รายงานวิจัย

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เอนโดสเปอร์มจากข้าวไร่แบบแขวนลอยและการใช้ประโยชน์เพื่อศึกษาเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์แป้ง

(Suspension culture of endosperm from upland rice and uses in studies of enzymes in starch synthesis)

Order Key 21594
BIB Key 160745

โดย

เลขหมู่ ...
เลขทะเบียน ...
7 ส.ค. 2542

รพีพร โสตถิพันธุ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งบประมาณ คณะวิทยาศาสตร์ ปี พ.ศ. 2530-2531

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อราเป็นปัญหาหลักของการนำเมล็ดอ่อนของข้าวที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมาใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของเอนโดสเปอร์ม ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว จะต้องดูดอากาศออกพร้อมกับการกวนในสารละลาย sodium hypochlorite 2.6 % นาน 1 ชั่วโมง 40 นาที

เมื่อใช้อาหารวุ้นสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % ผสม 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบร่วนจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดอ่อนจากข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมซึ่งเป็นข้าวหอม พันธุ์กู้เมืองหลวง และซิวแม่จัน กับข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ พัทลุง 60 ซึ่งเป็นข้าวที่ได้รับการส่งเสริม แคลลัสเหล่านี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยโดยใช้อาหารเหลวสูตรมาตรฐานที่ใช้กันแพร่หลาย ได้แก่ สูตร MS, LS, White's และ N_6

การเพิ่มปริมาณวิตามินและไกลซีนเป็นสองเท่าในอาหารสูตร N_6 ($N_6$2V) และเสริมด้วยโพรลีน 0.02 M น้ำตาลซูโครส 4 % และมี 2,4-D 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแขวนลอยได้โดยตรงจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดอ่อนข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอม แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นโค้งมีการเจริญเติบโตทางด้านข้าง การผสม Macerozyme ที่ 0.1 % ในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยป้องกันการเพิ่มขนาดของแคลลัส แต่ไม่ทำให้ได้เซลล์เดี่ยว

การเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของเอนโดสเปอร์มข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมสามารถเพิ่มปริมาณได้ถึง 60 % ของน้ำหนักสด ภายใน 15 วันหลังย้ายเปลี่ยนอาหาร และสามารถใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์แป้งของข้าวไร่ การทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์แป้งของแคลลัสแขวนลอย โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ starch synthase ซึ่งย้าย [^{14}C]glucose จาก ADP-[^{14}C]glucose ไปต่อที่โมเลกุลของแป้งที่เป็น primer ได้ในอัตรา 1.28 นาโนโมล/นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน การศึกษาเอนไซม์อื่นในวิถีนี้จะต้องรอดำเนินการต่อไป

Abstract

Fungus contamination is a major problem encountered in the induction of callus from endosperms of immature spikelets of rice grown in natural environments. Sterilization requires stirring of immature spikelets in 2.6 % sodium hypochlorite in vacuo for 1 hour and 40 minutes, after washing in detergent and 70 %ethanol.

Using MS agar medium containing 3 % sucrose, and 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), friable calluses were induced from immature endosperms of upland rice cultivars, Dok Payom which is a fragrance rice, Khu Mueng Luong and Sew Mae Jun, as well as the recommended lowland cultivars, Hom Mali 105 (Jasmine rice) and Phatalung 60. These calluses could not proliferate in suspension culture with the widely used standard growth media viz. MS, LS, White's and N_6.

By doubling the contents of vitamins and glycine in N_6 medium ($N_6$2V) as well as adding proline at 0.02 M in the presence of 4 % sucrose and 1 mg/l 2,4-D, callus formation could be induced directly in a suspension culture of immature endosperm from Dok Payom cultivar. The calluses in suspension culture were curved-plate in shape which grew sideways. Inclusion of 0.1 % Macerozyme in the culture medium helped prevent increase in size of the calluses but could not generate single-cell suspension.

The endosperm suspension culture obtained from Dok Payom cultivar could increase by 60 % in fresh weight after 15 days of subculture and could be used as a source of enzymes for the study of starch synthesis. Detection of the activity of starch synthase in the callus was done by measuring the rate of transfer of [^{14}C]glucose from ADP-[^{14}C]glucose to the primer starch molecules in the crude extract, which was found at 1.28 nmol/min per milligram of protein. Studies of other enzymes in the pathway will be carried out in the near future.

สารบาญ

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบาญ	iv
สารบาญรูป	v
สัญลักษณ์และคำย่อ	vi
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการศึกษา	4
ผลการทดลอง	9
บทวิจารณ์	24
บทสรุป	28
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

สารบาญรูป

รูปที่ หน้า

1 แคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปอร์มข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ในอาหารวุ้น 10

2 แคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปอร์มข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงและข้าวพันธุ์พัทลุง 60 10

3 แคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปอร์มข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอม และซิวแม่จัน 11

4 ผลของ 2,4-D กับ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสของเอนโดสเปอร์ม 11

5 การย้ายแคลลัสจากอาหารวุ้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 13

6 การเปรียบเทียบแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 23 กับแคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยตรง 15

7 ลักษณะของแคลลัสแขวนลอยจากเอนโดสเปอร์มของข้าวพันธุ์ดอกพะยอม 16

8 การเปรียบเทียบแคลลัสแบบร่วนของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ได้จากอาหารวุ้นกับแคลลัสแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงในอาหารเหลว 17

9 ผลของระดับ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอม 19

10 ผลของความเร็วในการเขย่าขวดเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส 19

11 การเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสแขวนลอยพันธุ์ดอกพะยอมในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V 20

12 ผลของเอนไซม์กลุ่ม Cellulase และ Pectinase ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอย 21

13 การตรวจสอบการสังเคราะห์แป้งโดยเอนไซม์ Starch synthase ในน้ำสกัดหยาบแคลลัสแขวนลอยข้าวพันธุ์ดอกพะยอม 23

สัญลักษณ์และคำย่อ

ซม.	เซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
%	เปอร์เซนต์
g/l	กรัมต่อลิตร
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
mm	มิลลิเมตร
nm	นาโนเมตร
μm	ไมโครเมตร หรือไมครอน
M	โมลาร์ (โมล/ลิตร)
mM	มิลลิโมลาร์ (มิลลิโมล/ลิตร)
μM	ไมโครโมลาร์ (ไมโครโมล/ลิตร)
rpm	รอบต่อนาที
kBq	kiloBecquerel (1 Bg = disintegration/second)
ADP	adenosime 5'-diphosphate
BA	benzyladenine
BSA	bovine serum albumin
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetra-acetate
IAA	indole acetic acid
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulphonic acid
PP_i	inorganic pyrophosphate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
LS	Linsmaier and Skoog (1965)
MS	Murashige and Skoog (1962)

บทนำ

ข้าวไร่เป็นพืชที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถปลูกร่วมกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นได้ เพราะไม่ต้องทำคันกักน้ำระหว่างการปลูก เกษตรกรจะอาศัยน้ำฝนตามฤดูกาลธรรมชาติในการปลูกข้าวไร่และเก็บผลิตผลไว้สำหรับบริโภคในครอบครัว แต่ผลผลิตของข้าวไร่จะต่ำเนื่องจากเกษตรกรใช้พันธุ์ข้าวพื้นเมืองตามแต่ความนิยมในท้องถิ่นในแง่คุณสมบัติของเมล็ดและคุณภาพข้าวสุกที่หุงได้ การคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่เพื่อให้ผลผลิตสูง คุณภาพดีและเหมาะสมกับระบบปลูกพืชตามปัจจัยแวดล้อมในท้องถิ่น จะช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนอาหารและบรรเทาปัญหาทางเศรษฐกิจและสังคมของเกษตรกรด้วย

ข้าวไร่พันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมโดยสถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ให้ปลูกในภาคใต้ เช่น พันธุ์กู้เมืองหลวง และพันธุ์ดอกพะยอม เพราะต้านทานโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาลและต้านทานเพลี้ยจักจั่นสีเขียวได้ปานกลาง (ระรื่น บุญดวงและสมพล อุชชิน, 2533) ในแง่ของคุณภาพการหุงต้ม พันธุ์ดอกพะยอมจัดว่าเป็นพันธุ์ดี เพราะมีรสชาติดีและมีกลิ่นหอมคล้ายข้าวหอมมะลิ 105 จึงนำมาศึกษาในโครงการวิจัยนี้เพื่อทดสอบความไว (sensitivity) ต่อสิ่งแวดล้อมของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์แป้งในเมล็ดข้าวส่วนที่เป็นเอนโดสเปอร์ม (endosperm) โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension culture) ซึ่งจะใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่จะศึกษา

ลักษณะและสมบัติของเมล็ดข้าวขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของแป้ง (De Datta, 1981) ข้าวเหนียวจะมีปริมาณแป้งชนิดอะมัยโลส (amylose) เพียง 1-2 % ส่วนข้าวเจ้ามีปริมาณอะมัยโลสแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 8-37 % และมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดเมื่อหุงสุกแล้ว ซึ่งมีความสำคัญต่อการเลือกชนิดของข้าวโดยผู้บริโภค ผลงานวิจัยเกี่ยวกับปริมาณอะมัยโลสในเมล็ดข้าวบ่งชี้ว่า ปริมาณอะมัยโลสขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและปัจจัยแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิในช่วงเมล็ดข้าวกำลังเติบโต ถ้าอุณหภูมิสูงปริมาณอะมัยโลสจะต่ำ (Jennings *et al.*, 1979; Asaoka *et al.*, 1985)

การสังเคราะห์แป้งในเมล็ดธัญพืชและพืชหัวชนิดต่าง ๆ มีปฏิกิริยาตามลำดับดังนี้ (Preiss et al., 1985)

1. ADP + glucose 1-phosphate $\rightleftharpoons$ ADP-glucose + PP_i
2. ADP-glucose + $(glucose)_n$ (primer) $\longrightarrow$ $(glucose)_{n+1}$ + ADP

3. linear α 1,4 glucan ⟶ branched glucan 4-7%, α 1,6 linkage

ปฏิกิริยาที่ 1 มีเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase (E.C. 2.4.1.27) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ 2 มีตัวเร่งคือ starch synthase (E.C. 2.4.1.21) และ branching enzyme (E.C. 2.4.1.18) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ 3 จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้บางตัวในพืชชนิดอื่น ๆ บ่งชี้ได้ว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อปริมาณและการทำงานของเอนไซม์ (Hawker, 1982) นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์มีหลายรูป (Jennings *et al.*, 1979; Chen and Janes, 1997) เอนไซม์บางตัวติดแน่นกับเม็ดแป้ง ในขณะที่บางตัวอยู่ในส่วนของสารละลาย ("soluble form") ดังนั้น จึงน่าจะศึกษาเอนไซม์เหล่านี้ เพื่อทราบลักษณะ การทำงานและปัจจัยแวดล้อมที่มีต่อผลผลิตของข้าว ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับแนะนำให้เกษตรกรปลูกในภูมิภาคต่าง ๆ

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยมีข้อดีต่อเซลล์คือ เซลล์ได้รับอาหารและก๊าซอย่างทั่วถึง เซลล์จึงเติบโตอย่างรวดเร็ว ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะได้เซลล์จำนวนมากเป็นแหล่งของเอนไซม์สำหรับศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและผลกระทบของปัจจัยแวดล้อมต่อการทำงานของเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิ และสารอาหารที่เปลี่ยนแปลง การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเอนโดสเปอรม์ของหญ้าไรย์ (ryegrass, *Lolium multiflorum*) เพื่อใช้ศึกษาการสังเคราะห์สารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ทำได้สำเร็จตั้งแต่ปี ค.ศ. 1973 (Smith and Stone, 1973b) งานเพาะเลี้ยงเซลล์ข้าวแบบแขวนลอยส่วนใหญ่จะเน้นประโยชน์ในการเตรียม protoplast สำหรับงานทางพันธุวิศวกรรม (Basu *et al.*, 1997) ซึ่งมักจะใช้เซลล์จากคัพภะ (embryogenic cell) และเกษรตัวผู้ (anther culture)

สูตรอาหารที่มีผู้นำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์พืชกันมากคือ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ N_6 (Chu *et al.*, 1976) ซึ่งต่างกันที่ปริมาณแอมโมเนียม (ammonium, NH_4^+) และไนเตรต (nitrate, NO_3^-) ไอออนทั้งสองสามารถเป็นต้นกำเนิดของสารประกอบไนโตรเจนของพืช โดยพืชจะใช้ได้ดีทั้งแอมโมเนียมและไนเตรต (Crawford *et al.*, 1988; Holme, 1998) อย่างไรก็ดี เซลล์พืชแต่ละชนิดจะต้องการไอออนสองอย่างนี้ในสัดส่วนแตกต่างกันไป นักวิจัยแต่ละกลุ่มจึงปรับปรุงสูตรอาหารทั้งสองให้เหมาะกับความต้องการของเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ยังมีการผสมสารอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะมิโนและโปรตีนเพื่อเพิ่มแหล่งของไนโตรเจน เช่น Holme และคณะ (1997) เติมโพรลีน (proline) ในอาหารสูตร MS และ N_6 เพื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของหญ้าพันธุ์ผสม *Miscanthus* x

ogiformis Honda 'Giganteus' ส่วน Basu และคณะ (1997) เติม casein hydrolysate ในอาหารวุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสของข้าวระหว่างการศึกษาการชักนำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ Basmati 370 ที่ทนเค็มให้เป็นต้นใหม่ (regeneration) และในงานของ Wenjing และคณะ (1997) ใส่ทั้งโพรลีนและทริปโตแฟน (tryptophan) เพื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของคัพภะ (embryogenic callus) ของข้าวกลุ่ม japonica

โครงการวิจัยนี้มีวุตถุประสงค์ดังนี้

1. ทดลองนำเอนโดสเปอร์มของข้าวไร่พันธุ์ต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลว และหาสูตรอาหารที่เหมาะสมมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เอนโดสเปอร์ม

2. สกัดและศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แป้งจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ADP-glucose pyrophosphorylase และ starch synthase

3. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แป้ง

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. สารเคมี

ใช้สารเคมีเกรดดีที่สุดเท่าที่จะหาได้ในท้องตลาด ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2. เมล็ดพันธุ์ข้าว

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อ.เมือง จ.พัทลุง

พันธุ์ข้าวที่นำมาปลูกเพื่อใช้เมล็ดอ่อนได้แก่

พันธุ์ข้าวไร่ : ดอกพะยอม กู้เมืองหลวงและซิวแม่จัน

พันธุ์อื่น ๆ : หอมมะลิ 105, พัทลุง. 60, กข 23 และแก่นจันทร์

เก็บพันธุ์ข้าวที่ได้รับไว้ในถุงกระดาษสีน้ำตาลและห่อผนึกปิดสนิทในถุงพลาสติก เก็บในลิ้นชักชั้นล่างสุดของตู้เย็น ซึ่งสามารถรักษาความงอกไว้ได้นานหลายปี

3. การปลูกข้าวและเก็บเมล็ดอ่อน

แช่เมล็ดข้าวในน้ำสะอาด 1 คืน นำไปปลูกในถังพลาสติกขนาด 20 ลิตร ทั้งนอกและในเรือนกระจก (คณะทรัพยากรธรรมชาติ) โดยใส่ดินจากท้องถิ่น ให้ต่ำกว่าปากถังประมาณ 2 นิ้ว ปลูกจำนวน 10 ต้นต่อถัง เติมน้ำให้เต็มถังทุก 5-7 วัน และใส่ปุ๋ยสูตร 28-28-0 ถังละ 1 กรัม เดือนละครั้ง

เก็บเมล็ดอ่อนหลังดอกข้าวบาน 6-10 วัน ซึ่งเมล็ดส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ grain-filling stage คือน้ำนมถึงเริ่มเป็นแป้งนิ่ม

4. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวอ่อน

แกะเมล็ดข้าวอ่อน (immature spikelet) จากก้านรวง แล้วทดลองฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวทั้งเปลือก 2 วิธี

4.1 วิธีของ Nakano และคณะ (1975)

กวนเมล็ดข้าวประมาณ 200 เมล็ด ในน้ำกลั่น 100 มล. ผสมน้ำยาซักฟอก Teepol 3 หยด นาน 30 นาที เทน้ำทิ้งแกะเปลือกให้ lemma และ palea แยกออกแล้วเขย่าเมล็ดข้าวในเอทานอล (ethanol) 70% นาน 1 นาที ตามด้วย Chlorox 5% อีก 10 นาที ขั้นสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง (ในตู้ Laminar Flow)

4.2 ใช้วิธีการตาม Cell and Protoplast Culture for Regeneration of Indica Rice Manual (The Rockefeller Foundation) ดังนี้

ใช้ magnetic stirrer ที่ความเร็วปานกลางกวนเมล็ดข้าวอ่อนประมาณ 200 เมล็ด ในน้ำกลั่น 100 มล.ผสมน้ำยาซักฟอก Teepol (หรือ Tween-20) 3 หยด ในฟลาสก์ (flask) ที่ต่อกับปั๊มลม (air pump) นาน 20 นาที รินน้ำทิ้งและล้างด้วยน้ำ ปลอดไอออน (deionized water) ใส่เอทานอล 70% (v/v) และเขย่าแรง ๆ นาน 90 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำปลอดไอออน จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฟอกขาว Chlorox 50% (v/v) หรือ Haiter โดยเจือจางให้ได้ sodium hypochlorite เข้มข้น 2.6% ผสม Teepol (หรือ Tween-20) 1 หยด กวนด้วย magnetic stirrer พร้อมกับดูดอากาศออกนาน 1 ชั่วโมง 40 นาที (100 นาที)

ขั้นสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง (ในตู้ Laminar Flow)

5. การเตรียมอาหารวุ้น และอาหารเหลว

อาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ เตรียมตามสูตรในภาคผนวก ได้แก่ MS, N_6 , Modified White's และ LS เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส (Merck และ Carlo Erba) 3-4%, yeast extract (Difco) 0.25 - 0.5% , casein enzymatic hydrolysate (Sigma) 0.1%, Gelrite (Schweizer Hall, ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ) ใช้ 1.5 g/l และผสมฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 2,4-D (Fluka), IAA , Kinetin และ BA (จากบริษัท Sigma ทั้งหมด) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 5 mg/l สำหรับ IAA ต้องละลาย IAA ในน้ำเจือด่างเล็กน้อยพอละลายแล้วกรองผ่านแผ่นกรองฆ่าเชื้อขนาด 0.22 µm แล้วนำมาผสมกับอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วจึงแบ่งอาหารวุ้นใส่ขวดเพาะเลี้ยง ขวดละ 7-10 มล. ฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ สามารถผสมลงในอาหารก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที ปรับ pH ก่อนเติม Gelrite

อาหารเหลวเตรียมตามสูตรในภาคผนวก ได้แก่ MS (Murashige and Skoog, 1962), N_6 (Chu *et al.*,1975), Modified White's (Smith and Stone, 1973) และ LS (Linsmaier and Skoog, 1965) เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 3-4 % , และ yeast extract 4% หรือ โพรลีน 1.15 -

2.3 g/l (0.01 - 0.02 M) ในช่วงหลังได้ทดลองเพิ่มปริมาณส่วนผสมวิตามินและไกลซีน (glycine) เป็น 2 เท่าลงในอาหารเหลวสูตร N_6 เป็นอาหารสูตร N_62V และผสมฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 2,4-D, IAA, Kinetin และ BA ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 5 mg/l (สำหรับ IAA ต้องละลาย IAA ในน้ำเจือด่างเล็กน้อยพอละลายแล้วกรองผ่านแผ่นกรองฆ่าเชื้อขนาด 0.22 µm แล้วนำมาผสมกับอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ปรับ pH ก่อนแบ่งใส่ขวดมีฝาปิด (Duran) ขวดละ 125 มล. และ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์เอนโดสเปอร์ม (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

แยกเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มจากเมล็ดข้าวในระยะติดเมล็ดซึ่งฟอกฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ใบมีดปลอดเชื้อตัดที่โคนซึ่งมีคัพภะแยกออกไปและใช้ปากคีบสะอาดกดบีบปลายด้านตรงข้ามให้เนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มหลุดออกจากเปลือกและ pericarp (ถ้าเมล็ดข้าวเริ่มแข็งจะไม่สามารถบีบให้เนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มหลุดออกมาได้เพราะเนื้อเยื่อจะติดแน่นกับ pericarp)

6.1 การชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มบนอาหารวุ้น

นำเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 2 มม. (ทดลองทั้งตัดขวางและตามทางยาว) ไปใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาดเล็กโดยวางบนอาหารวุ้น (มีปริมาตรอาหาร 7-10 มล.) สูตรต่าง ๆ ที่เตรียมตามสูตรในภาคผนวก ได้แก่ MS, N_6 , Modified White's และ LS เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 3-4%, yeast extract 0.25 - 0.5% , casein enzymatic hydrolysate 0.1%, Gelrite 1.5 g/l และผสมฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 2,4-D, IAA , Kinetin และ BA ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 5 mg/l พันรอบปากขวดเพาะเลี้ยงด้วย parafilm (3M) และตั้งขวดไว้ในที่มืดในห้อง ปรับอากาศที่ 20-25 °C

6.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มโดยตรงในอาหารเหลว

บดเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มเบา ๆ ด้วยปากคีบ ในอาหารเหลวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และใช้ Pasteur pipet (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ผสมให้เข้ากันดี ใส่ลงในฟลาสก์เพาะเลี้ยงขนาด 125 มล. หรือ 250 มล. โดยใช้เอนโดสเปอร์มจากเมล็ดข้าว 1 เมล็ด ต่ออาหารเหลว 5-10 มล. ใช้อาหารเหลวสูตรต่าง ๆ คือ MS, N_6 , Modified White's และ LS ซึ่งเตรียมตามสูตรในภาคผนวกท้ายรายงาน เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 3-4 % , และ yeast extract 4% หรือโพรลีน 1.15 - 2.3 g/l (0.01 - 0.02 M) ในช่วงหลังได้ทดลองเพิ่มปริมาณส่วนผสมวิตามินและ glycine เป็น 2 เท่าลงในอาหารเหลวสูตร N_6 เป็นอาหารสูตร N_62V นำฟลาสก์เพาะ

เลี้ยงวางบนเครื่องเขย่าแบบเปิด (สร้างโดย ผศ.แสวง กะระณา, คณะวิศวกรรมศาสตร์) ที่อัตราประมาณ 80 รอบต่อนาที (rpm) หรือเครื่องเขย่า (แบบเปิด) ที่อัตรา 100 rpm (ขอยืมจาก รศ.ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ) และเครื่องเขย่าที่อัตรา 120 rpm (TAITEC Rotary Shaker NR-20) เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงปรับอากาศอุณหภูมิ 20-25 °C

7. การศึกษาการเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสแขวนลอย

แบ่งแคลลัสแขวนลอยข้าวพันธุ์ดอกพะยอมที่ได้ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $N_6$2V เสริมด้วย โพรลีน 2.3 g/l และซูโครส 4% ผสม 2, 4-D 1 mg/l ในอัตราแคลลัสสด 0.5 กรัมต่ออาหารเหลว 15 มล. (ทำ 3 ซ้ำ) นำแคลลัสมาหาน้ำหนักสดในวันที่ 6 , 14, 19 หลังจากเริ่มเปลี่ยนอาหาร การชั่งน้ำหนักแคลลัสทำในสภาพปลอดเชื้อ และก่อนชั่งซับของเหลวที่ติดอยู่กับแคลลัสออกโดยใช้ผ้าก๊อซที่สะอาดปลอดเชื้อ หลังการบันทึกน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงแล้ว นำแคลลัสกลับลงเลี้ยงต่อในอาหารขวดเดิม

8. การเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยในอาหารที่มีเอนไซม์ป้องกันการเกาะกลุ่มของเซลล์

แบ่งแคลลัสแขวนลอย (DPSC-1) ที่มีลักษณะเป็นแผ่นใหญ่ใช้ spatula (ฆ่าเชื้อแล้ว) กดเบา ๆ ให้ก้อนแตกแยกกันเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 - 3 มม. แล้วแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยง $N_6$2V เสริมน้ำตาลซูโครส 4% และโพรลีน ผสม 2, 4-D 1 mg/l ส่วนที่ 2 ใส่ลงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่เพิ่ม Cellulase "Onozuka"R-10 (Yakult) 0.05% กับ Driselase (Sigma) 0.05% ส่วนที่ 3 ใส่ในอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่มี Macerozyme R-10 (Yakult) 0.1% นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 120 rpm. ในห้องมืดปรับอุณหภูมิ 20-25°C

9. การศึกษาการสังเคราะห์แป้งโดยแคลลัส

นำแคลลัสแขวนลอยสดประมาณ 1 กรัมมาบดให้ละเอียดในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M pH 7.8 (ซึ่งมี EDTA 1 mM และ mercaptoethanol 28 mM) ที่ 4°C ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัมต่อมล. โดยใช้โกร่งบดยา แล้วกรองผ่านแผ่นสำลีหุ้มผ้าก๊อซ 4 ชั้น เก็บน้ำกรองซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ(crude extract) มาศึกษาการสังเคราะห์แป้งโดยวัดการย้าย [^{14}C]glucose จาก

ADP-[^{14}C]glucose ไปต่อที่โมเลกุลแป้ง (transglycosylation) โดยปรับจากวิธีของ Ghosh และ Preiss (1965) และของ Smith และ Stone (1973 b) ใช้หลอด Eppendorf ขนาดจุ 1.5 มล. มีฝาปิด ผสม crude extract 0.05 มล. (มีโปรตีนประมาณ 0.2 มก.) กับ ADP-glucose 0.3 µmol (ซึ่งมี ADP - [^{14}C]glucose 2 kBq) กับ soluble starch (BDH) 1 มก. ในบัฟเฟอร์ MOPS 50 mM ที่ pH 7.5 ผสมกับ $MgCl_2$ 20 mM และ DTT 0.5 mM ปริมาตรของปฏิกิริยา 0.3 มล. ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (22-25°C) นาน 5, 10 และ 15 นาที (แต่ละเวลาทำ 3 ซ้ำ) ในหลอดควบคุม (เวลา 0 นาที) ต้มเอนไซม์ก่อนเติม ADP-Glucose หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที เมื่อเย็นแล้วแบ่งส่วนผสมมา 0.1 มล. หยอดลงบนแผ่นกรองใยแก้ว (glass filter,GF/A-Whatman) ขนาด 2.5 มม. (ทำ 2 ซ้ำ) ตากแห้งโดยใช้หลอดไฟฟ้ากำลังสูง 60 วัตต์ เมื่อแห้งแล้วนำแผ่นกรองใยแก้วไปแช่ล้างในเอทานอล 66% ผสม EDTA 0.8 mM นาน 30 นาที ตามด้วยเอทานอล 66% นาน 30 นาที และเอทานอล 70% นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยเอทานอล 95% และใช้ acetone ล้างเป็นน้ำสุดท้าย ทิ้งให้แห้งนำไปวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (Beckman LS 5000 TD) โดยใช้สารละลาย Toluene ปริมาตร 5 มล. ผสม 2,5-diphenyloxazole 0.5% และ 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazole) 0.03%

10. การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนใน crude extract อาศัยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ใช้ crude extract ปริมาตร 15-30 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 0.1 มล. และผสมกับสารละลาย deoxycholate 10 % ปริมาตร 0.4 มล., Na_2CO_3 (2 % ใน 0.1 M NaOH) 5 มล. และสารละลายผสมระหว่าง $CuSO_4.5H_2O$ 1 % กับ sodium/potassium tartrate 2 % (ปริมาตรเท่ากัน) 0.1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมกับ Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Merck) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นเท่าตัว ปริมาตร 0.5 มล. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 nm. หลังจากและตั้งไว้ 30 นาที เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลาย BSA (Sigma) ที่มีปริมาณโปรตีน 40-180 ไมโครกรัม

ผลการทดลอง

1. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของข้าวในอาหารวุ้น

ในระยะเริ่มต้น ความพยายามที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อนในอาหารวุ้นและอาหารเหลวไม่เป็นผลสำเร็จ เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราในเมล็ดข้าวอ่อนที่เก็บมาทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากการล้างและฆ่าเชื้อตามวิธีของ Nakano และคณะ (1975) ซึ่งใช้เวลาสั้นมาก จึงไม่สามารถขจัดเชื้อราได้หมด เมื่อใช้วิธีการล้างในน้ำผสม Teepol หรือ Tween-20 ตามด้วยการเขย่าในเอทานอล 70% แล้วฆ่าเชื้อใน 2.0% sodium hypochlorite พร้อมกับดูดอากาศออกนาน 1 ชั่วโมง 40 นาที จึงสามารถขจัดเชื้อราจากเมล็ดข้าวได้อย่างทั่วถึง

เมื่อนำส่วนของเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อนที่ปลอดเชื้อแล้วมาทดลองวางบนอาหารวุ้นสูตร MS, N_6, Modified White's และ LS เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 3-4% กับ yeast extract (0.25 - 0.5%) หรือ casein enzymatic hydrolysate (0.1 %) และผสมฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 6 mg/l เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มได้ดีคือ อาหารสูตร MS เสริมน้ำตาลซูโครส 3% และผสม 2,4-D 1 mg/l และข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบและเกิดแคลลัสได้แก่ พันธุ์หอมมะลิ 105 (รูปที่ 1) กู้เมืองหลวง (รูปที่ 2a)และพัทลุง 60 (รูปที่ 2b) ดอกพะยอมและซิวแม่จัน (รูปที่ 3) และในรูปที่ 4 แสดงแคลลัสของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เกิดขึ้นในอาหารที่มี BA 4 mg/l ร่วมกับ 2,4-D และที่มี 2,4-D 1 mg/l อย่างเดียว

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่มีโฮร์โมน BA 1-4 mg/l จะกลายเป็นสีน้ำตาลหลังจาก 2 เดือนและตายไปในที่สุด ส่วนการทดลองใช้ Kinetin และ IAA เพียงอย่างเดียวในระดับ 1-2 mg/l ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และการทดลองใช้ Kinetin และ IAA ร่วมกับ 2,4-D พบว่าไม่ได้เสริมผลของ 2,4-D นอกจากนี้ในการใช้ IAA ไม่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมกับอาหารจะต้องใช้ชุดกรองฆ่าเชื้อสารละลาย IAA แยกต่างหากแล้วจึงมาผสมกับอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำให้อาหารวุ้นติดเชื้อราได้ง่าย ดังนั้นจึงใช้อาหารวุ้นสูตร MS เสริมด้วยซูโครส 3% และผสม 2,4-D 1 mg/l เป็นอาหารสูตรหลักในการชักนำแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวที่นำมาศึกษา แคลลัสที่ได้มีทั้งแบบร่วน (friable) และเป็นก้อนแน่น (compact) การแบ่ง

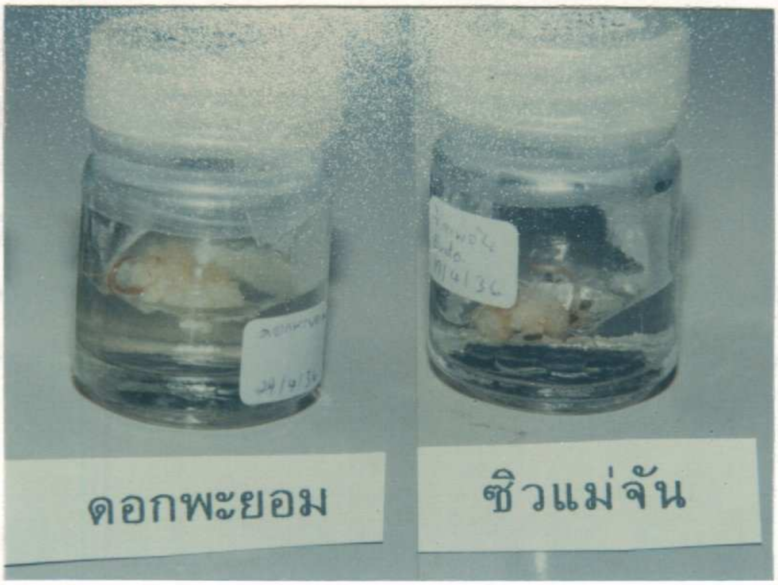
รูปที่ 1 แคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปอร์มข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ในอาหารวุ้น

แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอนโดสเปอร์มข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ในอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l (แคลลัสอายุ 32 วัน)

a. **b.**

รูปที่ 2 แคลลัสที่ได้จากเอนโดสเปอร์มข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงและข้าวพันธุ์พัทลุง 60

แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอนโดสเปอร์มข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง (a) และข้าวพันธุ์พัทลุง 60 (b)ในอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l



รูปที่ 3 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอนโดสเปอร์มข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอม และซิวแม่จัน ในอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l

รูปที่ 4 ผลของ 2,4-D กับ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสของเอนโดสเปอร์ม แคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เลี้ยงได้ในอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l (ขวดขวา) เทียบกับ สูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l และ BA 4 mg/l (ขวดซ้าย)

ขยายแคลลัส (subculture) เพื่อเพิ่มจำนวนบนอาหารวุ้นต่อไปอีกไม่เป็นผลสำเร็จ แม้ว่าจะใช้แคลลัสที่อายุประมาณ 1 เดือนซึ่งยังเป็นระยะที่แคลลัสกำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว

อาหารวุ้นสูตรที่มี yeast extract เป็นส่วนผสม (ได้แก่LS และ Modified White's, ดูภาคผนวก) ไม่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสในสภาวะของห้องปฏิบัติการที่ใช้อยู่ เนื่องจากอาหารจะเสียก่อนที่จะเกิดแคลลัส เพราะใน yeast extract มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง ซึ่งทำให้ติดเชื้อได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบว่าในการทดลองนี้ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อน เมื่อใช้อาหารวุ้นสูตร N_6 ซึ่งมี casein enzymatic hydrolysate เป็นองค์ประกอบ

2. การย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เมื่อย้ายแคลลัสทุกชนิดที่ชักนำได้ในอาหารวุ้นไปถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร MS หรือ N_6 และเสริมด้วยซูโครส 3- 4% ผสมกับ 2,4-D 1-4 mg/l และ Kinetin 0 - 2 mg/l ในสัดส่วนแคลลัส 0.2 กรัมต่ออาหารเหลว 10 มล. เขย่าในอัตรา 100 rpm และถ่ายเปลี่ยนอาหารทุก 3-4 วัน ในสองสัปดาห์แรกและทุก 2-3 สัปดาห์ ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือขนาดของแคลลัสได้แม้ว่าจะใช้เวลานานกว่า 6 เดือน เช่นในรูปที่ 6

3. การเกิดแคลลัสแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงโดยตรงในอาหารเหลว

ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการวิจัย ได้ทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสแขวนลอยโดยตรงในอาหารเหลวควบคู่ไปกับการชักนำแคลลัสในอาหารวุ้น โดยทดลองนำเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อนระยะเป็นน้ำนมถึงระยะเป็นแป้งนิ่มมาบดเบา ๆ แล้วใส่ลงในขวดเลี้ยงที่มีอาหารเหลว 5-10 มล. ใช้อาหารสูตร LS, Modified White's, MS, N_6, หรือ $N_6$2V และเสริมด้วยซูโครส 3-4% ผสมกับ 2,4-D 1-4 mg/l และ Kinetin 0-2 mg/l เขย่าด้วยอัตราเร็วประมาณ 100 rpm และถ่ายเปลี่ยนอาหารทุก 3-4 วัน ในสองสัปดาห์แรกและทุก 2 - 3 สัปดาห์ในระยะต่อมาอีกสามเดือน หลังจากที่ทดลองทำดังนี้หลายครั้งในแต่ละรอบปีเป็นเวลาหลายปี เมื่อต้นเดือนตุลาคม พ.ศ. 2541 นี้ จึงพบว่าเกิดแคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมขวดหนึ่งซึ่งอยู่ในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมด้วย โพรลีน 2.3 g/l (0.02 M) และซูโครส 4 % ผสมกับ 2,4D 1 mg/l (DPSC-1) และอีกขวดหนึ่งมี 2,4-D 3 mg/l (DPSC-2) แคลลัสแขวนลอยที่ได้ทั้งสองขวดได้จากการเริ่มเพาะเลี้ยงเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2541 ทั้งนี้

<u>รูปที่ 5</u> การย้ายแคลลัสจากอาหารวุ้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

แคลลัสของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เลี้ยงได้ในอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/L ไม่เพิ่มจำนวนหรือขนาดเมื่อย้ายลงในอาหารเหลวสูตร N_6 ผสม 2,4-D 4 mg/L เสริมน้ำตาลซูโครส 4 % (ซ้าย) หรือ 3 % (ขวา) แม้ว่าจะถ่ายเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 สัปดาห์นานกว่า 6 เดือน

DPSC-1 มีอัตราการ เจริญเติบโตเร็วกว่า DPSC-2 จึงนำแคลลัสชุด DPSC-1 มาแบ่งขยายเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ศึกษาการเจริญเติบโตและทดสอบด้านเอนไซม์ต่อไป นอกจากนี้ยังได้แคลลัสแขวนลอยที่เกิดโดยตรงจากเอนโดสเปอร์มของข้าวพันธุ์ กข 23 หนึ่งขวดในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมด้วย โพรลีน 2.3 g/l (0.02 mol/l) และซูโครส 3% ผสมกับ 2,4-D 4 mg/l ซึ่งเริ่มเพาะเลี้ยงเมื่อ 23 มิถุนายน 2541 แคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 23 มีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 มม.) และมีอัตราการเติบโตที่ช้ามาก ความแตกต่างระหว่างแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมและ กข 23 เห็นได้ชัดเจนในรูปที่ 6 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแคลลัส กข 23 มีกำเนิดจากเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน

แคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอม (DPSC-1) มีลักษณะเป็นแผ่นมีการขยายขนาดออกด้านข้างจนโค้งงอมาชนกันเหมือนเป็นก้อน (รูปที่ 7a) ขนาด 5 - 8 มม. บางครั้งมีการขยายต่อกันไปทางเดียวจนเป็นวง (รูปที่ 7b) แคลลัสมีสีขาวนวล แต่ถ้าเพาะเลี้ยงโดยไม่เปลี่ยนอาหารเกิน 3 สัปดาห์ หรือไม่แบ่งใส่ขวดใหม่ สีของแคลลัสจะเริ่มมีสีออกเหลืองและดูแน่นขึ้น (รูปที่ 7c) ส่วนในรูปที่ 8 จะเห็นความแตกต่างระหว่างแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมที่เกิดโดยตรงในอาหารเหลวซึ่งมีขนาดใหญ่ กับแคลลัสแบบร่วนของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมซึ่งเป็นแคลลัสขนาดเล็กที่ได้จากอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว

4. ผลของระดับ 2,4-D และความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

จากผลการทดลองซึ่งเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมได้โดยตรงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมโพรลีน 0.02 Mและซูโครส 4 % ที่มี 2,4-D ทั้งที่ระดับ 1 mg/l และ 3 mg/l จึงทดสอบว่า 2,4-D ที่ระดับใดจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด โดยนำแคลลัส DPSC-1 ไปแบ่งแยกเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมโพรลีน 0.02 Mและซูโครส 4 %ที่มี 2,4-D ระดับ 1, 3 และ 4 mg/l พบว่าภายใน 2 สัปดาห์แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณและขนาดได้ดีใกล้เคียงกัน ดังในรูปที่ 9 แสดงว่าระดับ 2,4-D ในช่วง 1-4 mg/l มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบความเร็วในการเขย่าฟลาสก์ระหว่าง 100 rpm กับ 120 rpm พบว่าภายใน 2 สัปดาห์แคลลัสเติบโตได้ดีใกล้เคียงกัน ดังในรูปที่ 10 แคลลัสมีขนาดและปริมาณ

<u>รูปที่ 6</u> การเปรียบเทียบแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 23 กับแคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยตรง

แคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 23 ที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงในอาหารเหลวสูตร N_6 ผสม 2,4-D ในระดับ 4 mg/l เสริมน้ำตาลซูโครส 3% (กลุ่มขวามือ)

เทียบกับแคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ได้โดยตรงจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V ผสม 2,4-D 1 mg/l เสริมน้ำตาลซูโครส 4% (กลุ่มซ้ายมือ)

<u>รูปที่ 7</u> ลักษณะของแคลลัสแขวนลอยจากเอนโดสเปอร์มข้าวพันธุ์ดอกพะยอม

a. แคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V ผสม 2,4-D 1 mg/l เสริมน้ำตาลซูโครส 4 % ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นขยายออกรอบข้างจนโค้งงอเหมือนเป็นก้อน

b. แคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ขยายขนาดออกไปทางเดียวจนเป็นวง

c. แคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เปลี่ยนอาหารเกิน 3 สัปดาห์ หรือไม่แบ่งใส่ขวดใหม่ จะเริ่มมีสีเข้ม

รูปที่ 8 การเปรียบเทียบแคลลัสแบบร่วนของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ได้จากอาหารวุ้นกับแคลลัสแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงในอาหารเหลว

แคลลัสแบบร่วนของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่ได้จากอาหารวุ้นสูตร MS ผสม 2,4-D 1 mg/l ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว (ซ้าย) กับ แคลลัสแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2Vผสม 2,4-D 1 mg/l (ขวา) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า

ใกล้เคียงกันในฟลาสก์เมื่อเริ่มต้นด้วยปริมาณแคลลัสและอาหารที่เท่ากัน นอกจากนี้ยัง แสดงว่าการเขย่าที่ 120 rpm ไม่แรงพอที่จะทำให้แผ่นแคลลัสแตกละเอียดและเซลล์กระจาย ออกเป็นเซลล์เดี่ยว แต่สามารถแตกหักออกได้บ้าง เนื่องจากมีแคลลัสเพิ่มจำนวนขึ้นอย่าง ชัดเจนหลังการย้ายเปลี่ยนอาหารประมาณ 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ดีการที่แคลลัสที่ได้มี ลักษณะเป็นแผ่น ทำให้สะดวกในการถ่ายเปลี่ยนอาหารเมื่อเทียบกับเซลล์เดี่ยว ๆ แม้ว่า เซลล์ที่อยู่ภายในอาจมีปัญหาด้านการได้รับอาหารน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านนอกบ้างก็ตาม

5. การเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสแขวนลอย

เมื่อนำแคลลัสแขวนลอยไปศึกษาการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักแคลลัสสดหลัง การถ่ายเปลี่ยนลงอาหารสูตร $N_6$2V เสริมโพรลีน 0.02 Mและซูโครส 4 % ที่มี 2,4-D ที่ระดับ 1 mg/l เขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm ในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 22-25 °C ได้ผลว่าน้ำหนักของ แคลลัสเพิ่มขึ้น ประมาณ 20 % ใน 6 วัน และเพิ่มเป็น 60 % หลังถ่ายเปลี่ยนอาหาร 14 วัน (รูปที่ 11) ในการทดลองนี้ไม่ได้บันทึกน้ำหนักที่ช่วงเวลา 3 และ 10 วัน หลังการเปลี่ยน อาหาร (เนื่องจากผู้ทดลองมีภาระงานสอนในวันดังกล่าว) ผลการทดลองจึงไม่ได้ growth curve ที่สมบูรณ์ คือขาดช่วง lag phase และช่วง log phase ที่ชัดเจน อย่างไรก็ดีพอจะสรุป ได้ว่า เมื่อใช้สัดส่วนแคลลัส 0.5 กรัมต่ออาหาร 15 มล. แคลลัสจะเติบโตได้เต็มที่ในเวลา ประมาณ 15 วัน

6. การทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มีเอนไซม์ป้องกันการเกาะกลุ่ม

เนื่องจากแคลลัสที่ได้นั้นมีลักษณะเป็นก้อน/แผ่นโค้ง ไม่เป็นเซลล์เดี่ยวตามลักษณะ แคลลัสแขวนลอยในอุดมคติ จึงทดลองผสมเอนไซม์กลุ่ม celllase ได้แก่ Cellulase R-10 ผสมกับ Driselase (รวมเป็น 0.1 %) หรือ pectinase ได้แก่ Macerozyme R-10 (0.1 %) ลงใน อาหารเพาะเลี้ยงหลังจากแยกให้แคลลัสที่เป็นแผ่นใหญ่แตกออกบ้าง ตามวิธีการของ Hall (1992) พบว่าเมื่อมีเอนไซม์เหล่านี้ในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มของเซลล์ ได้บ้างเพราะกลุ่มของแคลลัสมีขนาดใกล้เคียงกับตอนเริ่มเปลี่ยนอาหาร (รูปที่ 12) แต่ปรา กฏว่าแคลลัสในขวดที่มี Cellulase ผสมกับ Driselase มีสีเข้มขึ้น

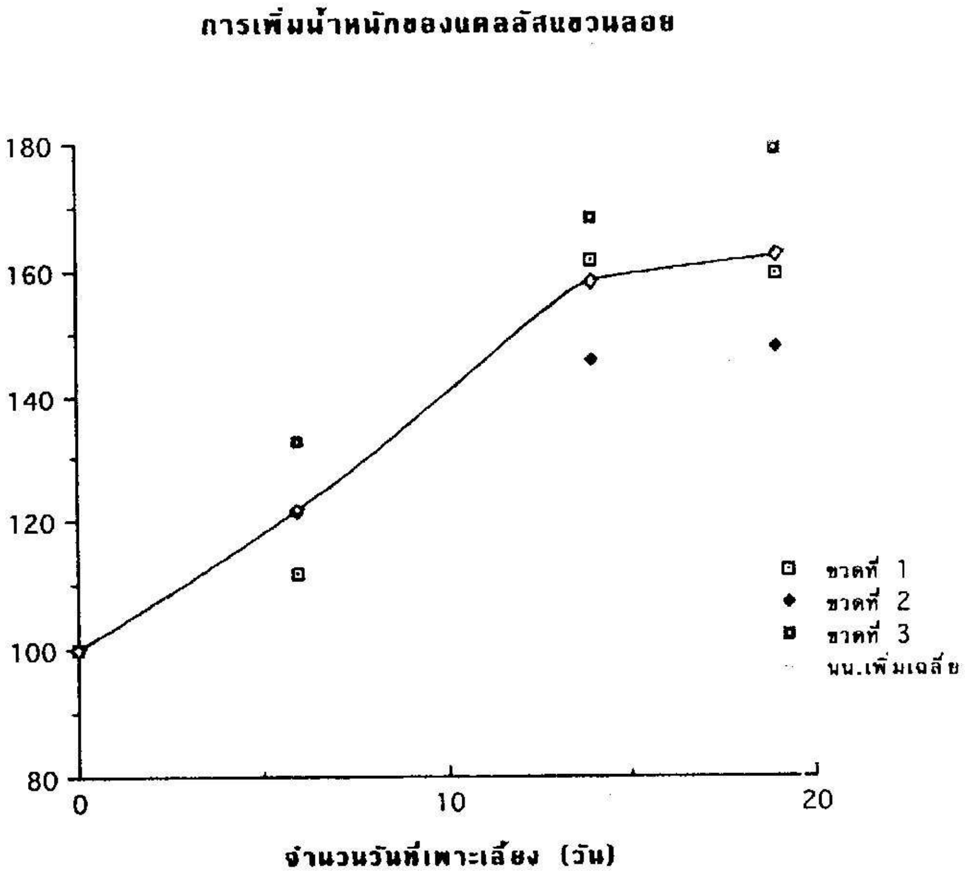
<u>รูปที่ 9</u> ผลของระดับ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอม

แคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงสามารถเติบโตได้ในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมโพรลีนและซูโครส 4% ผสม 2,4-D ในระดับ 1 mg/l (ซ้าย) 3 mg/l (กลาง) และ 4 mg/l (ขวา)

<u>รูปที่ 10</u> ผลของความเร็วในการเขย่าขวดเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส

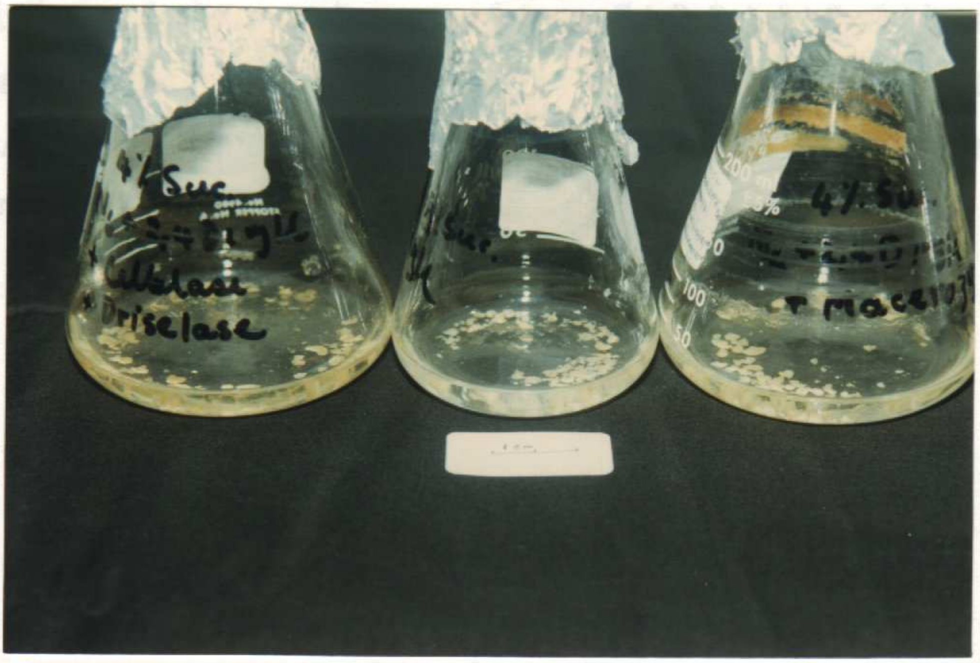
แคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เพาะเลี้ยงได้โดยตรงสามารถเติบโตได้ดีในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมโพรลีนและซูโครส 4% ผสม 2,4-D 1 mg/l เขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm (ขวดซ้าย) หรือ 100 rpm (ขวดขวา)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



<u>รูปที่ 11</u> การเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสแขวนลอยพันธุ์ดอกพะยอมในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V

การเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสแขวนลอยพันธุ์ดอกพะยอมที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $N_6$2V เสริมด้วยโพรลีน 2.3 g/l และซูโครส 4% ผสม 2,4-D 1 mg/l เขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm.ในระยะเวลา 19 วัน หลังจากถ่ายเปลี่ยนลงอาหารใหม่ เส้นกราฟที่แสดงได้จากค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแคลลัสสด 3 ขวด เริ่มการทดลองโดยใช้แคลลัสสดขวดละประมาณ 0.5 กรัม ต่ออาหารเหลว 15 มล.



รูปที่ 12 ผลของเอนไซม์กลุ่ม Cellulase และ Pectinase ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอย

แคลลัสแขวนลอยของข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เพาะเลี้ยงได้และแบ่งแยกให้ขนาดเล็กลงแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว $N_6$2V เสริมซูโครส 4% โพรลีน 2.3 g/l

และ 2,4-D 1 mg/l

เติม Cellulase 0.05 % กับ Drieselase 0.05 % (ขวดซ้าย)

เติม Macerozyme 0.1 % (ขวดขวา)

เปรียบเทียบกับแคลลัสที่เลี้ยงโดยไม่มีเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (ขวดกลาง)

7. การตรวจสอบการสังเคราะห์แป้งของแคลลัส

การตรวจสอบการสังเคราะห์แป้งโดยเอนไซม์ starch synthase ในน้ำสกัดหยาบของแคลลัสแขวนลอยจากข้าวพันธุ์ดอกพะยอมโดยวัดอัตราการย้ายหมู่กลูโคส (glucose) ไปเพิ่มบนโมเลกุลแป้ง (soluble starch) ที่เป็น primer ด้วยการดูปริมาณ [^{14}C]glucose ที่เคลื่อนย้ายในเวลา 5,10 และ15 นาที ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 13 จะเห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณกลูโคสที่ย้ายไปที่ primer โดยมีอัตราการย้าย 1.28 นาโนโมล/นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งได้ค่าอยู่ในช่วงเดียวกับผลการทดลองของ Ghosh และ Preiss (1965) ที่ได้อัตราการย้ายกลูโคส 6 นาโนโมล/นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้เอนไซม์สกัดจากคลอโรพลาสต์ แสดงว่าแคลลัสที่ได้สามารถใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาได้

บทวิจารณ์

1. ปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราและการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวอ่อน

ปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเอนโดสเปอร์มของข้าวเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวอ่อนที่เก็บมาจากเรือนกระจก ความยากในการขจัดเชื้อราในเมล็ดข้าวมีสาเหตุเนื่องจากดอกข้าวจะต้องบานเปิดออกเพื่อให้มีการผสมเกสรแล้วจึงปิดกลับระหว่างเกิดการเจริญเติบโตของคัพภะและเอนโดสเปอร์ม จึงเป็นโอกาสให้เชื้อราตกค้างภายในเปลือกและปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่อได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไม่มีสถานที่ปลอดเชื้อหรือตู้ Phytotron สำหรับปลูกพืชในบรรยากาศที่ควบคุมได้เพื่อใช้ในการทดลอง ซึ่งปัญหานี้ทำให้การทดลองล่าช้ามาก วิธีการขจัดเชื้อราที่ได้ผลคือ ต้องใช้ปั๊มดูดอากาศออกพร้อมกันกับการใช้สารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 2.6 % เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงกับ 40 นาที

2. การชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารวุ้นและการย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว

สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อนคือ อาหารสูตร MS เสริมน้ำตาลซูโครส 3% และผสม 2,4-D 1 mg/l แต่ในการทดลองนี้ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อนเมื่อใช้อาหารวุ้นสูตร LS และ Modified White's ซึ่งมี yeast extract เป็นองค์ประกอบ เพราะทำให้มีการติดเชื้อได้ง่ายเมื่อต้องเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังพบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อน เมื่อใช้อาหารวุ้นสูตร N_6 ซึ่งมี casein enzymatic hydrolysate เป็นองค์ประกอบ แม้ว่าอาหารสูตรเหล่านี้จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อข้าวได้ดี ทั้งเนื้อเยื่อคัพภะ (กฤษณา, 2541; Basu *et al.*, 1997; Wenjing *et al.*, 1997) และเอนโดสเปอร์ม (Nakano *et al.* 1975) เป็นไปได้ว่าระยะของการพัฒนาของเมล็ดข้าวอ่อนมีความสำคัญต่อความสามารถของเนื้อเยื่อที่จะกลายเป็นแคลลัส ทั้งนี้ในรวงข้าวรวงหนึ่งจะมีเมล็ดข้าวพัฒนาอยู่ในระยะต่าง ๆ กัน เพราะดอกข้าวในรวงจะบานไม่พร้อมกันโอกาสที่จะเลือกได้ระยะที่ถูกต้องจึงมีน้อย ในงานวิจัยนี้ได้พยายามใช้รวงข้าวหลังดอกบานแล้ว 6 -10 วัน ซึ่งควรจะได้แคลลัสจากเอนโดสเปอร์มตามผลการวิจัยของ Nakano และคณะ (1975) แต่

ความแตกต่างของผลการทดลองอาจเนื่องมาจากข้าวที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่ม indica ไม่ใช่ japonica อย่างของ Nakano และคณะ (1975)

การทดลองย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ในอาหารวุ้นไปเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ MS และ N_6 ที่มี 2,4-D และ Kinetin ตามวิธีของ Hall (1992) เพื่อให้เพิ่มปริมาณมากอย่างรวดเร็วนั้นไม่เป็นผลสำเร็จ แม้ว่าจะใช้แคลลัสที่อายุประมาณ 1 เดือนซึ่งยังเป็นระยะที่แคลลัสกำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เป็นไปได้ว่าสูตรอาหารเหลวที่ทดลองใช้นั้นยังไม่เหมาะสมพอสำหรับการเจริญเติบโตของแคลลัส

3. การชักนำให้เกิดแคลลัสแขวนลอยในอาหารเหลว

จากผลการทดลองที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแขวนลอยจากเอนโดสเปอร์มของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมได้โดยตรงเมื่อใช้อาหารเหลวสูตร $N_6$2V ซึ่งมีปริมาณวิตามินและไกลซีนเป็นสองเท่าของสูตรอาหาร N_6 ตามปรกติ และมีโพรลีนเป็นองค์ประกอบร่วมกับ 2,4-D เป็นไปได้ว่าในธรรมชาติเซลล์จากเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มจะแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจากคัพภะร่วมกับการได้อาหาร คือน้ำตาล วิตามินและสารอินทรีย์อื่น ๆ ในปริมาณมาก มาจากลำต้นในขณะที่เมล็ดข้าวกำลังเติบโต ดังนั้นเมื่อได้รับวิตามินปริมาณสูงในสภาพที่ทดลองจึงแบ่งเซลล์ได้รวดเร็วเกิดเป็นแคลลัส นอกจากนี้สูตรอาหาร N_6 ยังต่างจากอาหารสูตร MS ที่ปริมาณแอมโมเนียมในอาหารสูตร N_6 จะต่ำ แต่มีไนเตรตสูง ขณะที่เซลล์พืชรับแอมโมเนียมเข้าสู่เซลล์จะมีโปรตอน (H^+) ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Marschner, 1991) ดังนั้นเมื่อเซลล์รับแอมโมเนียมจากอาหารจะมีผลทำให้มีการลดค่า pH ในอาหาร ยิ่งมีปริมาณแอมโมเนียมมากเช่นกรณีอาหารสูตร MS ก็ยิ่งจะทำให้ pH ของสารละลายลดลงมาก ดังที่ Holme (1998) พบว่าอาหารสูตร MS มีค่า pH ลดลงอย่างมากหลังถ่ายเปลี่ยนอาหาร ในขณะที่ค่า pH ของอาหารสูตร N_6 ไม่เปลี่ยนมากนักเพราะมีแอมโมเนียมน้อย และเมื่อเซลล์ใช้แอมโมเนียมหมดไป จะยังใช้ไนเตรตและโพรลีนได้ และเนื่องจากโพรลีนเป็นกรดอะมิโน จึงช่วยรักษาระดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไม่ให้เป็นกรดมากเกินไป หน้าที่อีกประการหนึ่งของโพรลีนคือ การช่วยรักษาแรงดันออสโมซิส (osmoregulation) ของสารละลาย เซลล์จึงเจริญเติบโตได้ดี แต่ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของโพรลีนไม่สูงนัก (0.02 M) การรักษาแรงดันออสโมซิสจึงไม่น่าจะเป็นปัจจัยหลัก ดังนั้นโพรลีนน่าจะเป็นแหล่งสะสมของไนโตรเจนแก่เซลล์และทำหน้าที่ช่วยรักษาสมดุลย์ของ pH ในสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย

ธรรมชาติของเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มของข้าวจะประกอบด้วยเซลล์สองประเภทคือ starchy endosperm ซึ่งเป็นเซลล์ผนังบางมีเม็ดแป้งบรรจุอยู่เต็มและมี aleurone layer เป็นเซลล์ที่เรียงรายรอบนอก ซึ่งอาจมีเซลล์หลายชั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่งในเมล็ด (De Datta, 1981) จากลักษณะของแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมที่มีการขยายขนาดออกทางด้านข้างโดยรอบจนมีรูปร่างเป็นแผ่นโค้งจนขอบนอกมาชนกัน ซึ่งเข้าลักษณะดังกล่าว จึงเป็นไปได้ว่าแคลลัสแขวนลอยที่ได้อาจพัฒนามาจากเซลล์ชั้นนอก ๆ ของเนื้อเยื่อเอนโดสเปอร์มที่ยังไม่ได้เปลี่ยนสภาพ (differentiated) หรือพัฒนาเป็นเซลล์ชนิด starchy endosperm

4. การเจริญเติบโตของแคลลัสและผลของระดับฮอร์โมนต่อการเติบโตของแคลลัส

เนื่องจากช่วงเวลาที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแขวนลอยของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมจนถึงเวลาที่เขียนรายงานนี้เป็นช่วงเวลาที่สั้นมาก จึงได้ศึกษาการเจริญเติบโตโดยดูการเพิ่มน้ำหนักสดในอาหารเหลว ตลอดจนการทดสอบผลของระดับฮอร์โมนและอัตราการเขย่าขวดต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสก็ทำได้อย่างคร่าว ๆ เท่านั้น ยังต้องมีการศึกษาและทดลองเพิ่มเติมอีกหลายด้าน เช่น ศึกษาการเพิ่มปริมาณโดยคิดจากน้ำหนักแห้งซึ่งจะได้ผลที่แน่นอนกว่าการใช้น้ำหนักสด นอกจากนี้ควรจะศึกษาผลของระดับฮอร์โมนและอัตราการเขย่าต่อการเจริญเติบโตให้เป็นระบบและรวมถึงการพัฒนาให้เป็นแคลลัสชนิดเซลล์เดี่ยวด้วย ซึ่งผลจากการใช้ Macerozyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase ผสมลงในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของเอนโดสเปอร์มช่วยป้องกันไม่ให้เกิดแคลลัสก้อนใหญ่ได้บ้าง แต่ยังไม่สามารถทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวได้ ส่วนการเติมเอนไซม์กลุ่ม cellulase ทำให้แคลลัสเป็นสีคล้ำเนื่องจากเซลล์อาจจะตายเพราะผนังเซลล์ถูกทำลาย

5. การศึกษาการทำงาน (activity) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้ง

เนื่องจากมีข้อจำกัดทางเวลา การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งในขั้นนี้กระทำได้เพียงการตรวจสอบว่าน้ำสกัดหยาบจากแคลลัสแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้สามารถสังเคราะห์แป้งโดยดูจากอัตราการย้ายหมู่กลูโคสจาก ADP-glucose ไปต่อที่โมเลกุลแป้งที่เป็น primer ผลการวัดได้อัตราการย้ายหมู่กลูโคสที่ต่ำกว่าผลการทดลองของ Ghosh และ Preiss (1965)เล็กน้อย เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้น้ำสกัดหยาบมาทดสอบ

และไม่ได้หมุนเหวี่ยงขจัดองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ออกก่อนการศึกษาการทำงานของเอนไซม์

บทสรุป

จากการทดลองเป็นเวลาหลายปี พอจะสรุปได้ว่าในการนำเมล็ดข้าวอ่อนมาใช้เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอนโดสเปอร์มจำเป็นต้องใช้เวลาและวิธีการพิเศษในการขจัดเชื้อราจากเมล็ดข้าว คือระหว่างการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว จะต้องดูดอากาศออกพร้อมกันไป เพื่อให้ความเป็นสุญญากาศดึงสปอร์ (spore) ของราที่ตกค้างอยู่ภายในเปลือกออกมาภายนอก

การทดลองใช้อาหารวุ้นสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % ผสมกับ 2,4-D 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบร่วนจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวอ่อนข้าวไร่ พันธุ์ดอกพะยอม กู้เมืองหลวง และซิวแม่จัน และข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และพัทลุง 60 แต่ยังไม่สามารถนำแคลลัสเหล่านี้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในลักษณะแขวนลอยต่อไปโดยใช้สูตรอาหารมาตรฐาน MS, LS และ N_6 ที่ใช้กันแพร่หลาย

เมื่อปรับปรุงอาหารเหลวสูตร N_6 โดยการเพิ่มปริมาณวิตามินเป็นสองเท่าของสูตรปกติ ($N_6$2V) ร่วมกับการเสริมกรดอะมิโนโพรลีนเข้มข้น 0.02 M น้ำตาลซูโครส 4 % และมี 2,4-D 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแขวนลอยจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดอ่อนข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอม แคลลัสแขวนลอยที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นมีการเจริญเติบโตทางด้านข้างจนโค้งงอมาชนกันเหมือนเป็นก้อน การผสม Macerozyme ที่ระดับ 0.1 % ช่วยป้องกันการเพิ่มขนาดของแคลลัสได้ระดับหนึ่ง แต่ไม่ได้ช่วยให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวตามอุดมคติของการเพาะเลี้ยงแคลลัสแบบแขวนลอย

แคลลัสแขวนลอยจากเอนโดสเปอร์มของเมล็ดอ่อนข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมสามารถเพิ่มน้ำหนักสดได้ประมาณ 60 % ในเวลา 15 วัน และสามารถใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ เพื่อศึกษาการสังเคราะห์แป้ง ซึ่งในการทดลองนี้สามารถวัดการทำงานของ starch synthase ได้จากน้ำสกัดหยาบของแคลลัส โดยติดตามอัตราการย้ายกลูโคสที่ติดฉลากด้วย ^{14}C จาก ADP-glucose ไปต่อที่โมเลกุลของ primer ที่เป็นแป้งได้ในอัตรา 1.28 นาโนโมล/นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

งานวิจัยโครงการนี้ใช้เวลานานมากเนื่องจากมีปัญหาหลายประการซึ่งทำให้งานล่าช้ากว่ากำหนด ดังนี้

1. ตามที่ได้กล่าวไว้ในส่วนของผลการทดลองคือ ปัญหาการขจัดเชื้อราออกจากเมล็ดข้าว และอุปสรรคในการหาสูตรอาหารให้เหมาะกับการย้ายแคลลัสจากอาหารวุ้นไปเพาะเลี้ยงในรูปแขวนลอย

2. ปัญหาการขาดแคลนห้องเพาะเลี้ยงที่จะบรรจุเครื่องเขย่าขนาดใหญ่สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งต้องย้ายสถานที่ทดลองถึง 3 ครั้ง แต่ละครั้งเสียเวลาไม่ต่ำกว่า 3 เดือน เมื่อการทดลองต้องหยุดชะงักลง จึงเกิดปัญหาในการปลูกต้นข้าวให้ออกดอก เพราะพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ไวต่อช่วงแสง ถ้าปลูกผิดฤดูจะไม่ออกดอก ต้องรอให้ช่วงแสงเหมาะสมจึงจะออกดอกและเก็บเมล็ดอ่อนมาทดลองได้

3. ในบางช่วงผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการทดลองได้เนื่องจากติดงานสอน และในปี 2540 ผู้วิจัยป่วย

งานที่ยังไม่ได้ทำตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย ซึ่งผู้วิจัยจะดำเนินการวิจัยต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลชัดเจน ได้แก่

1. การสกัดและศึกษาการทำงานของเอนไซม์ starch synthase จากแคลลัสในรูปที่บริสุทธิ์กว่านี้

2. การสกัดและศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase จากแคลลัส

3. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase, starch synthase และ fructose 1,6-bisphosphatase

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา สุดทะสาร (2541) การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและโปรโตพลาสต์ของข้าว. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ระรื่น บุญดวง และสมพล อุชชิน (2533) เอกสารแนะนำข้าวและธัญพืชเมืองหนาว พันธุ์ดี 59 พันธุ์ สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Asaoka, M., Okano, K. and Fuwa, H. (1985) Genetic and environmental control of starch properties in rice seeds. *In* R.D. Hill and L. Munck, eds, New approaches to research on cereal carbohydrates. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 29-38.

Basu, S., Gangopadhyay, G., Mukherjee, B.B. and Gupta, S. (1997) Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50 : 153-159.

Chen, B.-Y. and Janes, H.W. (1997) Multiple forms of ADP-glucose pyrophosphorylase from tomato fruit. Plant Physiol. 113: 235-241.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu,C., Yin, K.C., Chu, C.Y. and Bi, F.Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. Sci. Sinica 18 : 659-668.

Crawford, N.M., Smith, M., Bellissimo, D. and Davis, R.W. (1988) Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thalina* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains.
Proc. Natl. Acad. Sci. 85 : 5006-5010.

De Datta, S.K. (1981) Principles and practices of rice production, Wiley & Sons, New York p.147-148.

Ghosh, H.P. and Preiss, J. (1965) Biosynthesis of starch in spinach chloroplasts. Biochemistry 4 : 1354-1361.

Hall, R.D. (1992) The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. In "Plant tissue culture manual" A3 : 1-21. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Hawker, J.S. (1982) Effect of temperature on lipid, starch and enzymes of starch metabolism in grape, tomato and broad bean leaves. Phytochemistry 21 : 33-36.

Holme, I.B. (1998) Growth characteristics and nutrient depletion of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus' suspension cultures. Plant cell Tiss. Org. Cult. 53 : 143-151.

Holme, I.B., Krogstrup, P. and Hansen, J. (1997) Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus* x *ogiformis* Honda 'Giganteus' as affected by proline. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50 : 203-210.

Jennings, P.R., Coffman, W.R. and Kauffman, H.E. (1979) Rice Improvement. International Rice Research Institute, Los Banos. pp. 105-111.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18 : 100-127.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93 : 265-275.

Marschner, H. (1991) Root-induced changes in the availability of micronutrient in the rhizosphere. *In* Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi, eds., The plant roots, the hidden half. Marcel Dekker, New York. pp.503-528.

Martin, C. and Smith, A.M. (1995) Starch biosynthesis. Plant Cell 7 : 971-985.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497

Nakano, H., Tashiro, T. and Maeda, E. (1975) Plant Differentiation in callus tissue induced from immature endosperm of Oryza sativa L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 76. S. : 444 - 449.

Preiss, J., MacDonald, F.D. Singh, B.K. Robinson, N. and McNamara, K. (1985) Various aspects in the regulation of starch biosynthesis. *In* R.D. Hill and L. Munck, eds, New approaches to research on cereal carbohydrates. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 1-17.

Smith, M.M. and Stone, B.A. (1973a) Studies on *Lolium multiflorum* endosperm in tissue culture. Aust. J. biol. Sci. 26 : 123-133.

Smith, M.M. and Stone, B.A. (1973b) β-Glucan synthesis by cell-free extracts from *Lolium multiflorum* endosperm. Biochim. Biophys. Acta 313 : 72-94.

Wenjing, T., Bao, L, and Miao, X. (1997) Establishing japonica rice suspensions retaining a high regeneration potential after 14 months of culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47 : 213-216.

ภาคผนวก

องค์ประกอบของ Callus Induction and Cell Culture Media (ไม่รวมฮอร์โมน)

Nutrients	ความเข้มข้น (มก/ลิตร)			
ชื่อสูตรอาหาร	N_6	MS	LS	Modified White's
KNO_3	2,830	1,900	1,900	80
NH_4NO_3	-	1,650	1,650	-
$(NH_4)_2SO_4$	463	-	-	200 (Na_2SO_4)
KH_2PO_4	400	170	170	1810 (NaH_2PO_4)
$MgSO_4.7H_2O$	185	370	370	730
$CaCl_2.2H_2O$	166	440	440	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	-	-	290
Na_2-EDTA	37	37	37	-
$FeSO_4.7H_2O$	28	28	28	12 (Ferric citrate)
$MnSO_4.H_2O$	3.3	16.9	16.9	3
$ZnSO_4.7H_2O$	1.5	8.6	8.6	0.5
H_3BO_3	1.6	6.2	6.2	0.5
KI	0.8	0.8	0.8	70 (KCl)
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	0.25	0.25	-
$CuSO_4.5H_2O$	-	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	-	0.025	0.025	0.026
Organic Constituents				
Myoinositol	100	100	100	-
Glycine	2	2	-	-
Proline (liquid culture)	2,[illegible]	-	-	-
Yeast Extract		-	4,000	5,000
Typtophan (เฉพาะอาหารวุ้น)	-	50	-	-
Vitamins				
Nicotinic Acid	0.5	0.5	-	0.0012
Thiamin.HCl	0.1	0.1	0.4	0.24
Pyridoxine.HCl	0.5	0.5	-	0.25
Calcium pantothenate		-	-	0.25
Sucrose	3,000	3,000	3,000	4,000
Gelrite or Phytogel (สำหรับอาหารวุ้น)	1,500	1,500	1,500	1,500
pH (ปรับก่อนเติมวุ้นและการนึ่งฆ่าเชื้อ)	5.7	5.8	5.8	5.5