การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพด (Zea mays L.) ผลิตเมทไธโอนีนปริมาณสูงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

นาย นิธิ เจนไวยาวัจมัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2536

ISBN 974-582-995-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019274
I17887516

Selection of High Methionine Producing Corn (Zea mays L.) Via Cell Culture

Mr. Niti Jenwaiyawasjamai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-582-995-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพด (Zea mays L.) ผลิตเมทไธโอนีนปริมาณสูงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

โดย นายนิธิ เจนไวยาวัจมัย

สหสาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณพยัคฆ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

นิธิ เจนไวยาวัจมัย : การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพด (Zea mays L.) ผลิตเมทไธโอนีนปริมาณสูงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (SELECTION OF HIGH METHIONINE PRODUCING CORN (Zea mays L.) VIA CELL CULTURE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สัณห์ พณิชย์กุล, 151 หน้า. ISBN 974-582-995-1

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของคัพภะอ่อนและคัพภะแก่ของข้าวโพดไทยสายพันธุ์สุวรรณ 3, KSX 2301, KTX 3101 และ Ki7 บนอาหารสูตร N_6 หรือ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1-4 มก./ล. และซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในที่มืด แคลลัสชนิด compact และ friable จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อวางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหาร แคลลัสชนิด compact ของสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ Ki7 เท่านั้น ที่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ โดยสายพันธุ์สุวรรณ 3 จะมีประสิทธิภาพสูงสุด สายพันธุ์สุวรรณ 3 จะเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงคัพภะขนาด 1.5 มม. บนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ L-proline 2.3 ก./ล. เอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 จะเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ L-proline 2.3 ก./ล. การชักนำให้เกิดต้นแบบเอมบริโอเจเนซิส ทำได้โดยย้ายเอมบริโอเจนิกแคลลัส ลงบนอาหารที่มีซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ ปราศจาก 2,4-D และให้แสง 4,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง./วัน เอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 นี้ สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้นานกว่า 18 เดือน โดยยังมีลักษณะและความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นคงที่

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยของแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในที่มืดบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ L-proline 0.69 ก./ล. พบว่ากลุ่มเซลล์มีขนาดประมาณ 1-5 มม. และกลุ่มเซลล์มีขนาดใหญ่กว่า 500 ไมโครเมตร สามารถหวนกลับเป็นต้นได้

ในการคัดเลือกแคลลัสของข้าวโพดที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือน สามารถเลือกได้ 11 โคลน ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญ 50 เปอร์เซ็นต์ (ID_{50}) ของโคลน NS8 ซึ่งคัดเลือกได้เท่ากับ 0.095 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิโมลาร์ เมทไธโอนีนอิสระที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์แคลลัส NS8 และสุวรรณ 3 เท่ากับ 8.59 และ 3.11 นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แคลลัส NS8 สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ โดยมี % plant regeneration ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ต้นข้าวโพดที่เกิดขึ้นมีลักษณะสมบูรณ์เพียง 25 เปอร์เซ็นต์, ต้นแคระแกรน 25 เปอร์เซ็นต์ และต้นผิดปกติที่มีรงควัตถุสีม่วง ทั้งส่วนต้นและราก 50 เปอร์เซ็นต์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C226052 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: PLANT REGENERATION / METHIONINE ANALOG / ETHIONINE RESISTANT CORN
NITI JENWAIYAWASJAMAI : SELECTION OF HIGH METHIONINE PRODUCING CORN (Zea mays L.) VIA CELL CULTURE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D. 151 pp. ISBN 974-582-995-1

Immatured and matured maize (Zea mays L.) embryos of Thai isolates (Suwan 3, KSX 2301, KTX 3101 and Ki7) were cultured under dark conditions on either N_6 or MS medium, containing 2,4-D (1-4 mg/l) and 2% sucrose. The compact and friable calluses could be induced with high yield from the scutellum part when embryonic axis were in contact with the medium. Only compact embryogenic callus from Suwan 3 and Ki7 isolates had regenerated into plants with higher efficiency as demonstrated in Suwan 3. Maximum embryogenic callus formation of Suwan 3 was observed when embryo size of 1.5 mm. was cultured on MS medium with 1 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l L-proline. Growth rate of Suwan 3 callus was optimum when culturing the callus in N_6 medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l L-proline, in the dark. Somatic embryogenesis was occured when the medium was consisted of 6% sucrose and free from 2,4-D, with the light intensity of 4,000 lux (16 hr.). Continuous culture of those compact embryogenic calluses for over 18 months in darkness exhibited almost no change in percentage of regeneration.

Calli grown from the immatured embryos of Suwan 3 were established in liquid culture. Cell clusters of 1-5 mm. was found in N_6 liquid medium supplemented with 2,4-D (1 mg/l) and L-proline (0.69 g/l) in darkness. Somatic embryogenesis was fully observed only with a rather large size of cell aggregates (500 um. or the higher).

In order to select for the ethionine resistant maize, the compact calluses were further cultured in the medium containing 0.05 mM ethionine. After six months cultivation, 11 resistant clones of somatic embryogenic calluses were obtained. Fifty percents inhibition dose (ID_{50}) of ethionine to the established clone (NS8) was elevated to 0.095 mM in comparison to the original value of 0.05 mM.. Free methionine content of NS8 and Suwan 3 was 8.59 and 3.11 nmole per gram fresh weight, respectively. The regeneration efficiency of NS8 callus was decreased to around 50% and achieved only 25% normal plants, 25% dwarf and 50% abnormal maize with purple pigments produced under the standard condition.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีของ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาของการวิจัย ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณพยัคฆ์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ อาจารย์สรรเสริญ และ อาจารย์ชบา จำปาทอง แห่งศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ที่ได้ช่วยกรุณาให้ข้อมูลและเมล็ดพันธุ์รวมทั้งช่วยเพาะพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลองนี้ทั้งหมด

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาชีวเคมี สำหรับความรู้และคำแนะนำอันมีค่ายิ่ง

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติที่อนุเคราะห์สายพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือวิเคราะห์ตัวอย่าง เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี นิสิตปริญญาโทเทคโนโลยีชีวภาพและชีวเคมี สำหรับความช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติและบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนค้นคว้าการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ น้อง สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจ ที่มีให้มาตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ต
คำย่อ ..... บ

บทที่

1 บทนำ 1
2 วิธีการทดลอง 15
2.1 ครุภัณฑ์ 15
2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์ 16
2.2.1 ฝักอ่อนและเมล็ดพันธุ์ของข้าวโพด ที่ใช้ในการทดลอง 16
2.2.2 สารเคมี 16
2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์แขวนลอย 17
2.4 สภาวะมาตราฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 17
2.5 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลว 17
2.6 การเตรียมคัพภะของข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 18
2.6.1 การเตรียมคัพภะแก่ (mature embryo) 18
2.6.2 การเตรียมคัพภะอ่อน (immature embryo) 18
2.7 การศึกษาอิทธิพลของลักษณะทิศทางการวางของคัพภะอ่อนต่อการเกิดแคลลัส. 18
2.8 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้น 20
2.8.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่ 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน 20
2.8.3 การหวนกลับเป็นต้นจากแคลลัส ที่ชักนำจากคัพภะอ่อนและคัพภะแก่. 21
2.8.4 การจำแนก (classification) ชนิดของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน 21
2.9 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส (embryogenic callus) ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 22
2.9.1 การศึกษาขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส 22
2.9.2 การศึกษาชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส 22
2.10 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 23
2.10.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส 23
2.10.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ 24
2.11 การศึกษาการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 24
2.11.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส 24
2.11.2 การศึกษาลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส.. 24
2.12 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส.25
2.12.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น 25
2.12.2 การศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของแคลลัสต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด 25
2.13 การศึกษาความเสถียรของเอมบริโอเจนิกแคลลัส 26
2.13.1 การศึกษาอิทธิพลของอายุเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการ

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

หวนกลับเป็นต้น 26
2.13.2 การศึกษาอิทธิพลของอายุเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการเจริญ ... 26
2.14 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension cell culture) ... 26
2.14.1 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย 26
2.14.2 การศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย 27
2.14.3 การชักนำให้เกิดต้นของเซลล์แขวนลอย 27
2.15 การสกัดกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid)..... 28
2.16 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ 28
2.16.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 28
2.16.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) 29
2.17 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ผลิตเมทไธโอนีนสูง 30
2.17.1 การศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส 30
2.17.2 การคัดเลือกแคลลัสข้าวโพดที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 31
2.17.3 การศึกษาอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 31
2.17.4 การวัดปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 31
2.17.5 การหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 32
3 ผลการทดลอง 33
3.1 การเตรียมคัพภะที่ใช้เป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 33
3.1.1 การเตรียมคัพภะอ่อนจากฝักอ่อน 33
3.1.2 การเตรียมคัพภะแก่จากเมล็ดพันธุ์ 33
3.2 การศึกษาอิทธิพลของลักษณะทิศทางการวางของคัพภะอ่อนต่อการเกิดแคลลัส. 35
3.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่เหมาะต่อการชักนำให้เกิดต้น 38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน 38
3.3.3 การหวนกลับเป็นต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อน ... 41
3.3.4 การจำแนกชนิดของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน 48
3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 50
3.4.1 การศึกษาขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส 50
3.4.2 การศึกษาชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส 50
3.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 53
3.5.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส . 53
3.5.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ 53
3.6 การศึกษาการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 56
3.6.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส 56
3.6.2 การศึกษาลักษณะและการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส 56
3.7 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส.59
3.7.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น 59
3.7.2 การศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของแคลลัสต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด 65
3.8 การศึกษาความเสถียรของประสิทธิภาพการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 65

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8.1 การศึกษาอิทธิพลของอายุของเอมบริโอเจนิกแคลลัส
ต่อการหวนกลับเป็นต้น 65
3.8.2 การศึกษาอิทธิพลของอายุของเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการเจริญ . 69
3.8.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเอมบริโอเจนิกแคลลัส
เมื่อเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 69
3.8.3.1 การศึกษาการหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสชนิด
compact และ friable ที่แยกได้จาก
เอมบริโอเจนิกแคลลัส 69
3.8.3.2 การศึกษาการเจริญเปรียบเทียบของแคลลัสชนิด
compact และ friable ที่แยกได้จาก
เอมบริโอเจนิกแคลลัส 74
3.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย 74
3.9.1 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย. 74
3.9.2 การศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย 78
3.9.3 การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แบบแขวนลอย 78
3.10 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ 82
3.10.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 82
3.10.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ 82
3.11 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ผลิตเมทไธโอนีนสูง 84
3.11.1 การศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของ
เอมบริโอเจนิกแคลลัส 84
3.11.2 การคัดเลือกแคลลัสข้าวโพดที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 88
3.11.3 การศึกษาอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของ
แคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 89
3.11.4 การวัดปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสที่ต้านทาน
และไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 89

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.11.5 การหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 89

4 สรุปและการวิจารณ์ผลการทดลอง 95

4.1 การศึกษาอิทธิพลของลักษณะทิศทางการวางของคัพภะอ่อนต่อการเกิดแคลลัส. 96

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้น 97

4.2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่ 97

4.2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน 98

4.2.3 การหวนกลับเป็นต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และอ่อน 99

4.2.4 การจำแนกชนิดของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน 101

4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพด
สายพันธุ์สุวรรณ 3 102

4.3.1 การศึกษาขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการเกิด
เอมบริโอเจนิกแคลลัส 102

4.3.2 การศึกษาชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสม
ต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส 103

4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส
ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 104

4.4.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส. 104

4.4.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส
บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ 105

4.5 การศึกษารูปแบบการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้น
ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 105

4.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการหวนกลับเป็นต้นของ
เอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 106

4.6.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น 106

4.6.2 การศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของแคลลัส
ต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด 107

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.7 การศึกษาความเสถียรของประสิทธิภาพในการหวนกลับเป็นต้น
ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 108
4.7.1 การศึกษาอิทธิพลของอายุของเอมบริเจนิกแคลลัส
ต่อการเจริญและการหวนกลับเป็นต้น 108
4.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย..... 110
4.8.1 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง
เซลล์แบบแขวนลอย 110
4.8.2 การศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย 111
4.8.3 การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอย 112
4.9 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ 112
4.10 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ผลิตเมทไธโอนีนสูง 113
4.10.1 การศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของ
เอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพด 113
4.10.2 การคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนและการศึกษา
ผลกระทบของเอทไธโอนีนที่มีต่อการเจริญของแคลลัส
ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 114
4.10.3 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสที่ต้านทาน
และไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 115
4.10.4 การหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน 116
สรุปผลการวิจัย 118
เอกสารอ้างอิง 121
ภาคผนวกที่
1. แสดงลักษณะบางประการทางด้านการเจริญและการพัฒนาของข้าวโพดไทย 128
2. สูตรอาหารของ Murashige และ Skooge (1962) 129
3. สูตรอาหาร N_6 (Chu et al., 1975) 130
4. สูตรอาหาร David minimum medium 131

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. ตารางแสดงน้ำหนักของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด และในที่มีแสง บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. 132

6. ตารางแสดงน้ำหนักของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 จากการวัดการเจริญบนอาหารสูตรต่าง ๆ 133

7. แสดงน้ำหนักของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในแต่ละสัปดาห์บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. 135

8. แสดงน้ำหนักของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25, 0.5 และ 1.0 ซม. 136

9. แสดงน้ำหนักจากการวัดการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อแคลลัสมีอายุเท่ากับ 6, 12, 16 และ 18 เดือน 138

10. แสดงน้ำหนักจากการวัดการเจริญของแคลลัสชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. 139

11. แสดงน้ำหนักของเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ 140

12. แสดงน้ำหนักของเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารเหลวสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. ในแต่ละสัปดาห์ 141

13. แสดง chromatogram และ พื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของเมทไธโอนีนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (วิธีข้อ 2.16.1) 142

14. แสดงกราฟมาตรฐานของเมทไธโอนีนบริสุทธิ์เมื่อทำให้เป็นอนุพันธ์ของ o-phthalaldehyde แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 143

15. แสดงค่าสัมประสิทธิ์การเจริญของ เชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph ในอาหารสูตร David minimum medium ที่มีเมทไธโอนีนความเข้มข้นต่าง ๆ 144

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

16. แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ซึ่งมีเมทไธโอนีนความเข้มข้นต่าง ๆ 145

17. แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์ NS8 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ซึ่งมีเอทไธโอนีนความเข้มข้นต่าง ๆ 146

18. แสดง chromatogram และ พื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของเมทไธโอนีนอิสระ ที่เป็นองค์ประกอบของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (วิธีข้อ 2.17.4) 147

19. แสดง chromatogram และ พื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของเมทไธโอนีนอิสระ ที่เป็นองค์ประกอบของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์ NS8 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (วิธีข้อ 2.17.4) 149

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1.1 ผลผลิต การใช้ และการส่งออกของข้าวโพดไทย พ.ศ.2529-34 2

3.1 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนอายุ 13-17 วัน เมื่อวางด้าน embryonic axis และ scutellar node สัมผัสกับอาหาร .. 36

3.2 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ของข้าวโพดสายพันธุ์ สุวรรณ 3 และ KTX 3101 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เป็นเวลา 5 สัปดาห์..... 39

3.3 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ KTX 3101 และ KSX 2301 บนสูตรอาหาร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 42

3.4 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ สุวรรณ 3 และ Ki7 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 43

3.5 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 บนอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. 44

3.6 แสดง % plant regeneration ของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน ของข้าวโพดสายพันธุ์ KTX 3101, KSX 2301, Ki7 และสุวรรณ 3 ที่ชักนำด้วยอาหารสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล.. 45

3.7 แสดง % plant regeneration ของแคลลัสชนิด compact และ friable ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3, KSX 2301, KTX 3101 และ Ki7 ที่ชักนำจากอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. 49

3.8 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อใช้คัพภะขนาดต่าง ๆ กัน บนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. 51

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

3.9 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อใช้ตัพภะขนาด 1.5 มม. 52

3.10 แสดงการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เลี้ยงในที่มืดและในที่มีแสง บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. 54

3.11 แสดงการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตรต่าง ๆ 57

3.12 แสดง % plant regeneration ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่ความเข้มแสง 0, 2,000 และ 4,000 ลักซ์ 60

3.13 เปรียบเทียบ % plant regeneration และจำนวนยอดของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25, 0.5 และ 1.0 ซม. บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน 66

3.14 แสดง % plant regeneration ของเนื้อเยื่อชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน 70

3.15 แสดงการเจริญของเนื้อเยื่อชนิด compact และ friable ที่แยกได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน 75

3.16 แสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเหลวสูตร N_6 และ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{o}C 76

3.17 แสดงปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ NS8 ซึ่งต้านทานต่อเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ 91

3.18 แสดงลักษณะต่าง ๆ ของต้นข้าวโพดที่ชักนำจากแคลลัสสายพันธุ์ NS8 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์อายุ 30 วัน 92

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1.1 วิถีการสังเคราะห์ของกรดอะมิโนที่อยู่ในวิถีร่วมของกรดแอสปาติก (aspartate family) 7

2.1 การเตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อแยกคัพภะแก่โดยแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 19

2.2 การเตรียมผักอ่อนข้าวโพดเพื่อแยกคัพภะอ่อนโดยตัดส่วนปลายของเมล็ดออกประมาณ 1-2 มม. 19

3.1 ลักษณะของเมล็ดข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 (A) และ KTX 3101 (B) 34

3.2 ภาพตัดขวางของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด 34

3.3 ลักษณะของคัพภะอ่อนซึ่งประกอบไปด้วยต้านที่เป็น embryonic axis (A) และ scutellar node region (B)..... 37

3.4 ลักษณะแคลลัสจากส่วน scutellum ของคัพภะอ่อนของสายพันธุ์สุวรรณ 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 37

3.5 ลักษณะแคลลัสจากคัพภะแก่ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 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 40

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 40

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. 46

3.8 ลักษณะของแคลลัสชนิด compact ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

casein hydrolysate 200 มก./ล. 46

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 .. 47

3.10 ลักษณะการเกิดรากของแคลลัสชนิด friable ที่ชักนำจากคัพภะแก่บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน 47

3.11 ลักษณะการเกิดจุดเขียว และ รงควัตถุสีม่วง ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 มก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 4,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 55

3.12 กราฟแสดงการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./.ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./.ล. 58

3.13 ลักษณะการพัฒนาของจุดเขียว และ ราก จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์ 61

3.14 ลักษณะของ somatic embryo (SE) ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์ 61

3.15 ลักษณะของโครงสร้างคล้ายใบที่พัฒนาจาก somatic embryo ในอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์ 62

3.16 ลักษณะของยอดที่พัฒนาจาก somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ 62

3.17 ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 62

3.18 ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 63

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

3.19 แสดงการเชื่อมต่อของรากและลำต้นอย่างสมบูรณ์ของต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน 63

3.20 การเพาะเลี้ยงต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนภาชนะที่บรรจุ vermiculite 63

3.21 ลักษณะของต้นข้าวโพดที่ชักนำจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D เมื่อให้แสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ (A) และ 4,000 ลักซ์ (B) อายุ 4 สัปดาห์ 64

3.22 การพัฒนาของใบจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน อายุ 4 สัปดาห์ 67

3.23 กราฟแสดง % plant regeneration ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 6, 12, 16 และ 18 เดือน 68

3.24 กราฟแสดงอัตราการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เป็นเวลา 6, 12, 16 และ 18 เดือน 71

3.25 ลักษณะของเนื้อเยื่อชนิด compact ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงประมาณ 1 ปี บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด 72

3.26 ลักษณะของเนื้อเยื่อชนิด friable ของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงประมาณ 1 ปี บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด 72

3.27 ลักษณะของเนื้อเยื่อชนิด compact (C) และ friable (F) ที่เกิดร่วมกันอยู่บนเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงประมาณ 1 ปี .. 73

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

3.28 ลักษณะเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 0.69 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 77

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 อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 79

3.30 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์แขวนลอยสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารเหลวสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ 2 มก./ล. L-proline 0.69 ก/ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ 80

3.31 ลักษณะของกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กกว่า 500 ไมโครเมตร ที่กระจายบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 81

3.32 ลักษณะของแคลลัสที่เจริญจากเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 ไมโครเมตร บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 81

3.33 ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากแคลลัสที่เจริญจากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์ 83

3.34 กราฟการเจริญของเชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph ในอาหารสูตร David minimum medium ที่มีเมทไธโอนีนความเข้มข้นต่าง ๆ เลี้ยงบน rotary shaker เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 ^{0}C 85

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

3.35 กราฟมาตรฐานระหว่างเมทไธโอนีนบริสุทธิ์กับค่าสัมประสิทธิ์การเจริญของเชื้อ E. coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph บนอาหารสูตร David minimum medium เลี้ยงบน rotary shaker เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 ^{O}C 86

3.36 แสดงอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 เมื่อใช้แคลลัสน้ำหนักประมาณ 50 มก. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{O}C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 87

3.37 แสดงอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของแคลลัสสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ NS8 เมื่อใช้แคลลัสน้ำหนักประมาณ 30 มก. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ^{O}C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 90

3.38 แสดงลักษณะของต้นที่มีลักษณะปกติ, ต้นที่มีลักษณะแคระแกรน, ยอดและราก ที่มีรงควัตถุสีม่วง ซึ่งชักนำจากแคลลัสสายพันธุ์ NS8 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ให้แสง 4,000 ลักซ์ อายุ 30 วัน..... 94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

ก.	=	กรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ล.	=	ลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซนติเมตร
gFWT	=	กรัมน้ำหนักสด
gDWT	=	กรัมน้ำหนักแห้ง
nmole	=	นาโนโมล
pmole	=	พิโคโมล
NAA	=	1-naphthalene acetic acid
2,4-D	=	2,4 dichlorophenoxyacetic acid
IAA	=	indole acetic acid
MS	=	Murashige and Skoog
BAP	=	Bensyl amino purine

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย