บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมคัพภะที่ใช้เป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

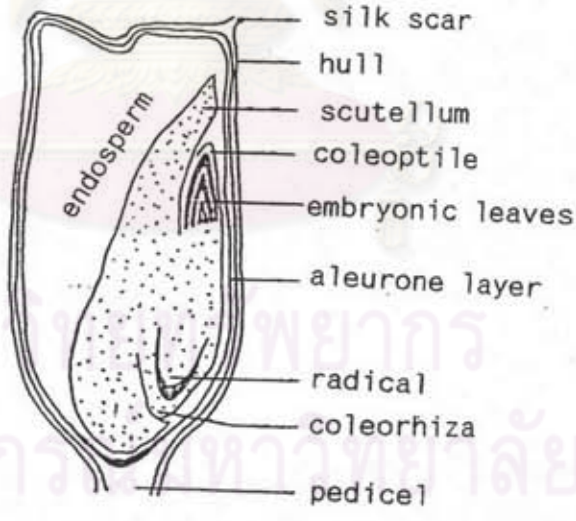
3.1.1 การเตรียมคัพภะอ่อนจากฝักอ่อน

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ พันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิด, KTX 3101 เป็นพันธุ์ลูกผสม 3 ทาง, พันธุ์ KSX 2301 เป็นพันธุ์ลูกผสม 2 ทาง และพันธุ์ Ki7 เป็นพันธุ์ผสมตัวเอง ข้าวโพดจะเริ่มผสมพันธุ์เมื่อซ่อตอกตัวเมียเจริญจนมีไหมออกมา หลังจากข้าวโพดผสมได้ประมาณ 13-17 วัน จึงทำการเก็บฝักจากแปลงเพื่อนำมาแยกคัพภะอ่อน ในกรณีที่ไม่ได้ใช้ทันทีสามารถเก็บฝักไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ได้เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ใน 1 ฝัก จะมีเมล็ดอยู่ประมาณ 500 เมล็ด การแยกคัพภะโดยการเฉือนส่วนบนของเมล็ดที่ติดกับฝัก แล้วใช้ spatula ควักเอาคัพภะออกมา จะสามารถแยกคัพภะได้อย่างรวดเร็ว และคัพภะจะไม่ค่อยได้รับความกระทบกระเทือน คัพภะขนาด 0.5 มม. ขึ้นไป จะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ลักษณะของคัพภะอ่อนจะรูปร่างแบนคล้ายรูปหัวใจ ด้าน 2 ด้านของคัพภะจะแตกต่างกัน ด้านที่แบนเรียบจะเป็นด้าน embryonic axis ส่วนอีกด้านหนึ่งจะโค้งนูนซึ่งเป็นส่วนของ scutellum (รูปที่ 3.1) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนจึงสามารถกระทำได้ทั้ง 2 ด้าน คือ วางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหาร หรือวางด้าน scutellum ให้สัมผัสกับอาหารก็ได้ ในหนึ่งฝักของข้าวโพดขนาดของคัพภะจะไม่เท่ากัน เมล็ดที่อยู่ตรงกลางของฝักจะได้รับการผสมก่อน จึงมักมีขนาดของคัพภะใหญ่กว่าคัพภะที่อยู่ส่วนปลายและส่วนโคน ดังนั้นในการใช้คัพภะอ่อนเป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำเป็นต้องมีการศึกษาคัดเลือกขนาดของคัพภะที่เหมาะสมต่อการใช้ในการทดลองด้วย

3.1.2 การเตรียมคัพภะแก่จากเมล็ดพันธุ์

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง คือ พันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 ลักษณะภายนอกของเมล็ดจะมีสีเหลืองค่อนข้างแบนและมีเหลี่ยมมุม (รูปที่ 3.2) เมล็ดพันธุ์จะเก็บหลังจาก

รูปที่ 3.1 ลักษณะของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 (A) และ KTX 3101 (B)



รูปที่ 3.2 ภาพตัดขวางของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของเมล็ดพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คัพภะเจริญจนถึงระยะแก่ทางสรีรวิทยา ซึ่งหลังจากนี้เมล็ดจะไม่เจริญอีกแต่จะลดความชื้นของเมล็ดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากเมล็ดแก่จะแข็งมาก ดังนั้นในการแยกคัพภะออกจากเมล็ดจึงต้องนำไปแช่น้ำเพื่อให้เมล็ดอ่อนตัวลงเสียก่อน หลังจากแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชม. เมล็ดจะดูดน้ำเข้าไปทำให้อ่อนตัวลงสามารถแยกเอาคัพภะออกมาได้ง่าย ภายในเมล็ดถัดจากชั้นเปลือกจะประกอบด้วย pericarp หุ้ม endosperm และ คัพภะอยู่ (รูปที่ 3.3) คัพภะจะฝังตัวอยู่ทางด้านหนึ่งของ endosperm ปลายด้านหนึ่งของคัพภะจะเป็น radical และอีกด้านหนึ่งเป็นส่วนของ stem tip ที่มี coleoptile หุ้มอยู่ ด้านข้างของแกนกลางที่สัมผัสกับ endosperm จะเป็น scutellum

3.2 การศึกษาลักษณะการวางของคัพภะอ่อนต่อการเกิดแคลลัส

คัพภะของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.6.2 เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร N_6 ซึ่งเสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. โดยส่วนหนึ่งวางด้าน scutellar node ให้สัมผัสกับอาหาร และอีกส่วนหนึ่งวางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหาร ผลการศึกษาพบว่า คัพภะที่วางด้าน embryonic axis สัมผัสกับอาหารจะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าเมื่อวางโดยให้ด้าน scutellar node สัมผัสกับอาหาร ถึง 7 เท่า (ตารางที่ 1.1)

ลักษณะการเกิดแคลลัสในกรณีที่วางแบบแรกคือให้ด้าน embryonic axis สัมผัสกับอาหาร จะเริ่มจากการพองตัวของ scutellum หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ขณะเดียวกันอาจจะมีการเจริญของยอดและรากยืดออกมาจากส่วนที่สัมผัสกับอาหาร หรืออาจจะไม่เกิดขึ้นก็ได้ ภายใน 2 สัปดาห์ จะเริ่มสังเกตเห็นแคลลัสซึ่งเจริญจากส่วนของ scutellum แคลลัสจะมีสีขาวอมเหลืองเกาะตัวกันหลวม ๆ ชุ่มน้ำ (รูปที่ 3.4) หลังจาก 30 วัน แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. ในคัพภะที่ไม่เกิดแคลลัส พบว่า มีพัฒนาการของยอดและรากจากด้าน embryonic axis โดยที่ส่วนของ scutellum จะมีลักษณะแข็งขยายตัวออกเล็กน้อย แต่ไม่มีการเจริญเป็นกลุ่มเซลล์แคลลัส

เมื่อวางคัพภะให้ด้าน scutellar node สัมผัสกับอาหาร พบว่าจะมีการพัฒนาของแคลลัสจากด้านของ embryonic axis แต่จะไม่พบแคลลัสจากส่วนของ scutellum ส่วนคัพภะที่ไม่มีการพัฒนาของแคลลัสจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วของยอด และรากจากส่วนของ plumule และ radical ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อวางด้าน embryonic axis และ scutellar node สัมผัสกับอาหาร

Attachment	No. embryos	No. callus	% Callusing
Scutellum	40	5	12
Embryo axis	40	34	83

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A B

รูปที่ 3.3 ลักษณะภายนอกของคัพภะอ่อนซึ่งประกอบไปด้วยด้านที่เป็น embryonic axis (A) และ scutellar node region (B)

รูปที่ 3.4 ลักษณะแคลลัสจากส่วน scutellum ของคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., และ casein hydrolysate 200 มก./ล. อายุ 3 สัปดาห์

3.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้น

3.3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่

เมื่อนำคัพภะแก่ของสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 มาแบ่งครึ่งตามความยาวแล้ววางด้านที่ถูกตัดให้สัมผัสกับอาหาร อาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ได้แก่ อาหารสูตรพื้นฐาน N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{o}C ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ภายใน 1 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นคัพภะมีการขยายขนาดขึ้นและบางชิ้นมีการพัฒนาของอวัยวะ เช่น ยอดและใบ แต่จะไม่พบราก หลังจาก 2 สัปดาห์ จะมีการเจริญของแคลลัสเล็ก ๆ ทั้งจากส่วนของคัพภะเองและจากอวัยวะที่เจริญออกไปจากคัพภะ แคลลัสจะมีสีขาวออกน้ำตาล ชุ่มน้ำ เรียงตัวอย่างหลวม ๆ หลังจาก 4 สัปดาห์ แคลลัสจะมีขนาดประมาณ 0.5-0.8 มม. (รูปที่ 3.5) ลักษณะโดยทั่วไปของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะคล้ายคลึงกัน แต่เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 จะสูงกว่าในทุก ๆ สูตรอาหาร (ตารางที่ 3.2) อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. จะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงสุดในทั้ง 2 สายพันธุ์ สำหรับอาหารสูตรอื่นจะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสใกล้เคียงกัน คือ 80-83 เปอร์เซนต์ ในสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ 33-39 เปอร์เซนต์ในสายพันธุ์ KTX 3101 เมื่อแคลลัสมีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นต่อไป

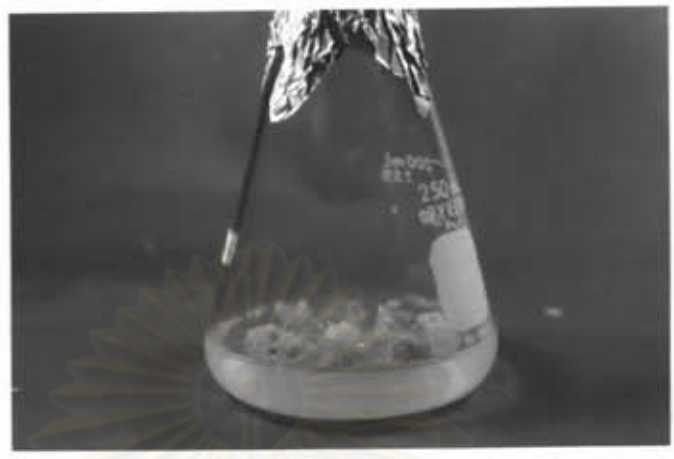
3.3.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน

เมื่อนำคัพภะอ่อนของสายพันธุ์ KTX 3101 , KSX 2301 , Ki7 และสุวรรณ 3 อายุประมาณ 13-15 วันหลังผสม ที่แยกได้จากการทดลอง 2.6.2 มาเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. โดยวางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหาร จะสังเกตพบว่าลักษณะการเกิดแคลลัสโดยทั่ว ๆ ไปจะเริ่มจากการขยายตัวของ scutellum ซึ่งสังเกตเห็นหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (รูปที่ 3.6) และภายใน 2 สัปดาห์ จะมองเห็นแคลลัสเกิดขึ้นจากผิวของ scutellum สำหรับด้าน embryonic axis ที่สัมผัสกับอาหารอาจมีการเจริญของยอดและรากออกมาจาก plumule และ radical ตามลำดับ หรือไม่มียอดและรากเจริญออกมาเลยก็ได้ จากการสังเกตพบว่าในคัพภะที่ไม่มีการเจริญของยอดและรากจะมีการพัฒนาของแคลลัสจากส่วนของ scutellum ได้ดี เมื่อแคลลัสมีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารใหม่ชนิดเดิม โดยตัดส่วนที่เป็นยอดและรากทิ้งไป ลักษณะ

ตารางที่ 3.2 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 5 สัปดาห์

Medium	SUWAN 3			KTX 3101		
	No. embryos	No. callus	Callusing (%)	No. embryos	No. callus	Callusing (%)
N_6P1	40	32	80	36	12	33
N_6P2	40	33	83	36	14	39
MSP1	40	37	88	36	16	44
MSP2	40	32	80	36	14	39

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.5 ลักษณะแคลลัสจากคัพภะแก่ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 3.6 ลักษณะแคลลัสจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. อายุ 1 สัปดาห์

ของแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถจำแนกออกเป็น 2 ชนิดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ชนิดแรกมีเนื้อหลวมชุ่มน้ำ สีขาวอมน้ำตาล (friable callus) (รูปที่ 3.7) อีกชนิดหนึ่งมีเนื้อแน่นสีขาวเหลือง (compact callus) (รูปที่ 3.8) แคลลัสที่เป็นชนิด compact จะมีการเจริญที่ดีกว่าชนิด friable ซึ่งสังเกตได้จากขนาดที่ใหญ่กว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาเท่ากัน (รูปที่ 3.9) แคลลัสของสายพันธุ์ KTX 3101 และ KSX 2301 เป็นชนิด friable ทั้งหมด ส่วนสายพันธุ์ Ki7 และสุวรรณ 3 จะพบแคลลัสทั้ง 2 ชนิด

เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นไปตามที่รวบรวมได้ (ตารางที่ 3.3 , 3.4) ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเกิดแคลลัสได้ดี สายพันธุ์ Ki7 จะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงสุด คือ 89-98 เปอร์เซนต์ ขณะที่สายพันธุ์ KTX 3101 จะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสต่ำสุด คือ 60-75 เปอร์เซนต์ อาหารสูตร N_6 จะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าสูตร MS ในสายพันธุ์ KSX 2301, KTX 3101 และ Ki7 แต่จะให้ผลตรงกันข้ามในสายพันธุ์สุวรรณ 3 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกันในทั้ง 2 สูตรอาหาร (N_6 และ MS) และทุกสายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของคัพภะแก่และคัพภะอ่อน(ตารางที่ 3.5) คัพภะอ่อนจะให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าในสายพันธุ์ KSX 2301 แต่ในสายพันธุ์สุวรรณ 3 จะให้แคลลัสใกล้เคียงกัน หลังจากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนมีอายุประมาณ 5 สัปดาห์ จึงทำการย้ายแคลลัสลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น

3.3.3 การหวนกลับเป็นต้น (plant regeneration) จากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อน

เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อนที่ได้จากการทดลองที่ 2.8.1 และ 2.8.2 เลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น และให้แสง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงและคิด % plant regeneration พบว่า แคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ของทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ KTX 3101 และสุวรรณ 3 ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสทุกสูตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และบางแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นรากอย่างเดียวเท่านั้น (รูปที่ 3.10)

แคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่มียอด และรากสมบูรณ์ได้ในบางสายพันธุ์ (ตารางที่ 3.6) จะเห็นได้ว่า แคลลัสที่ชักนำจากสายพันธุ์ KTX 3101 และ KSX 2301 ซึ่งเป็นชนิด friable ทั้งหมด เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่าไม่มี

ตารางที่ 3.3 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ KSX 2301 และ KTX 3101 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Medium	KSX 2301			KTX 3101		
	No. embryos	No. callus	Callusing (%)	No. embryos	No. callus	Callusing (%)
N_6P1	38	30	79	40	30	75
N_6P2	40	32	80	40	30	75
MSP1	40	25	63	40	24	60
MSP2	38	25	66	40	24	60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ Ki7 และ สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Medium	Ki 7			SUWAN 3		
	No. embryos	No. callus	Callusing (%)	No. embryos	No. callus	Callusing (%)
N_6P1	50	49	98	60	52	87
N_6P2	46	44	96	60	50	83
MSP1	50	45	90	60	53	88
MSP2	44	39	89	60	51	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Medium	Callus induction frequency (%)			
	KTX 3101		SUWAN 3	
	Mature embryo	Immature embryo	Mature embryo	Immature embryo
N_6P1	33	75	80	87
N_6P2	39	75	83	83
MSP1	44	60	88	88
MSP2	39	60	80	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

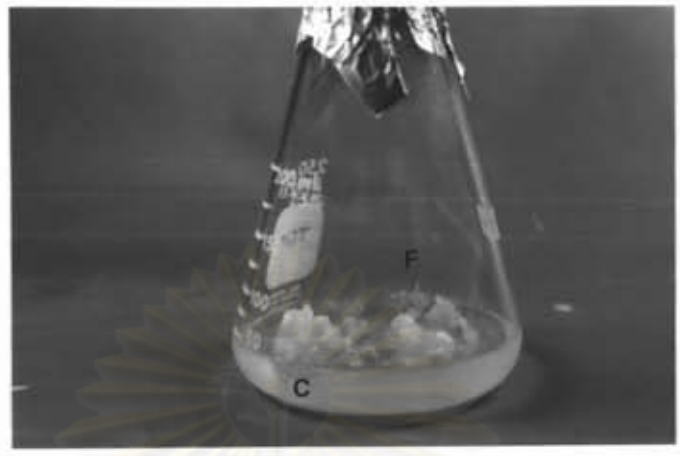
ตารางที่ 3.6 แสดง % plant regeneration ของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ KSX 2301, KTX 3101, Ki7 และ สุวรรณ 3 ที่ชักนำด้วยอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล.

Medium	% Plant regeneration			
	KSX 2301	KTX 3101	Ki 7	Suwan 3
N_6P1	0	0	0	7.7
N_6P2	0	0	0	10.0
MSP1	0	0	4.4	20.7
MSP2	0	0	0	13.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.7 ลักษณะแคลลัสชนิด friable ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. เพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

รูปที่ 3.8 ลักษณะแคลลัสชนิด compact ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. เพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์



รูปที่ 3.9 แคลลัสชนิด compact (C) และ friable (F) ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.,L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. อายุ 6 สัปดาห์

รูปที่ 3.10 ลักษณะการเกิดรากของแคลลัสชนิด friable ที่ชักนำจากคัพภะแก่ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาของยอดเกิดขึ้นเลยในทุกสูตรอาหาร แต่มีการพัฒนาไปเป็นรากในบางแคลลัส และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปก็ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้เลย สายพันธุ์ Ki7 สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล เท่านั้น คิดเป็น % plant regeneration เพียง 4 เปอร์เซนต์ สำหรับสายพันธุ์สุวรรณ 3 สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของอาหารทุกสูตร โดยที่อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. จะให้ % plant regeneration สูงสุดเท่ากับ 21 เปอร์เซนต์ และ อาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. จะให้ % plant regeneration ต่ำสุดประมาณ 7.7 เปอร์เซนต์

จากการทดลองและติดตามลักษณะภายนอกเปรียบเทียบกับความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นพบว่า แคลลัสชนิด compact เท่านั้นที่พัฒนาไปเป็นต้นที่มียอดและรากสมบูรณ์ได้ โดยที่จะมีการพัฒนาของยอดก่อนแล้วรากจึงเจริญขึ้นในภายหลัง แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. จะมียอดเกิดขึ้นได้ 1-5 ยอด สำหรับแคลลัสชนิด friable ทั้งที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อนจะไม่พบการพัฒนาของยอดเกิดขึ้นเลย แต่จะมีการพัฒนาของรากในบางแคลลัสเท่านั้น

3.3.4 การจำแนกชนิดของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน

จากการทดลอง 3.3.3 พบว่า แคลลัสซึ่งชักนำจากคัพภะอ่อนสามารถจำแนกตามลักษณะภายนอกออกเป็นชนิด compact และ friable และจากข้อมูลของการทดลองเบื้องต้นชี้นำว่าแคลลัสชนิด compact เท่านั้นที่มีการพัฒนาไปเป็นต้นได้ การทดลองนี้เพื่อยืนยันถึงความสามารถหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสทั้ง 2 ชนิด หลังจากเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือน

แคลลัสชนิด friable ของสายพันธุ์ KSX 2301, KTX 3101, Ki7, สุวรรณ 3 และแคลลัสชนิด compact ของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเพาะเลี้ยง บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือน ยังคงมีลักษณะเฉพาะตัวเหมือนเดิมไม่เปลี่ยนแปลง โดยที่แคลลัสชนิด compact จะมีการเจริญที่รวดเร็วกว่าอย่างเห็นได้ชัด เมื่อย้ายแคลลัสทั้ง 2 ชนิด ลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นทั้งสูตรพื้นฐาน N_6 และ MS หลังจากสังเกตผลไปเป็นเวลานาน 30 วัน พบว่า แคลลัสชนิด friable ไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นเกิดขึ้นเลย แต่ในแคลลัสชนิด compact มีการพัฒนาไปเป็นต้นในอาหารชักนำให้เกิดต้นทั้ง 2 สูตร คิดเป็น % plant regeneration ใกล้เคียงกันประมาณ 90 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 3.7) ผลการทดลองนี้ แสดงว่าแคลลัสชนิด compact เป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัส

ตารางที่ 3.7 แสดง % plant regeneration ของแคลลัสชนิด compact และ friable ที่ชักนำจากอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล.

Callus type	Line	Medium	No.callus	No.callus with shoots	% Plant regeneration
Friable	SUWAN 3	NF	20	0	0
		MSF	20	0	0
	KSX 2301	NF	20	0	0
		MSF	20	0	0
	KTX 3101	NF	20	0	0
		MSF	20	0	0
	Ki 7	NF	20	0	0
		MSF	20	0	0
Compact	SUWAN 3	NF	40	38	90
		MSF	20	18	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ขณะที่แคลลัสชนิด friable เป็นนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัส ซึ่งไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ อาหารชักนำให้เกิดต้นทั้งสูตรพื้นฐาน N_6 และ MS มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้ดีใกล้เคียงกัน

3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

3.4.1 การศึกษาขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส

ทำการศึกษาผลกระทบของขนาดของคัพภะที่ใช้ต่อความสามารถในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 โดยแปรผันขนาดของคัพภะต่าง ๆ กัน ตั้งแต่เส้นผ่าศูนย์กลางตามยาวประมาณ 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 (คัพภะแก่) มม. เพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. หลังจาก 4 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส ได้ผลตามที่รวบรวมได้ (ตารางที่ 3.8) คัพภะอ่อนขนาดประมาณ 1.5 และ 2.0 มม. สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้ ขณะที่คัพภะขนาด 3.0 มม. ขึ้นไป จะไม่มีการพัฒนาของเอมบริโอเจนิกแคลลัสเลย คัพภะขนาด 1.5 มม. จะให้เปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงที่สุด ถึง 40 เปอร์เซนต์

เป็นที่น่าสังเกตว่าคัพภะอ่อนขนาด 1.5 มม. จะมีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มของแคลลัสชนิด compact โดยไม่พบการพัฒนาของยอดและรากเกิดร่วมด้วย ในขณะที่คัพภะอ่อนขนาด 2.0 มม. มีการเจริญไปเป็นยอด และราก พร้อมกันกับการเกิดแคลลัสจากส่วนของ scutellum คัพภะที่มีขนาดตั้งแต่ 3.0 มม. จะมีการเจริญของยอดและรากได้ดี โดยมีการพัฒนาของแคลลัสชนิด friable จาก scutellum จำนวนเล็กน้อย แต่ไม่พบแคลลัสชนิด compact เลย

3.4.2 การศึกษาชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส

ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญโดยแปรผันความเข้มข้น 2,4-D และ L-proline บนอาหารสูตรพื้นฐาน N_6 และ MS หลังจากเพาะเลี้ยงคัพภะในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ (ตารางที่ 3.9) จะเห็นได้ว่าอาหารสูตรพื้นฐาน MS จะให้เปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงกว่าสูตรพื้นฐาน N_6 ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมกับอาหาร

ตารางที่ 3.8 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อใช้คัพภะขนาดต่าง ๆ กัน บนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 5 สัปดาห์

Embryo size (mm)	No.embryos	No.compact callus	%Embryogenic callus
1.5	60	24	40
2.0	60	15	25
3.0	60	0	0
4.0*	60	0	0

* Mature embryo

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.9 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อใช้คัพภะขนาด 1.5 มม.

Medium	2,4-D conc. (mg/l)	No. embryos	Total callus	Compact callus	Callusing (%)	Embryogenic callus (%)
N_6N1	1	60	51	4	85	6.7
N_6P1	1	60	52	8	87	13.3
N_6P2	2	60	50	11	83	18.3
N_6P4	4	60	48	2	80	3.3
N_6S1	1	60	34	4	57	6.7
MSN1	1	60	25	23	80	38.3
MSP1	1	72	33	31	89	44.3
MSP2	2	60	36	15	85	25.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรพื้นฐาน N_6 คือ 1 มก./ล. (สูตร N_6P 1) ในขณะที่ 2,4-D ความเข้มข้น 4 มก./ล. (สูตร N_6P 4) จะยับยั้งการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส สำหรับอาหารสูตรพื้นฐาน MS ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมคือ 1 มก./ล. (สูตร MSP 1) การเติม L-proline 2.3 มก./ล. มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสในอาหารสูตรพื้นฐานทั้ง 2 ชนิด โดยจะมีอิทธิพลสูงในอาหารสูตร N_6 คือ ทำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงขึ้นถึง 2 เท่า เมื่อเทียบกับไม่เติม ในขณะที่อาหารสูตร MS เมื่อเติม L-proline เท่ากัน (สูตร MSP 1) จะมีผลกระทบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสขึ้นจากเดิม 3 เท่า (สูตร N_6S 1) พบว่ามีผลทำให้ปริมาณการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสลดลงประมาณ 2 เท่า จากการทดลองจะเห็นได้ว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 มากที่สุด คือ อาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. (สูตร MSP 1)

3.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

3.5.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ซึ่งเสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล ในสภาวะที่ให้แสง 4,000 ลักซ์ 16 ชม./วัน กับในที่มืด พบว่า อัตราการเจริญของแคลลัสในที่มืดจะสูงกว่าเมื่อให้แสง (ตารางที่ 3.10) ลักษณะของแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืดจะมีสีเหลืองอ่อน ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในที่มีแสงโดยทั่วไปจะมีสีเหลืองเข้มกว่า แต่จะสังเกตพบจุดเขียว บนกลุ่มแคลลัสที่มีแสง และแคลลัสบางตัวอย่างมีการสร้างรงควัตถุสีม่วงขึ้นบนผิวของแคลลัสได้ ในช่วงประมาณสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงอีกด้วย (รูปที่ 3.11)

3.5.2 การศึกษาการเจริญเปรียบเทียบของเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

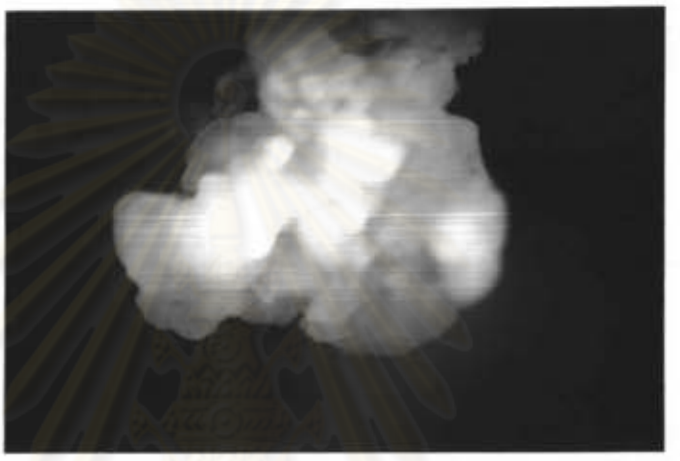
ทำการศึกษาอัตราการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส (ข้อ 2.9.2) ผลการทดลองพบว่า

ตารางที่ 3.10 แสดงการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงในที่มืดและในที่มีแสง บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.

Light intensity (lux)	Initial (mg)	Final (mg)	Final : Initial (FWT*)
0	50	264	5.28
4,000	42	201	4.78

FWT* ข้อมูลน้ำหนักสดเฉลี่ยจากการทดลอง 10 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.11 ลักษณะการเกิดจุดเขียว และ ม่วง ของเอมบริโอเจนิกแคลลัส บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 4,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แคลลัสโดยทั่วไปในอาหารทุกสูตรมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน ยกเว้นแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี ซูโครส 6 เปอร์เซนต์ จะมีลักษณะเนื้อแน่นกว่าในอาหารสูตรอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสในอาหารต่างชนิด (ตารางที่ 3.11) พบว่า อัตราการเจริญเมื่อคิดจากค่าอัตราส่วนน้ำหนักแคลลัสหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ต่อ น้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น (final : initial) ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสในอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล และ casein hydrolysate 200 มก./ล. จะให้ค่าการเจริญสูงสุด การเติม L-proline ร่วมกับ casein hydrolysate ลงไปในอาหารสูตร N_6 มีผลทำให้การเจริญของแคลลัสสูงขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่การเติมสารทั้ง 2 ชนิดลงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS จะเพิ่มการเจริญของแคลลัสได้น้อยกว่าในอาหารสูตรพื้นฐาน N_6 อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมควรจะเป็น 1 มก./ล. ถ้าความเข้มข้นสูงกว่านี้ จะไปลดการเจริญของแคลลัสลงได้

3.6 การศึกษาการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

3.6.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

เมื่อนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. มาศึกษาการเจริญ ผลการศึกษา (รูปที่ 3.12) พบว่าแคลลัสมีการเจริญที่ดี ใช้เวลาอยู่ในช่วง lag phase ประมาณ 1 สัปดาห์ เข้าสู่การเจริญระยะ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 หลังจากนั้นแคลลัสจะเริ่มมีสีเหลืองคล้ำออกน้ำตาลและจะเริ่มตายในที่สุด ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารใหม่จะอยู่ในช่วงประมาณสัปดาห์ที่ 3 ถึง 4

3.6.2 การศึกษาลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

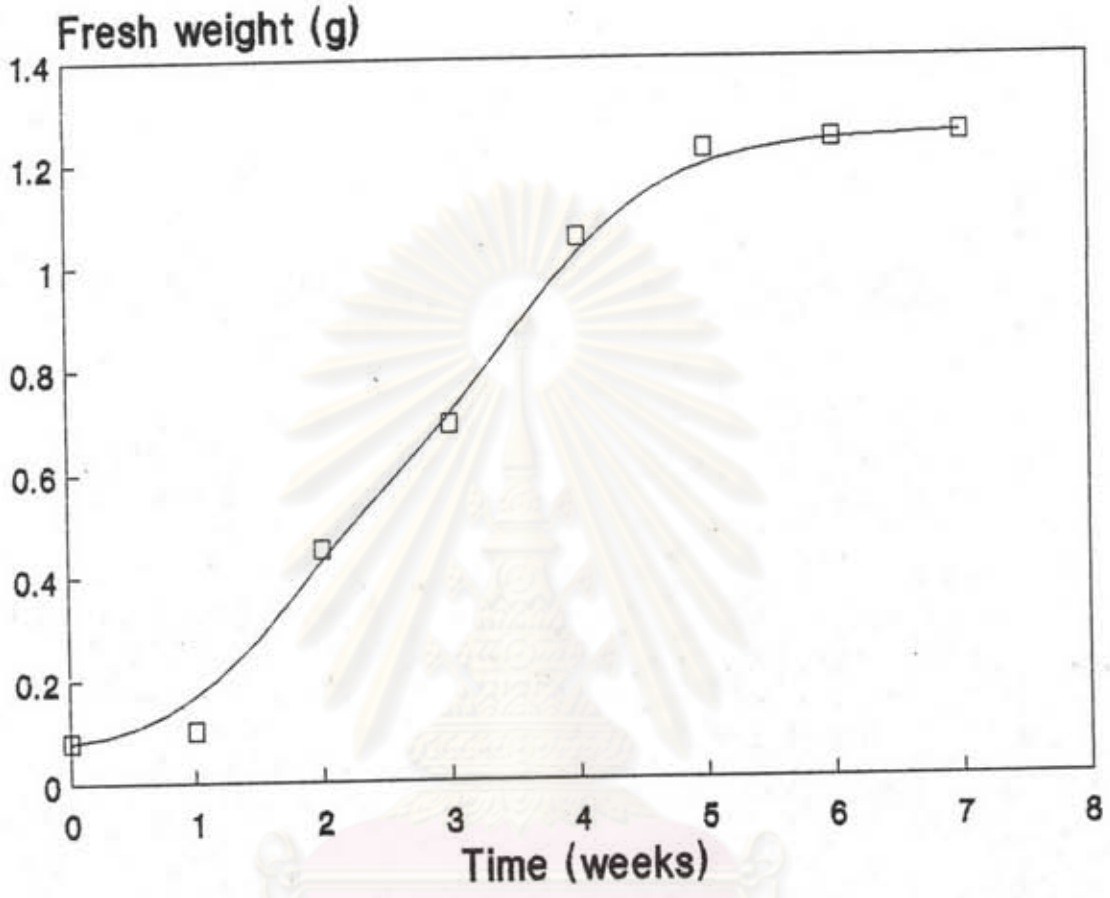
จากการศึกษาลักษณะพัฒนาการของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อย้ายแคลลัสจากอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 มก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. ลงสู่อาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร N_6

ตารางที่ 3.11 แสดงการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตรต่าง ๆ

Medium	2,4-D (mg/l)	Initial (mg)	Final (mg)	Final : Inintial (FWT*)
N_6N1	1	75	244	3.25
N_6P1	1	62	348	5.61
N_6P2	2	59	196	3.32
N6S1	1	70	343	4.90
MSN1	1	63	249	3.95
MSP1	1	58	236	4.06
MSP2	2	64	219	3.4

FWT* ข้อมูลน้ำหนักสดเฉลี่ยจากการทดลอง 10 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์ จะสังเกตเห็นการพัฒนาของจุดเขียวและอาจมีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ (รูปที่ 3.13) เมื่อศึกษาลักษณะของแคลลัสจากกล้อง stereoscope จะสังเกตพบผิวของแคลลัสซึ่งขรุขระ ประกอบไปด้วย somatic embryo มากมาย (รูปที่ 3.14) somatic embryo เหล่านี้สามารถที่จะพัฒนาต่อไปเป็นส่วนที่มีลักษณะคล้ายใบ (รูปที่ 3.15) ซึ่งจะเจริญเป็นใบ และ ยอดที่สมบูรณ์ได้ (รูปที่ 3.16) ขั้นตอนต่าง ๆ เหล่านี้จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ในอาหารชักนำให้เกิดต้น ต้นข้าวโพดจะมีการพัฒนาลักษณะของยอดและรากสมบูรณ์เหมือนต้นปกติทั่วไปที่เกิดจากเมล็ด แต่อาจจะยังมีระบบรากยังไม่แข็งแรงนัก คือ ยังมีแขนงของรากน้อยอยู่ (รูปที่ 3.17) เมื่อต้นข้าวโพดอายุ 6 สัปดาห์ จะมีลักษณะของลำต้นและรากแข็งแรงพร้อมที่จะย้ายออกสู่สภาวะภายนอกได้ (รูปที่ 3.18) ลักษณะของต้นข้าวโพดจะมีการเชื่อมต่อกันของระบบรากและลำต้นอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 3.19) ต้นข้าวโพดที่ได้จากการชักนำให้เกิดจากแคลลัสนี้สามารถย้ายลงปลูกใน vermiculite ครอบด้วยถุงพลาสติกใส เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ รดด้วยสารละลายของอาหารสูตร MS ความเข้มข้น 1/4 เท่า ทุก ๆ 2-3 วัน (รูปที่ 3.20)

3.7 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

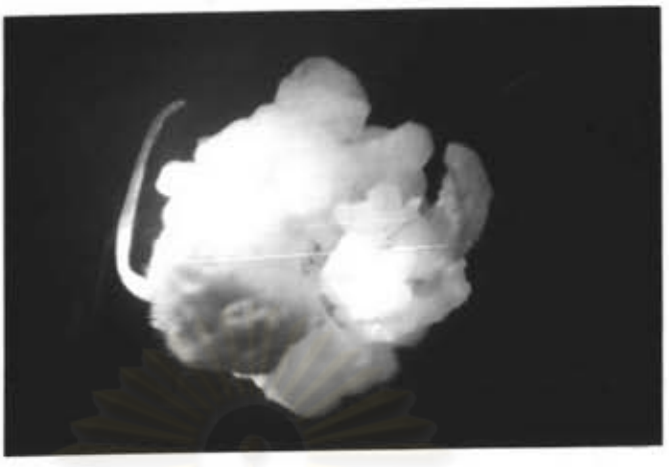
3.7.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น

เมื่อนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. มาศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น โดยแปรผันความเข้มแสงต่าง ๆ กัน พบว่า ความเข้มแสงมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสเป็นอย่างมาก (ตารางที่ 3.12) แคลลัสจะมี % plant regeneration สูงสุดถึง 85 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเข้มแสงเท่ากับ 4,000 ลักซ์ และ ลดลงเหลือเพียง 60 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ นอกจากนี้ยังพบว่าต้นข้าวโพดที่พัฒนาจากแคลลัสที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ จะมีการพัฒนาของต้นช้ากว่า คือ จะมีขนาดของต้นเล็กกว่าเมื่อใช้ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเท่ากัน (รูปที่ 3.21) แคลลัสบนอาหารชักนำให้เกิดต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด

ตารางที่ 3.12 เปรียบเทียบ % plant regeneration ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่ความเข้มแสง 0, 2,000 และ 4,000 ลักซ์ บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน

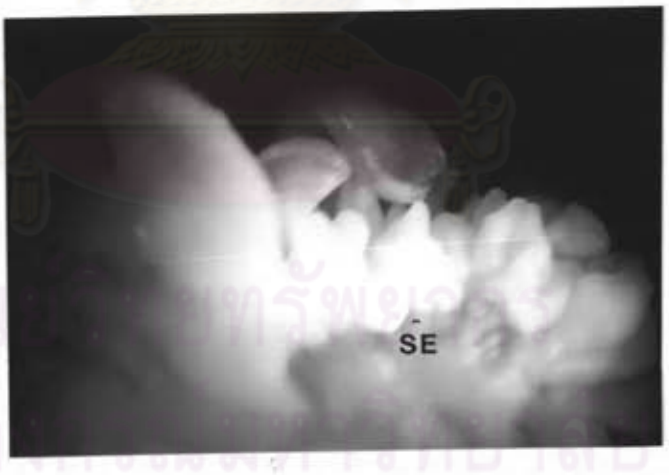
Light intensity (lux)	No.callus	No.callus with shoots	% Plant regeneration
0	21	7	33.3
2,000	21	13	62.0
4,000	20	17	85.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

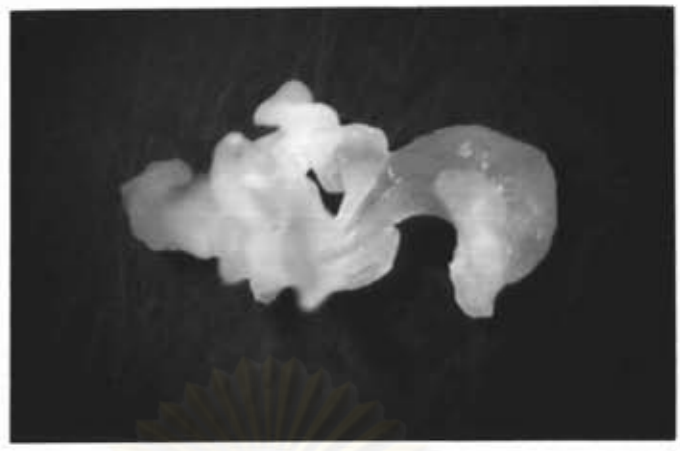


หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.13 ลักษณะการพัฒนาของจุดเขียว และ ราก จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์



รูปที่ 3.14 ลักษณะของ somatic embryo (SE) ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์



3.15

3.16

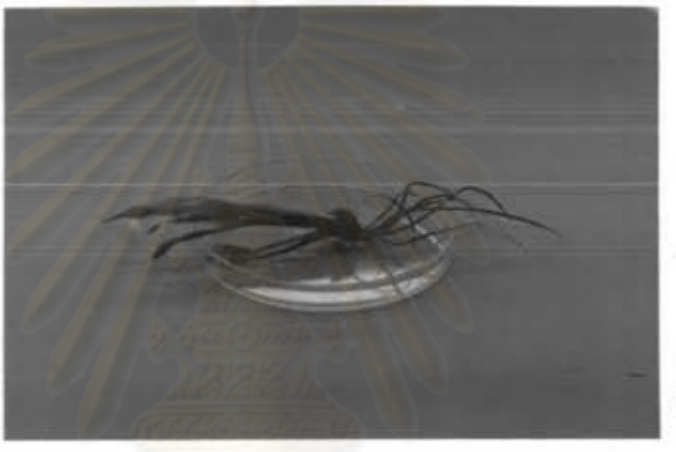
3.17

รูปที่ 3.15 ลักษณะของโครงสร้างคล้ายใบ ที่พัฒนาจาก somatic embryo ในอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์

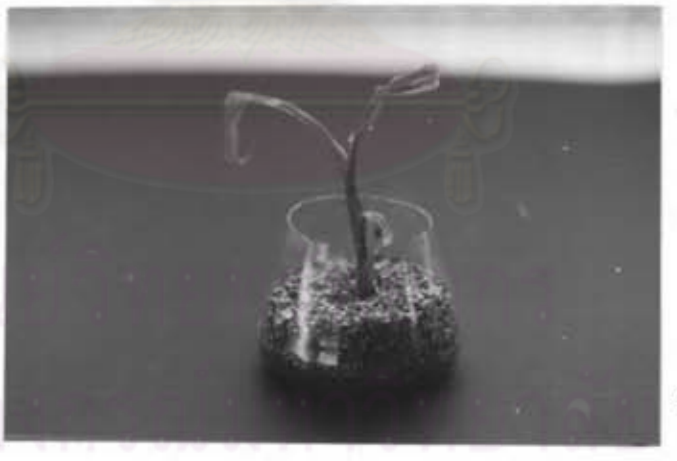
รูปที่ 3.16 ลักษณะของยอดที่พัฒนาจาก somatic embryo เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

รูปที่ 3.17 ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัส บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน อายุ 4 สัปดาห์

3.18



3.19



3.20

รูปที่ 3.18 ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัส บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน อายุ 6 สัปดาห์

รูปที่ 3.19 แสดงการเชื่อมต่อของราก และลำต้นอย่างสมบูรณ์ ของต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน

รูปที่ 3.20 การเพาะเลี้ยงต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัส ในภาชนะที่บรรจุ vermiculite

รูปที่ 3.21 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัส บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน เมื่อให้แสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ (A) และ 4,000 ลักซ์ (B) อายุ 4 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะมีการพัฒนาของแคลลัสเป็นอวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น ใบ (รูปที่ 3.22) แต่จะไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์จนกว่าจะนำมาให้รับแสงในสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

3.7.2 การศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด

ทำการศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของแคลลัสต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด โดยการแปรผันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสต่าง ๆ กัน 3 ขนาด คือ 0.25, 0.5 และ 1.0 ซม. เลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น และให้แสง ผลการศึกษาพบว่า ขนาดของแคลลัสที่ใช้มีผลต่อ % plant regeneration และจำนวนยอด (ตารางที่ 3.13) แคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 ซม. จะมี % plant regeneration ต่ำที่สุด เมื่อเพิ่มขนาดของแคลลัสมีผลทำให้การหวนกลับเป็นต้นสูงขึ้น และเมื่อแคลลัสมีขนาดตั้งแต่ 0.5 ซม. ขึ้นไป % plant regeneration จะคงที่ ผลการทดลองแสดงให้เห็นอีกว่าจำนวนยอดต่อแคลลัสจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของแคลลัสใหญ่ขึ้นด้วย แคลลัสที่มีขนาด 1 ซม. จะมีจำนวนยอดต่อแคลลัสสูงที่สุด (3 ยอดต่อแคลลัส) แต่เมื่อคิดเป็นจำนวนยอดต่อกรัมน้ำหนักสดของแคลลัสที่ใช้แล้ว แคลลัสที่มีขนาด 0.5 ซม. จะมีค่าสูงที่สุดประมาณ 17 ยอดต่อกรัมน้ำหนักสด ในขณะที่แคลลัสขนาด 1.0 ซม. จะให้ค่ายอดต่อกรัมน้ำหนักสด มีจำนวนเพียง 9 ยอดต่อกรัมเท่านั้น

3.8 การศึกษาความเสถียรของประสิทธิภาพการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

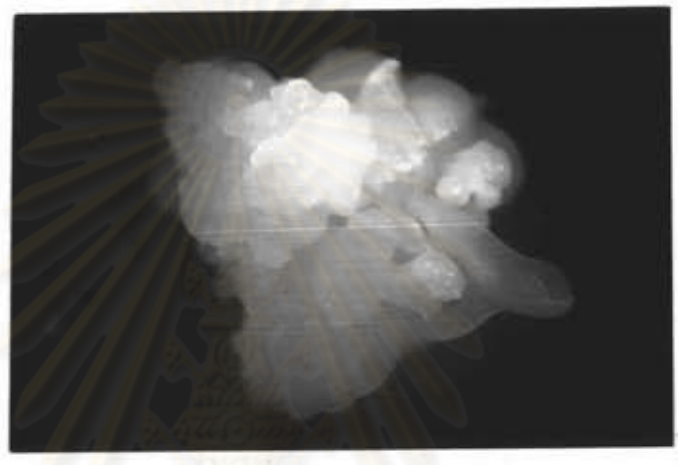
3.8.1 การศึกษาอิทธิพลของอายุของเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการหวนกลับเป็นต้น

จากการศึกษาความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานาน (อายุ 6, 12, 16 และ 18 เดือน) พบว่า ความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นค่อนข้างจะคงที่ (รูปที่ 3.23) ในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง (อายุ 6 เดือน) แคลลัสจะมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นถึง 90 เปอร์เซนต์ โดยจะลดลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และยังคงมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นไม่น้อยกว่า 85 เปอร์เซนต์ ถึงแม้จะเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานานถึง 18 เดือน

ตารางที่ 3.13 แสดง % plant regeneration และ จำนวนยอด ของเอมบริโอเจนิกแคลลัส สายพันธุ์สุวรรณ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25, 0.5 และ 1.0 ซม. บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน

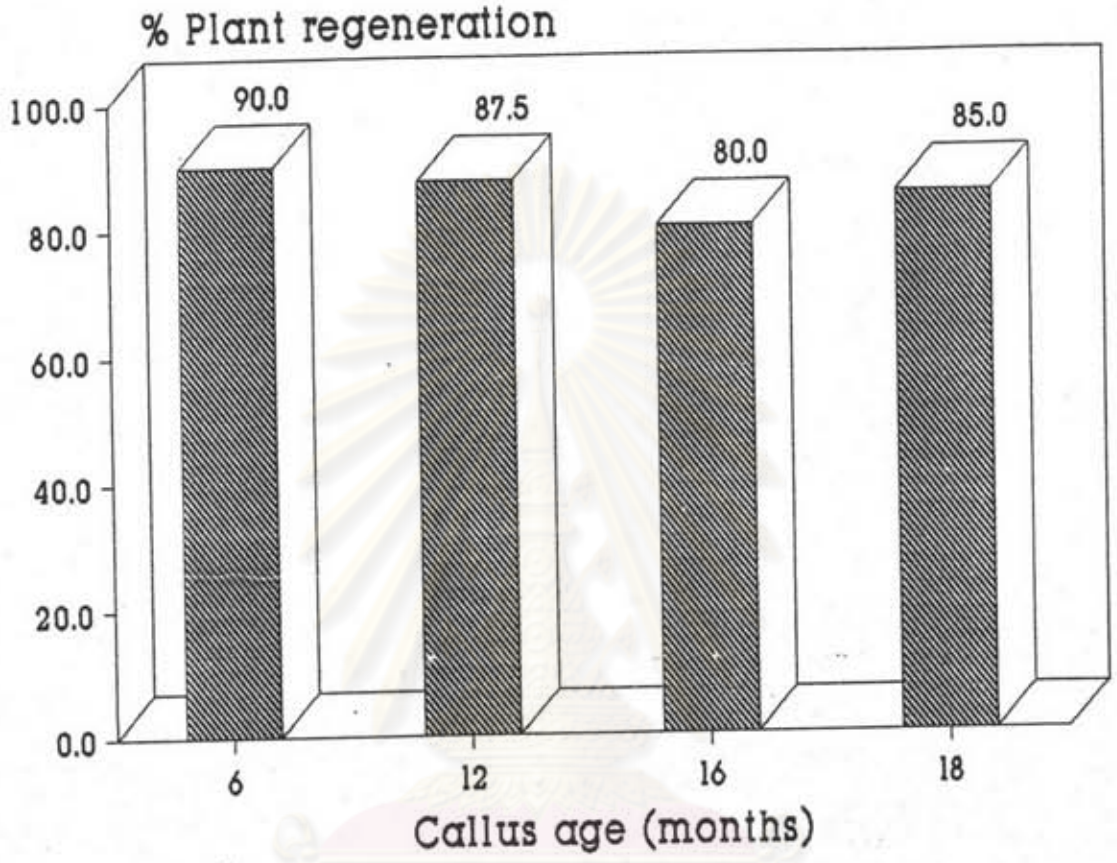
No. callus	Callus size (cm)	Average FWT callus (g)	No. callus with shoot	Total No. shoot	No. shoots per callus	No. shoots per g. FWT	% Plant regeneration
20	0.25	0.020	12	5	0.42	12.50	60
20	0.50	0.087	17	30	1.76	17.24	85
20	1.00	0.267	17	48	2.82	8.99	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.22 การพัฒนาของใบจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืด บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน อายุ 4 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.23 กราฟแสดง % plant regeneration ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืดเป็นเวลา 6, 12, 16, และ 18 เดือน

3.8.2 การศึกษาอิทธิพลของอายุเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการเจริญ

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน คือ 6, 12, 16 และ 18 เดือน ศึกษาการเจริญบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. พบว่า ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง (6 เดือน) แคลลัสจะมีการเจริญสูง (รูปที่ 3.24) และจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 6 เดือนแรก จากนั้นอัตราการเจริญจะลดลงไปบ้างเล็กน้อยเมื่อแคลลัสมีอายุ 12 เดือน หลังจากนั้นอัตราการเจริญของแคลลัสจะคงที่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงอย่างน้อยจนถึงอายุ 18 เดือน

3.8.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเอมบริโอเจนิกแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

หลังจากเพาะเลี้ยงเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ปี พบว่ามีการเจริญของแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน 2 ชนิด อย่างชัดเจน ชนิดแรกมีเนื้อแน่น สีเหลืองหรือขาว (compact) (รูปที่ 3.25) ชนิดที่สองมีลักษณะเนื้อหลวม สีขาวหรือเทา ชุ่มน้ำ (friable) (รูปที่ 3.26) เนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด พบอยู่บนแคลลัสก้อนเดียวกันซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (รูปที่ 3.27) จึงทำการศึกษาคุณสมบัติของเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด

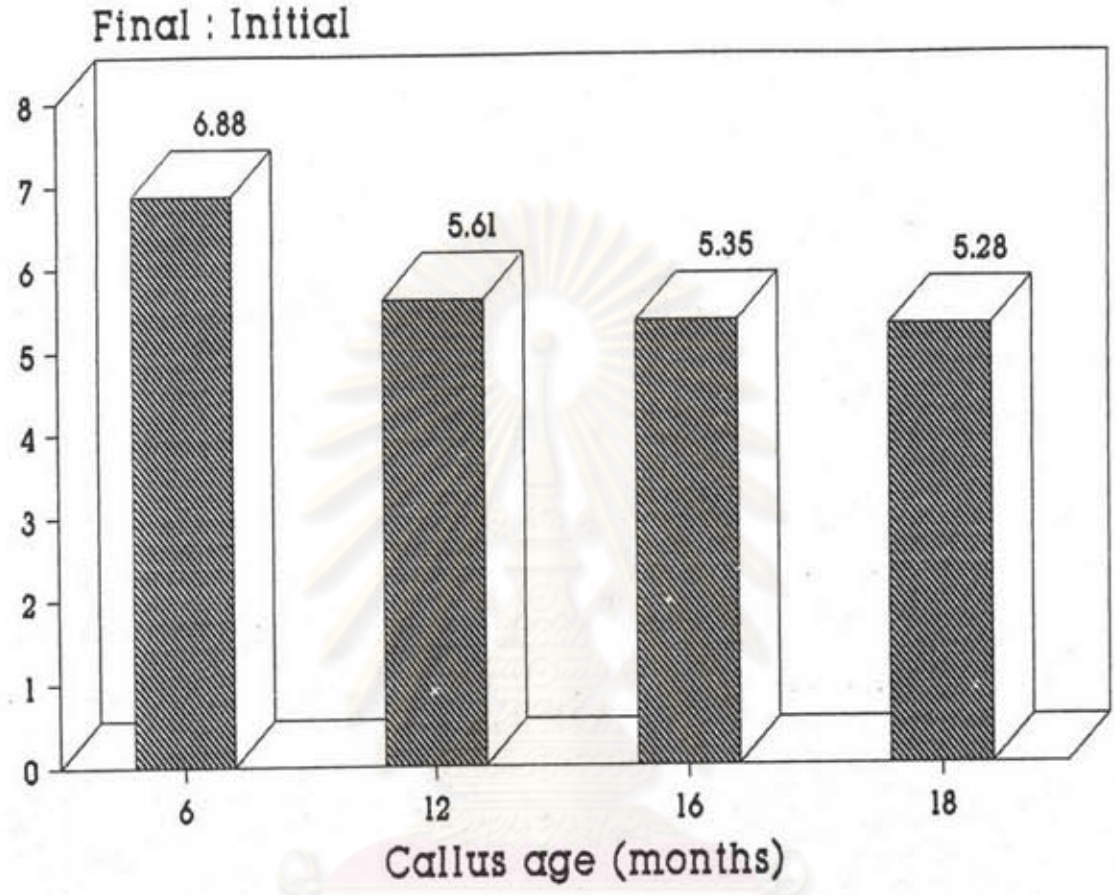
3.8.3.1 การศึกษาการหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัส

เมื่อนำแคลลัสชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. ที่เพาะเลี้ยงต่อเนื่องกันเป็นเวลาประมาณ 16 เดือน มาศึกษาการหวนกลับเป็นต้น ผลการศึกษา (ตารางที่ 3.14) พบว่าแคลลัสชนิด compact เมื่อย้ายลงสู่อาหารชักนำให้เกิดต้นและในสภาวะที่มีแสง 4,000 ลักซ์ จะมีการพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้โดยมี % plant regeneration เท่ากับ 85 เปอร์เซนต์ ขณะที่แคลลัสชนิด friable จะไม่มีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้นเลย แคลลัสจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด กล่าวคือ เนื้อเยื่อชนิด compact จัดเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้นได้

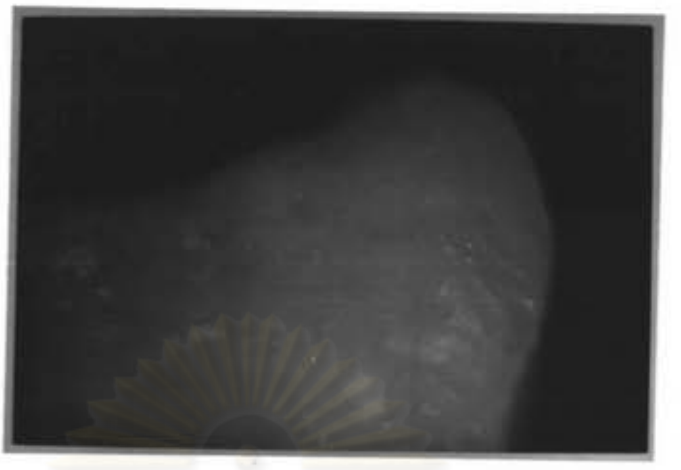
ตารางที่ 3.14 แสดง % plant regeneration ของเนื้อเยื่อชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน

Callus type	No callus	No callus with shoot	% Plant regeneration
Compact	20	17	85
Friable	20	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

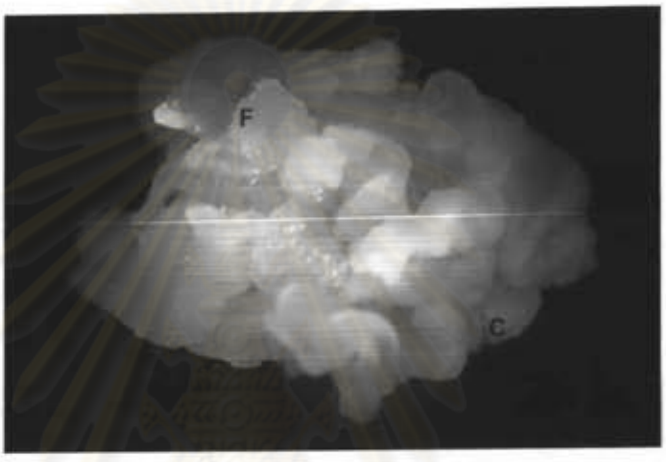


รูปที่ 3.24 กราฟแสดงอัตราการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เป็นเวลา 6, 12, 16, และ 18 เดือน



รูปที่ 3.25 ลักษณะของเนื้อเยื่อชนิด compact ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1 ปี

รูปที่ 3.26 ลักษณะของเนื้อเยื่อชนิด friable ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1 ปี



รูปที่ 3.27 ลักษณะของเนื้อเยื่อชนิด compact (C) และ friable (F) ที่เกิดร่วมกันอยู่บนเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด อายุการเพาะเลี้ยงประมาณ 1 ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และเนื้อเยื่อชนิด friable จัดเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

3.8.3.2 การศึกษาการเจริญเปรียบเทียบของแคลลัสชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัส

เมื่อทำการศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่อชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. ผลการศึกษา (ตารางที่ 3.15) พบว่า เนื้อเยื่อแคลลัสชนิด compact มีการเจริญที่รวดเร็ว ขณะที่เนื้อเยื่อแคลลัสชนิด friable มีการเจริญที่ช้ากว่าเนื้อเยื่อ compact 2.7 เท่า เนื้อเยื่อแคลลัสชนิด friable ที่แยกออกมานี้ ไม่สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องต่อไปได้ เนื่องจากแคลลัสจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

3.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension cell culture)

3.9.1 การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยจะใช้เอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. เป็นแหล่งของเซลล์เริ่มต้น (วิธีข้อ 2.14.1) เมื่อทำการศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยบนอาหารสูตรพื้นฐาน N_6 และ MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ 2,4-D ในที่มืด (ตารางที่ 3.16) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เซลล์แขวนลอยสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 4 สูตร อาหารสูตร N_6 จะให้การเจริญที่ดีกว่าอาหารสูตร MS ในทั้ง 2 ความเข้มข้นของ 2,4-D (1 และ 2 มก./ล.) ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ 1 และ 2 มก./ล. จะให้การเจริญที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ 2,4-D 1 มก./ล. จะให้การเจริญที่ดีกว่า

อาหารที่เหมาสมต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยที่สุด คือ อาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในอาหารทั้ง 4 สูตรจะคล้ายคลึงกัน เซลล์จะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนขนาดค่อนข้างใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-5 มม. (รูปที่ 3.28) และจะมีกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กซึ่งอยู่ส่วนบนของอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อแยกเอากลุ่มเซลล์ขนาด

ตารางที่ 3.15 แสดงการเจริญของเนื้อเยื่อชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.

Callus type	Initial (mg)	Final (mg)	Final : Initial (FWT*)
Compact	65	348	5.35
Friable	57	114	2.00

FWT* ข้อมูลน้ำหนักสดเฉลี่ยจากการทดลอง 10 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.16 แสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเหลวสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. ในที่มืด เป็นเวลา 3 สัปดาห์

Medium	Initial (mg)	Final (mg)	Final : Initial (DWT*)
LN1	49	290	5.92
LN2	49	244	5.08
LMS1	49	223	4.55
LMS2	49	195	3.98

FWT* ข้อมูลน้ำหนักแห้งเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.28 ลักษณะเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 0.69 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. ในที่มืด อายุ 3 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เล็กดังกล่าวโดยกรองด้วยตะแกรงไนลอนขนาด 500 ไมโครเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ (รูปที่ 3.29) พบว่า กลุ่มของเซลล์เหล่านั้นไม่สามารถเจริญได้และจะตายในที่สุด

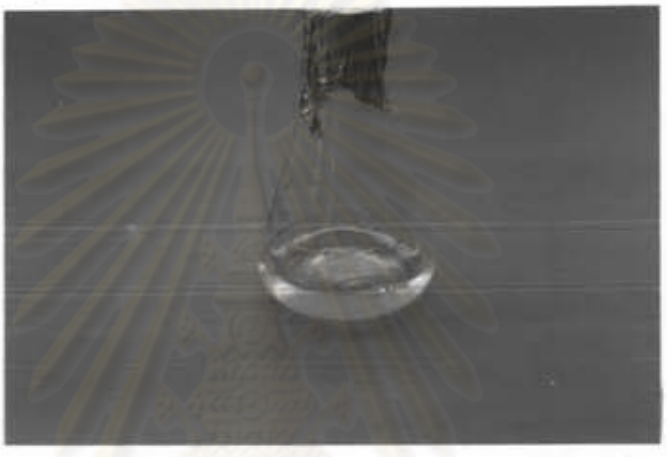
หลังจากเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 ไมโครเมตร ไปได้ประมาณ 2 สัปดาห์ จะสังเกตพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มมีความหนืดสูง และความหนืดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเรื่อย ๆ ลักษณะของความหนืดนี้จะพบอย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

3.9.2 การศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย

ทำการศึกษาลักษณะการเจริญของเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเหลวที่ให้การเจริญดี 2 สูตร คือ อาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. ผลการศึกษา (รูปที่ 3.30) พบว่า เซลล์ที่ย้ายลงบนอาหารใหม่จะใช้เวลาในการปรับตัวสั้นมาก สามารถเข้าสู่ช่วง log phase ได้ในเวลาไม่เกิน 1 สัปดาห์ และจะอยู่ในช่วง log phase จนถึงสัปดาห์ที่ 2 จึงเข้าสู่ช่วง stationary phase การเจริญจะเข้าสู่ช่วง decline phase หลังจากสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป อาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. จะให้การเจริญที่ดีกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 2 มก./ล. ตลอดเวลาของการเพาะเลี้ยง ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการย้ายเซลล์แขวนลอยลงสู่อาหารใหม่ คือ ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึงสัปดาห์ที่ 4

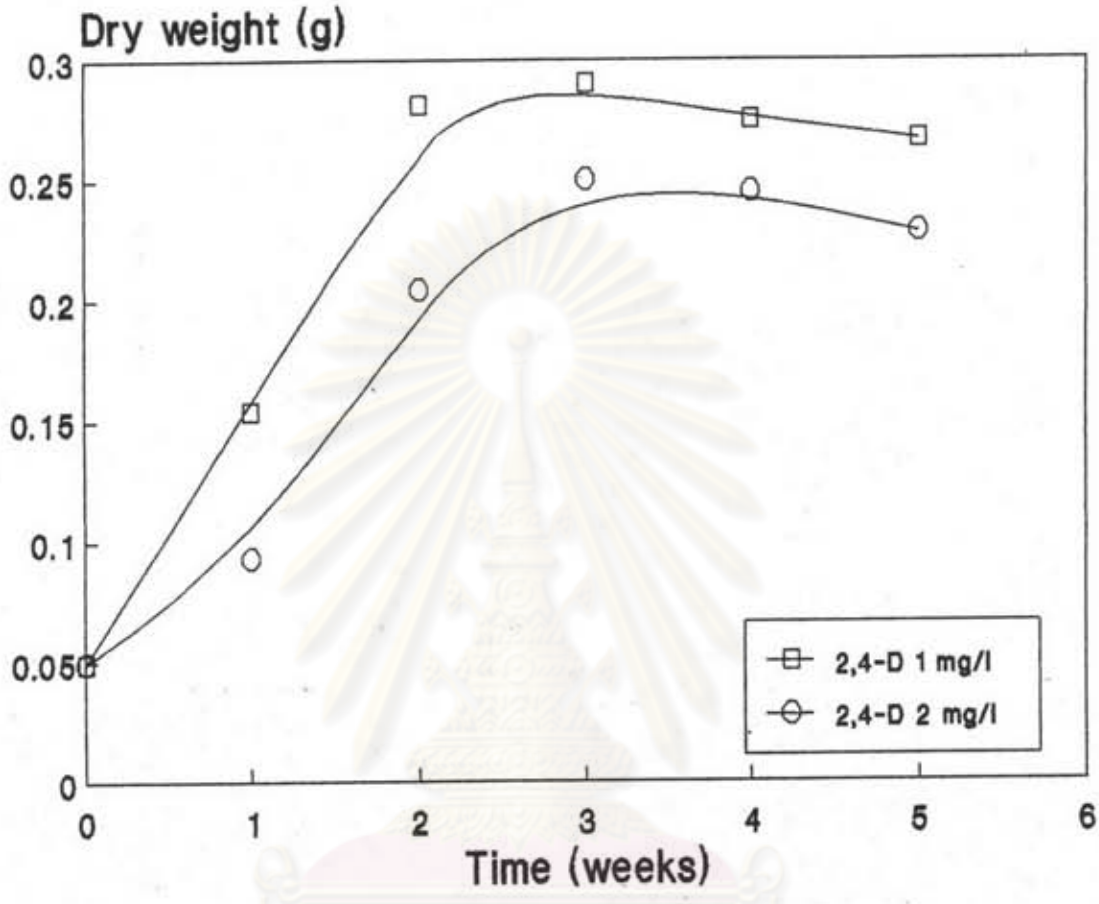
3.9.3 การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอย

ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. (วิธีข้อ 2.14.3) โดยนำเซลล์แขวนลอยที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงประมาณ 60 วัน มากรองด้วยตะแกรงไนลอนขนาด 500 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอากลุ่มเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดเล็กและขนาดใหญ่ออกเป็น 2 กลุ่ม จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยทั้ง 2 กลุ่ม ไปเจริญบนอาหารกึ่งแข็งสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่กรองผ่านตะแกรงไนลอน ขนาด 500 ไมโครเมตร ไม่สามารถที่จะเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงได้ (รูปที่ 3.31) สำหรับกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะมีการเจริญและขยายขนาดของแคลลัสซึ่งมีลักษณะ compact สีเหลือง (รูปที่ 3.32) เมื่อย้ายแคลลัสขนาดใหญ่กว่า 0.25 ที่ได้ ลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นและให้แสง จะเกิดจุดเขียว และมีการพัฒนาของยอด และราก

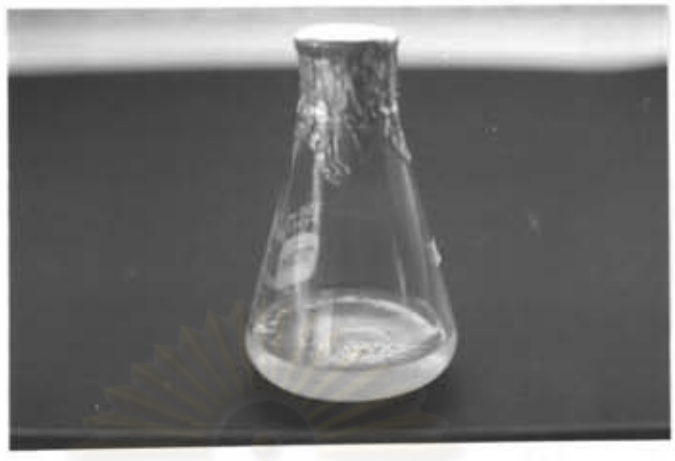


รูปที่ 3.29 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดเล็กกว่า 500 ไมโครเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 0.69 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. ในที่มืด อายุ 6 สัปดาห์

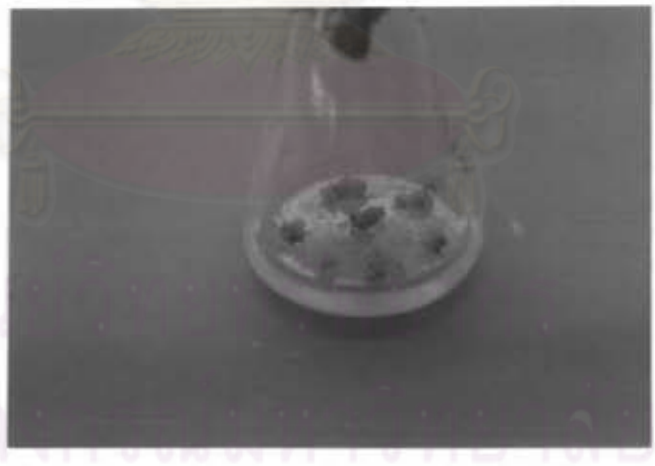
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.30 กราฟการเจริญของเซลล์แขวนลอยสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล., L-proline 0.69 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. ในที่มืด เป็นเวลา 5 สัปดาห์



รูปที่ 3.31 ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า 500 ไมโครเมตร เมื่อกระจายบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 3.32 ลักษณะของแคลลัสที่เจริญจากเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 ไมโครเมตร บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

กลายเป็นต้นสมบูรณ์ได้ (รูปที่ 3.33)

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ

3.10.1 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระด้วยวิธี HPLC

ในการสร้างกราฟมาตรฐานของเมทไธโอนีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 nmole/ml โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทไธโอนีน (pmole) กับ พื้นที่ใต้กราฟ กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงผ่านจุดศูนย์ (ภาคผนวกที่ 14) มีค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 99.97 เปอร์เซนต์ และมีสมการเส้นตรง คือ

$$A = 1.022 + 1.374 \times 10^{-3} (B)$$

A = ปริมาณเมทไธโอนีนต่อ peak (pmole)

B = พื้นที่ใต้กราฟ

จากสมการเส้นตรงที่ได้สามารถคำนวณปริมาณของเมทไธโอนีน โดยแทนค่าพื้นที่ใต้กราฟลงในสมการ จากนั้นคำนวณกลับเป็นปริมาณเมทไธโอนีนต่อกรัมน้ำหนักสดได้จากสมการ

$$\text{nmole/gFWT} = \frac{3\ AV \times 10^{-3}}{YZ}$$

V = ปริมาตรของสารละลายกรดอะมิโนอิสระที่สกัดจากแคลลัส (ไมโครลิตร)

Y = น้ำหนักสดของแคลลัสที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

Z = ปริมาตรของสารผสมที่ฉีดเข้าสู่เครื่อง HPLC (ไมโครลิตร)

3.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay)

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนโดยใช้วิธีทางชีวภาพ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph บนอาหารที่มีเมทไธโอนีนความเข้มข้น 0.005-0.1 ไมโครกรัม พบว่า การเจริญของเชื้อ E. coli แปรผันตามความ

รูปที่ 3.33 ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากแคลลัสที่เจริญจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เข้มข้นของเมทไธโอนีน (รูปที่ 3.34) เมื่อความเข้มข้นของเมทไธโอนีนสูงขึ้น อัตราการเจริญของ E. coli จะสูงขึ้นด้วย เชื้อจะใช้เวลาอยู่ในระยะ lag phase ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มต้นเข้าสู่ log phase ในชั่วโมงที่ 2 หลังจากชั่วโมงที่ 5 เชื้อที่เจริญบนอาหารที่มีเมทไธโอนีนต่ำกว่า 0.05 ไมโครกรัม จะเข้าสู่ stationary phase ขณะที่เชื้อบนอาหารที่มีเมทไธโอนีน 0.1-1.0 ไมโครกรัม สามารถเจริญต่อไปได้ เมื่อคำนวณสัมประสิทธิ์การเจริญของเซลล์ (u) ระหว่างชั่วโมงที่ 2 ถึงชั่วโมงที่ 5 (ภาคผนวกที่ 15) แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของปริมาณเมทไธโอนีน กับค่าสัมประสิทธิ์การเจริญของ E. coli จะได้กราฟที่เป็นเส้นตรง (รูปที่ 3.35) มีค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 92.85 เปอร์เซนต์ และมีสมการเส้นตรง คือ

$$\log C = -2.752 + 7.134\ U$$

C = ปริมาณของเมทไธโอนีน (ไมโครกรัม)

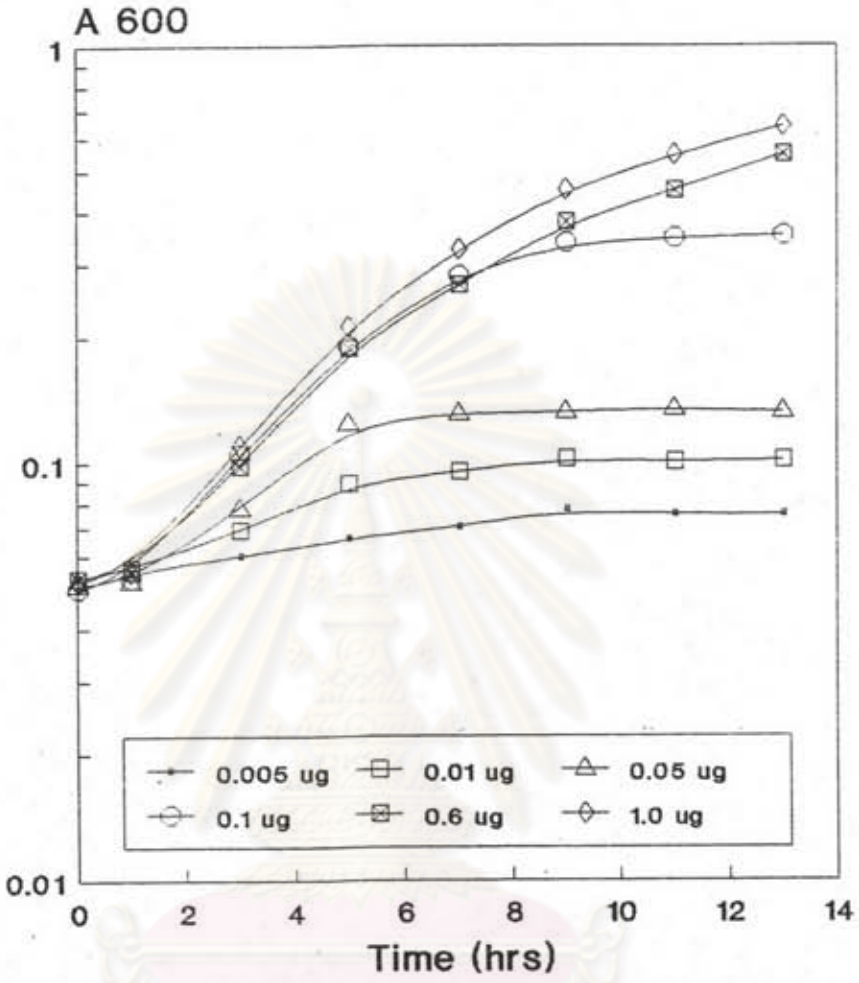
U = สัมประสิทธิ์การเจริญของ E. coli (t^{-1})

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถคำนวณปริมาณของเมทไธโอนีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เมื่อแทนค่าสัมประสิทธิ์การเจริญของเซลล์ลงในสมการ จากนั้นคำนวณกลับเป็นปริมาณเมทไธโอนีนต่อกรัมน้ำหนักสดได้

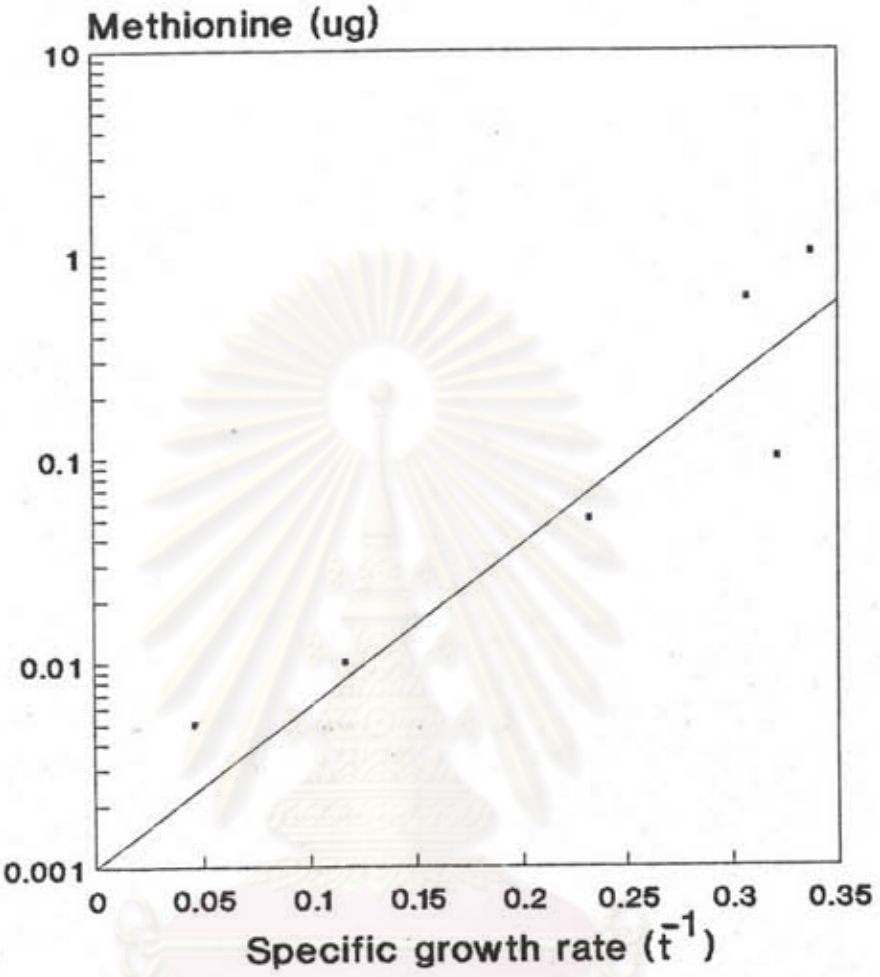
3.11 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ผลิตเมทไธโอนีนสูง

3.11.1 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

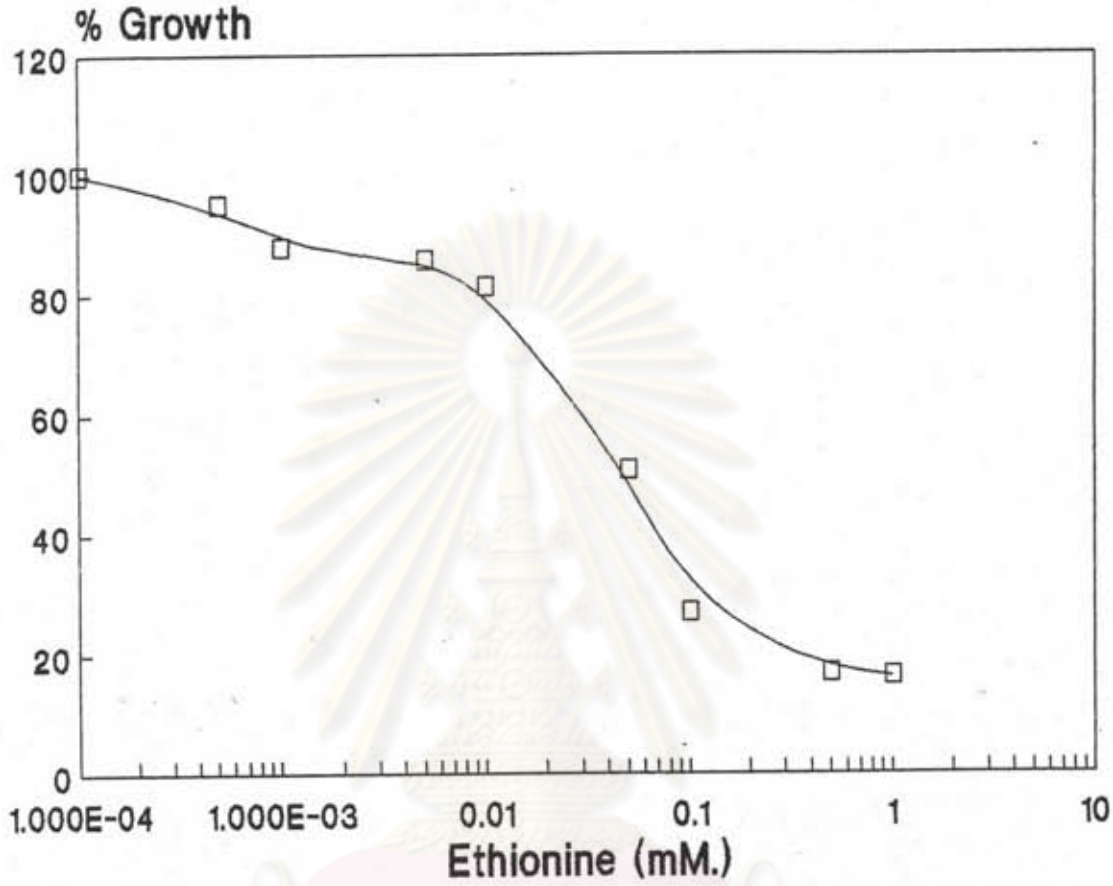
จากการศึกษา (วิธีข้อ 2.17.1) พบว่า เอทไธโอนีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. (รูปที่ 3.36) อัตราการเจริญของแคลลัสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทไธโอนีนเพิ่มขึ้น เอทไธโอนีนความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการเจริญประมาณ 20 เปอร์เซนต์ โดยแคลลัสจะมีสีเหลืองคล้ำออกน้ำตาล ช่วงความเข้มข้นของเอทไธโอนีนที่มีผลต่อการเจริญของ



รูปที่ 3.34 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph ในอาหารสูตร David minimum medium ที่มีเมทไธโอนีนความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 ไมโครกรัม เลี้ยงบน rotary shaker เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 ^{0}C



รูปที่ 3.35 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างเมทไธโอนีนบริสุทธิ์กับค่าสัมประสิทธิ์การเจริญของเชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph ในอาหารสูตร David minimum medium เลี้ยงบน rotary shaker เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ^{o}C



รูปที่ 3.36 แสดงอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อใช้แคลลัสน้ำหนักประมาณ 50 มก. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด เป็นเวลา 3 สัปดาห์

แคลส์สอย่างมาก คือ ตั้งแต่ 0.05 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไป โดยทำให้อัตราการเจริญลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซนต์ แคลส์ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีเอทไธโอนีนความเข้มข้นมากกว่า 0.05 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไป จะพบส่วนที่เกิดการ necrosis กลายเป็นสีน้ำตาล หรือ ดำ ซึ่งอาจพบเป็นบางส่วนหรือทั้งก้อนของแคลส์ โดยเฉพาะส่วนที่สัมผัสกับอาหาร และเมื่อความเข้มข้นสูงถึง 0.5 มิลลิโมลาร์ การเจริญของแคลส์จะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ จากกราฟสามารถหาค่าความเข้มข้นของเอทไธโอนีนที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 50 เปอร์เซนต์ (ID_{50}) ได้เท่ากับ 0.05 มิลลิโมลาร์ ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนต่อไป

3.11.2 การคัดเลือกแคลส์ของข้าวโพดที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

แคลส์ที่เลี้ยงอยู่ในอาหารที่มีเอทไธโอนีนความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังจาก 3 สัปดาห์ (วิธีข้อ 2.17.2) พบว่า ชิ้นของแคลส์จำนวนมากจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตาย และมีบางส่วนที่ยังคงเจริญได้ เมื่อย้ายเนื้อเยื่อที่สามารถเจริญได้ลงสู่อาหารใหม่ทุก ๆ 3 สัปดาห์ แคลส์จะมีการตายมากขึ้น ในบางแคลส์ที่สามารถเจริญได้ จะพบสารลักษณะใสและมีความหนืดสูง ขับออกมาจากแคลส์อยู่บริเวณผิวที่สัมผัสกับอาหาร แคลส์ที่ยังสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีเอทไธโอนีนทั้ง 2 ความเข้มข้น หลังจากเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน จัดว่าเป็นแคลส์ที่ต้านต่อเอทไธโอนีน

จากการคัดเลือกเป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามี 11 สายพันธุ์ของแคลส์ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ และ 3 สายพันธุ์ บนอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.1 มิลลิโมลาร์ แคลส์ยังคงมีลักษณะ compact สีเหลือง อย่างไรก็ตามในการย้ายแคลส์สลงบนอาหารใหม่ยังคงพบส่วนที่เกิดการตายบางส่วนร่วมอยู่ด้วย โดยเฉพาะส่วนที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง แคลส์ในอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญรวดเร็วกว่าที่ 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นอย่างมาก

หลังจากทำการคัดเลือกเซลล์แคลส์ต้านเอทไธโอนีนโดยย้ายแคลส์ทุก ๆ 3 สัปดาห์ ด้วยวิธีการเลาะเอาเซลล์ที่ตายออก เอาเฉพาะเซลล์ที่มีสภาพดีย้ายลงในอาหารใหม่ที่มีเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลาสืบเนื่องนาน 6 เดือน คัดเลือกสายพันธุ์ของแคลส์ที่มีการเจริญที่ดี มีการตายของเซลล์น้อย และไม่พบการขับสารเมือกออกมา เรียกกลุ่มเซลล์นี้ว่า NS8 ซึ่งนำไปทำศึกษาและวัดปริมาณเมทไธโอนีนอิสระต่อไป สำหรับแคลส์ที่คัดเลือกในอาหารที่มีเอทไธโอนีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือน

มีเพียง 2 แคลลัสที่สามารถเจริญได้ และมีอัตราการเจริญที่ต่ำมากจนไม่สามารถเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากพอเพื่อที่จะทำการศึกษาต่อไปได้

3.11.3 การศึกษาอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

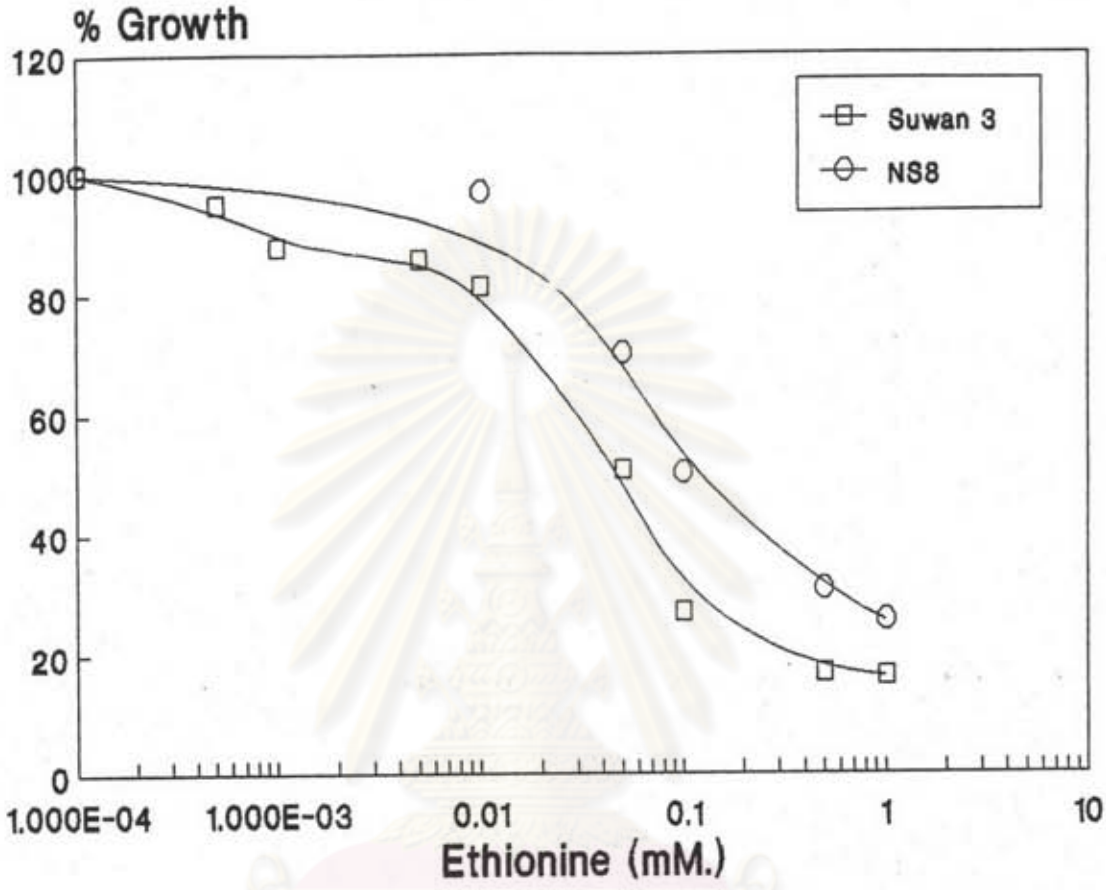
เมื่อนำแคลลัสสายพันธุ์ NS8 ที่คัดเลือกจากเอทไธโอนีนความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ มาศึกษาการยับยั้งการเจริญโดยเอทไธโอนีนความเข้มข้นต่าง ๆ สายพันธุ์ NS8 จะต้านทานต่อการถูกยับยั้งด้วยเอทไธโอนีน สูงกว่าสายพันธุ์ปกติในทุกความเข้มข้น (รูปที่ 3.37) เอทไธโอนีนความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการเจริญเพียง 5 เปอร์เซนต์ และที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเท่ากับ ID_{50} ของสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน สายพันธุ์ NS8 มีอัตราการเจริญสูงกว่าประมาณ 20 เปอร์เซนต์ จากกราฟสามารถหาค่า I_{50} ของสายพันธุ์ NS8 ได้เท่ากับ 0.095 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานประมาณ 2 เท่า

3.11.4 การวัดปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

จากการวัดปริมาณของเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสสายพันธุ์ NS8 และสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนโดยใช้เครื่อง HPLC (วิธีข้อ 2.16.1) ได้ผลตามที่รวบรวมได้ (ตารางที่ 3.17) สายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนมีปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ เฉลี่ย 3.11 nmole/gFWT ขณะที่สายพันธุ์ NS8 มีค่าเฉลี่ยสูงถึง 8.59 nmole/gFWT ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 2.76 เท่า

3.11.5 การหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

เมื่อนำแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ (ID_{50} เท่ากับ 0.095) สายพันธุ์ NS8 ที่มีอายุประมาณ 6 เดือน ย้ายลงสู่อาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร N_6 ที่ไม่เสริมด้วยฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์ พบว่า แคลลัสสายพันธุ์ NS8 สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ โดยมี % plant regeneration มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ ส่วนใหญ่จะมีจำนวนยอดเพียง 1 ยอดต่อแคลลัส ยอดที่ได้มีลักษณะต่าง ๆ กันตามที่รายงานไว้ (ตารางที่ 3.18) ยอดที่มีลักษณะปกติจะมีการเจริญเหมือนยอดที่ชักนำจากแคลลัสที่ไม่ต้านทานต่อ



รูปที่ 3.37 แสดงอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ NS8 เมื่อใช้แคลลัสน้ำหนัก 30 มก. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ตารางที่ 3.17 แสดงปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ NS8 ซึ่งต้านทานต่อเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์

Sample	Free methionine (nmole/gFWT)	
	SUWAN 3	NS8
1	3.09	7.77
2	3.17	8.51
3	1.86	9.48
4	4.23	-
5	3.21	-
Mean	3.11	8.59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

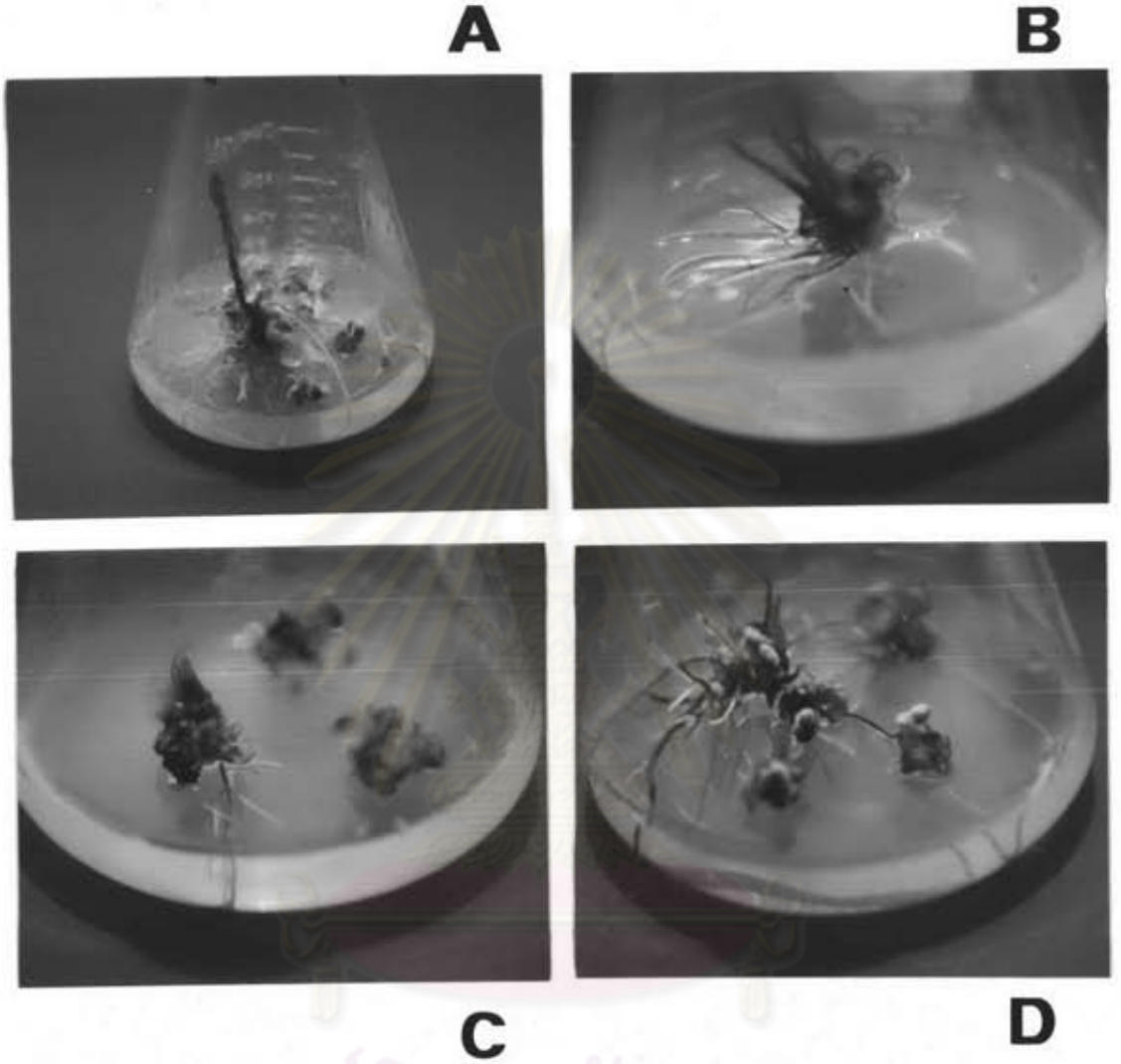
ตารางที่ 3.18 แสดงลักษณะต่าง ๆ ของต้นข้าวโพดที่ชักนำจากแคลลัสสายพันธ์ NS8 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 4,000 ลักซ์ 16 ชม./วัน เป็นเวลา 30 วัน

No. callus	Character
2	ต้นมีลักษณะภายนอกปกติเหมือนข้าวโพดควบคุม
2	ต้นเตี้ย, แคระแกรน, ใบสั้นและหงิกงอ
4	ต้นมีรงควัตถุสีม่วงทั้งลำต้นและใบ
4	เกิดเฉพาะรากซึ่งมีรงควัตถุสีม่วง
4	ไม่มีการพัฒนาของยอดและรากแต่แคลลัสมีรงควัตถุสีม่วง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอทไธโอนีน (รูปที่ 3.38.A) ส่วนยอดที่แคระแกรน (dwarf) จะมีลักษณะเป็นกอพุ่ม ใบจะหนา สั้น และหงิกงอ (รูปที่ 3.38.B) นอกจากนี้ยังพบลักษณะผิดปกติของยอดที่มีสีม่วงเข้ม (รูปที่ 3.38.C) โดยที่สีม่วงจะเกิดขึ้นทุกส่วนของยอด ต้นที่มีลักษณะดังกล่าวจะไม่สามารถเจริญได้และตายในที่สุด สำหรับแคลลัสที่ไม่เกิดการหวนกลับเป็นต้น จะมีการพัฒนาของรากเท่านั้น และในทุกแคลลัสจะพบลักษณะของการสร้างรงควัตถุสีม่วงขึ้นทั้งในส่วนของแคลลัส และรากที่พัฒนาจากแคลลัสด้วย (รูปที่ 3.38.D)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.38 แสดงลักษณะของต้นที่ชักนำจากแคลลัสสายพันธุ์ NS8 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์ 16 ชม./วัน อายุ 30 วัน

A. ต้นที่มีลักษณะปกติ

B. ต้นที่มีลักษณะแคระแกรน ใบสั้น และหงิกงอ

C. ยอดที่มีรงควัตถุสีม่วง

D. แคลลัสที่เกิดเฉพาะรากซึ่งมีรงควัตถุสีม่วง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย