโมซิสจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ ชนิดของออสโมติคัมที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ มักนิยมใช้น้ำตาลซูโครสและกลูโคส ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้น้ำตาลซูโครส, กลูโคส และแมนนิทอลเป็นออสโมติคัม พบว่า ในอาหารสูตรที่มีกลูโคสเป็นออสโมติคัม (สูตรที่ 2 และสูตรที่ 4) โปรโตพลาสต์มีการเจริญแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าในอาหารสูตรที่มีซูโครส และแมนนิทอลเป็นออสโมติคัม (สูตรที่ 1 และสูตรที่ 3) สอดคล้องกับการทดลองของ Yamada และคณะ (1986) ที่พบว่า โปรโตพลาสต์ข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส สามารถแบ่งเซลล์เจริญเป็นโคโลนีได้ แต่กลูโคสให้เปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสูงกว่าซูโครส สำหรับโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแมนนิทอลและซอร์บิทอลเป็นออสโมติคัม จะตายภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ สอดคล้องกับ Wang และคณะ (1989) ที่ทำการศึกษาชนิดของออสโมติคัมที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าว

ชนิดอินดิกา โดยใช้น้ำตาลซอร์บิทอล, แมนนิทอล และกลูโคส พบว่า อัตราการแบ่งเซลล์จะมากที่สุด เมื่อใช้กลูโคสเป็นออสโมติคัม

นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตก็มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเจริญของโปรโตพลาสต์ จากการศึกษาของ Yamada และคณะ (1986), Kyozuka และคณะ (1987), Detta และคณะ (1992) พบว่าโปรโตพลาสต์ของข้าวต้องการออกซินชนิด 2,4-D เพียงอย่างเดียว ในขณะที่บางการทดลองพบว่า ต้องใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนินในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าว เช่น Vasil และ Vasil (1980) ใช้ 2,4-D ร่วมกับ BAP, Wang และคณะ (1989) ใช้ 2-4 D ร่วมกับ Zeatin, Timothy และ Rangasamy (1993) ใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin, Xing (1993) ใช้ 2,4-D ร่วมกับ NAA และ 6-BAP สำหรับผลการทดลองครั้งนี้ซึ่งพบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 และสูตรที่ 4 สามารถเจริญได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น และโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ kinetin มีการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมี 2,4-D เพียงอย่างเดียว อาจเป็นไปได้ว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากกาบใบข้าวต้องการทั้งออกซินและไซโทไคนินในการเจริญเติบโต แต่โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงไม่สามารถแบ่งเซลล์จนกลายเป็นแคลลัสได้ อาจเนื่องจากชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ยังไม่เหมาะต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้อาจจะต้องมีการปรับปรุงชนิดและปริมาณขององค์ประกอบพื้นฐานในสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ยิ่งขึ้น

บทที่ 5

บทสรุป

1. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ ทวีน 20 จำนวน 3-4 หยด เป็นเวลา 20 นาที เหมาะสมที่สุด เพราะ สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเมล็ดได้ดี โดยเมล็ดมีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อ 85 เปอร์เซนต์ และมีเปอร์เซนต์การงอกสูงถึง 99 เปอร์เซนต์

2. การชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าว โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพที่มีแสง พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดคือ LS เติม 2,4-D 1 มก/ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 92.9 เปอร์เซนต์ และแคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะแบบ compact ซึ่งเป็นแคลลัสชนิด embryogenic ที่มีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ดี

3. การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่า การทำให้แคลลัสแห้งก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น ช่วยให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้น สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นมี 2 สูตรคือ MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ kinetin 4 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ในอัตราสูงสุด (36.7 เปอร์เซนต์) แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.4 ยอด และ MS ที่เติม IAA 1 มก/ล ร่วมกับ BA 3 มก/ล สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ 35.5 เปอร์เซนต์ แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (8.6 ยอด)

4. การแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว โดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์, มาเซอโรไซม์ 1 เปอร์เซนต์ และไครซีเลส 0.5 เปอร์เซนต์ มีน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม วางบ่มในสภาพมืด อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ระยะเวลานาน 3 ชั่วโมง

เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด โดยให้โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะดี กลม เต่ง สมบูรณ์ จำนวนมากที่สุด เฉลี่ย 2.9 $x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด โปรโตพลาสต์มีชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซนต์

5. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด คือ LS ที่เติม 2,4-D 1 มก/ล ร่วมกับ kinetin 0.5 มก/ล และกลูโคส 0.4 โมลาร์ โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ภายใน 24 ชั่วโมง และเริ่มแบ่งเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1-3 วัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปยังไม่พบการเจริญของกลุ่มเซลล์

บรรณานุกรม

กรุงไทย, ธนาคาร. ฝ่ายวิจัยธุรกิจ. 2539. "ภาวะสินค้าเกษตรกรรมในประเทศ : การผลิตและการค้า", รายงานเศรษฐกิจ. 29 (มกราคม 2539), 1.

จารุวัฒน์ จันทร์ประดิษฐ์. 2534. "การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้ (Protoplast Culture of Cacao)", วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์-ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.(สำเนา)

ชาญ มงคล. 2536. เรื่องข้าว. ตำรา-เอกสารทางวิชาการฉบับที่ 63. กรุงเทพฯ : หน่วยศึกษานิเทศก์ กรมการฝึกหัดครู.

ธิดารัตน์ ศรีศัฒนพรหม. 2533. "การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโปรตีนสูงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยง-เนื้อเยื่อ (Improvement of High Protein Rice by Tissue Culture Technique)", วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยา-ลัยเกษตรศาสตร์. (สำเนา)

ประพาส วีระแพทย์. 2531. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2532. "การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ", วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 23, 324-330.

_____. 2535. "การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์", ใน เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง 18-22 สิงหาคม 2535 ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 12-27.

ประภา ศรีหิจิตต์ และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. 2537 "การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่-เจริญมาจากศัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105", วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 28, 27-37

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์.

เผดิม ระดิสุนทร และคณะ. 2532. "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์บาสมาติ 370", วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 23(3), 205-210.

_____. 2536. "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ", วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 27(3), 278-285.

พรทิพย์ ธนูทอง. 2528. วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัย-ขอนแก่น.

มยุรี วุฒิสิทธิ์. 2539. "การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล็อกซิเนีย (Isolation and Culture of Gloxinia Protoplasts)", วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

รัชนี จาปาเทศ, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ อธิ เจริญทรัพย์. 2529. "อิทธิพลของน้ำมะพร้าวระยะต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของยอด, ราก และแคลลัสในข้าว", วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 11(6), 379-387.

วราภรณ์ คำบุญเรือง. 2533. "การจัดการพืช โครงการพัฒนาดินเปรี้ยวและดินเค็มภาคใต้", วารสารพัฒนาที่ดิน. 27 (กุมภาพันธ์ 2533), 8-22.

สมคิด วิริฬล. 2534. "รายงานความก้าวหน้างานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว", รายงานประจำปี ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว. หน้า A(18)-G(4).

สุพรรณี แก่นสาร. 2532. "ผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนในข้าว (Effect of Gamma Irradiation on Plant Regeneration in Rice (*Oryza sativa* Linn.))", วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (สำเนา)

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และคณะ. 2537. "การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ", วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 28(1), 92-98.

เสาวรัตน์ จันทะโร. 2539. "การแยกและการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของกล้วยไม้ปอมปาดัวร์", โครงงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารยา หงษ์เพชร. 2537. "การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส", โครงงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abe, T. and Futsuhara, Y. 1989. "Selection of higher regenerative callus and change in isozyme pattern in rice *(Oryza sativa* L.)", Theor. Appl. Genet. 78, 648-652.

Cornejo-Martin, M.J. ; Mingo-Castel, A.M. and Primo-Millo, E. 1979. "Organ redifferentiation in rice callus : Effects of C_2H_4, CO_2 and cytokinins", Z. Pflanzenphysiol. 94, 117-123.

De Datta, S.K., Peterhans, A., Datta, K. and Potrykus, I. 1990. "Genetically engineered fertile indica rice recovered from protoplasts", Biotechnology. 8, 736-740.

Datta, K. ; Potrykus, I. and De Datta, S.K. 1992. "Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the indica rice breeding line IR 72 (*Oryza sativa* L.)", Plant Cell Reports. 11, 229-233.

Deka, P.C. and Sen, S.K. 1976. "Differentiation in calli originated from isolated protoplast of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique", Molec. Gen. Genet. 145, 239-243.

Dixon, R.A. 1985. Plant Cell Culture : A Practical Approach. *s.l.* : IRL. Press Oxford.

Dykes, T.A. and Nabors, M.W. 1986. "Tissue culture in rice and its application in selecting for stress tolerance", In Rice Genetics, pp.799-810. Manila : International Rice Research Institute.

Evans, D.A. and Bravo, J.E. 1983. "Protoplast isolation and culture", In Handbook of Plant Cell Culture. Vol.1, pp.124-176. Evans, D.A., Sharp W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y., eds. New York : Macmillan Publishing.

Evans, P.K. and Cooking, E.C. 1977 "Isolated plant protoplasts", In Plant Tissue and Cell Culture, Botanical Monograph. Vol.2, pp.103-136. Street, H.E. ed. London : Blackwell Scientific Publication.

Fujimura, T., Sakurai, M., Akagi, H., Negishi, T. and Hirose, A. 1985. "Regeneration of rice plant protoplasts", Plant Tissue Culture Letters. 2, 74-75.

Gamborg, O.L. ; Shyluk, J.P. and Shahin, E.A. 1981. "Isolation, fusion and culture of plant protoplasts", In Plant Tissue Culture : Methods and Applications in Agriculture, pp.115-154. Thorpe, T.A., ed. New York ; Academic Press.

Goh, H. 1993. "Protoplast culture", In Workshop on Plant Tissue Culture and Recombinant DNA Technology. Department of Biotechnology. Ngee Ann Polytechnic, Singapore.

Guzman, E.V. 1983. "Recent progress in rice embryo culture at IRRI", In Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Beijing : Science Press.

Hendre, R.R., Mascarenhas, A.F., Pathak, M. and Jagannathan, V. 1975. "Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum : Part 2 Growth and nutrition of callus cultures", Indian J. Exp. Biol. 13 : 108-111.

Henke, R.R. ; Mansar, M.A. and Constantin, M.J. 1978. "Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling-derived calli of rice *(Oryza sativa* L.)", Physiol. Plant. 44, 11-14.

Jain, R.K., Khehra, G.S., Lee, S.H., Blackhall, N.W., Marchant, R., Davey, M.R., Power, J.B. and Cocking, E.C. 1995. "An improved procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts", Plant Cell Reports. 14, 515-519.

Kao, K.N. and Michayluk, M.R. 1974. "A method for higher-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts", Planta. 15, 355-367.

_____. 1975. "Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media", Planta. 126, 105-110.

Ketchum, J.L.F., Gamborg, O.L., Hanning, G.E. and Nabors, M.W. 1987. Tissue Culture for Crops Project. Fort Collins, Colorado : Cororado State University.

Koh, M.C. ; Goh, C.J. and Loh, C.S. 1988. "Protoplast isolation and culture of *Aranda* hybrids", Malay. Orch. Rev. 22, 70-78.

Kyozuka, J. ; Hayashi, Y. and Shimamoto, K. 1987. "High frequency plant regeneration from rice protoplast by novel nurse culture methods", Mol. Gen. Genet. 206, 408-413.

Kyozuka, J. ; Kaneda, T. and Shimamoto, K. 1989. "Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion", Biotechnology. 7, 1171-1174.

Kyozuka, J. ; Otto, E. and Shimamoto, K. 1988. "Plant regeneration from protoplasts of indica rice : Genotypic differences in culture response", Theor. Appl. Genet. 76, 887-890.

Lal, R. and Lal, S. 1990. Crop Improvement Utilizing Biotechnology. Boca Raton : CRC Press, Inc.

Lee, L., Ronald, E.S., Howard, D.G. and Thomas, K.H. 1989. "Plant regeneration from indica rice *(Oryza sativa* L.) protoplasts", Planta. 178, 325-333.

Li, Z. and Murai, N. 1990. "Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium", Plant Cell Reports. 9, 216-220.

Ling, D.H., Chen, W.Y., Chen, M.F. and Ma, Z.R. 1983. "Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*", Plant Cell Reports. 2, 169-171.

Linsmaier, M. and SKoog, F. 1965. "Organic growth factor requirements of tomato tissue cultures", Physiol. Plant. 18, 100-127.

Maeda, E. 1971. "Isolation of protoplast from seminal roots of rice", Proc. Crop Sci. Japan. 40, 397-398.

Maeda, E. 1980. "Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition (part1)", JARQ. 14(1), 4-8.

Maeda, E. and Hagiwara, T. 1974. "Enzymatic isolation of protoplasts from the rice leaves and callus cultures", Proc. Crop Sci. Soc. Japan. 43(1), 68-79.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", Physiol.Plant. 15, 473-497.

Nabors, M.W., Heyser, Dykes, T.A. and De Mott, L.J. 1983. "Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures", Planta. 157, 385-391.

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

Ogewa, M.S., Yoshida, S., Cabuslay, G.S., Chun, Y.H. and Suenaga, K. 1982. "Induction and selection of salt tolerant mutant rice by tissue culture", IRRI Saturday Seminar. December 4, 1982.

Oono, K. 1983. "Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture", In Handbook of Plant Cell Culture, pp.95-104. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada , Y., eds. New York ; Macmillan Publishing Company.

Peng, J., Lyznik, L.A., Lee, L. and Hodges, T.K. 1990. "Co-transfor mation of indica rice protoplasts with gus A and neo Gene", Plant Cell Reports. 9, 168-172.

Raghava Ram, N.V. and Nabors M.W. 1984. "Cytonin mediated long-term, high frequency plant regeneration in rice tissue culture", Z.Pflanzenphysiol. 113, 315-323.

Raina, S.K., Sathish, P. and Sarma, K.S. 1987. "Plant regeneration from *in vitro* cultures of anthers and mature seeds of rice *(Oryza sativa* L.) CV. Basmati-370", Plant Cell Reports. 6, 43-45.

Reddy, G.M. 1981. "Tissue culture studies in rice improvement" In Proc, COSTED Symp, on Tissue Culture of Economically Important Plants, pp.7-10. *s.l.* : National University of Singapore.

Theodoropoulos, P.A. and Roubelakis-Angelakis, K.A. 1990. "Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free exenic shoot culture of *Vitis vinifera* L.", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20, 15-23.

Timothy, R. and Rangasamy, S.R.S. 1993. "Plant regeneration from indica rice protoplasts", Current Science. 64, 257-259.

Tomita, Y. ; Suzuki, H, and Misizawa, K. 1968. "Chromatographic patterns of cellulase components of *Trichoderma viride* grown on the synthetic and natural media", J. Ferment. Technol. 46, 701-710.

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

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1986. "Initiation and growth of rice callus derived from embryo", Thai J. Agric. Sci. 19, 89-102.

Vajrabhaya, M. ; Tunvachkul, O. and Vajrabhaya, T. 1986. "Effects of auxin and cytokinin on plant regeneration from rice callus", J. Sci. Res. Chula. Univ. 11(2), 113-115.

Vasil, V. and Vasil, I.K. 1980. "Isolation and culture of cereal protoplasts. part 2 : Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*", Theor. Appl. Genet. 56, 97-99.

Wallin, A. ; Glimelius, K. and Eriksson, T. 1977. "Pretreatment of cell suspension as a method to increase the protoplast yield of *Happlopappus gracilis*", Physiol. Plant. 40(4), 307-311.

Wang, D. ; Miller, P.D. and Sondahl, M.R. 1989. "Plant regeneration from protoplasts of indica rice and CMS rice", Plant Cell Reports. 8, 329-332.

Wu, L. and Li, H.W. 1970. "Induction of callus tissue initiation from different somatic organs of rice plant by various concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", Cytologia. 36, 411-416.

Xiang, Y.B. 1993. "High frequency of plantlet regeneration from protoplast of rice *(Oryza sativa* L.*)* cultured on modified simple medium", In Biotechnology in Agriculture, pp.399-402. You, C.B., et al., eds. *s.l.* : Kluwer Academic Publishers.

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

Yan-Xiu, Z. ; Dun-Yi Y. and Harris, P.J.C. 1991. "Isolation and culture of protoplast from callus tissue of *Hibiscus syriacus* L.", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 25, 17-19.

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

ภาคผนวก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก	มก/ล
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
เหล็ก	
Na_2 EDTA	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100
วิตามิน	
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Sucrose	30,000
Agar	6,250
pH	5.7

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965)

	มก/ล
ธาตุอาหารหลัก	
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	16.9
$ZnSO_4 \cdot 2H_2O$	10.3
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
เหล็ก	
Na_2EDTA	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100
วิตามิน	
Thiamine HCl	0.4
Sucrose	40,000
Agar	6,250
pH 5.5	

อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์สูตร RY-2 ดัดแปลง (Yamada et al., 1986)

	มก/ล
<u>ธาตุอาหารหลัก</u>	
KNO_3	1,900
$(NH_4)_2SO_4$	67
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
<u>ธาตุอาหารรอง</u>	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
<u>เหล็ก</u>	
EDTA-Na-Fe Salt	19.25
<u>สารอินทรีย์</u>	
Inositol	100
<u>วิตามิน</u>	
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10
Nicotinamide	1
Biotin	0.005
Riboflavin	0.1
pH	5.6

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางกฤษณา สุดทะสาร
วัน เดือน ปีเกิด	9 มิถุนายน 2507

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2530
ศิลปศาสตรบัณฑิต (รัฐศาสตร์)	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	2535

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน นักวิชาการเกษตร 4 ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อ. เมือง จ. พัทลุง