การเกิดต้นจากส่วนแคลลัสและเซลล์ไร้ผนังของถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.)

นายพงศ์ยุทธ นาลบุญเรือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-696-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018206 I15206543

PLANT REGENERATION FROM CALLUS AND PROTOPLAST OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merr.)

Mr. Phongyuth Nualbunruang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1992

ISBN 974-581-696-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเกิดต้นจากส่วนแคลลัสและเซลล์ใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.)
โดย	นาย พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา บุณณพยัคฆ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง : การเกิดต้นจากส่วนแคลลัสและเซลล์ไร้ผนังของถั่วเหลือง (Glycine max (L.) Merr.) (PLANT REGENERATION FROM CALLUS AND PROTOPLAST OF SOYBEAN (Glycine max (L.) Merr.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สัณห์ พณิชยกุล, ผศ.ดร.วันชัย ดีเอกนามกุล, 187 หน้า. ISBN 974-581-696-5

ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการกลับคืนเป็นต้น (regeneration) ของแคลลัสใบคู่แรก และไฮโปคอทิลของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบคู่แรก คือ ทำการเลี้ยงบนอาหาร B5 เสริมด้วย BA 1-3 มก./ล., NAA 0.10-0.20 มก./ล. และ NH_4NO_3 1,650 มก./ล. อาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดการกลับคืนเป็นต้นคือสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล., NAA 0.15 มก./ล., NH_4NO_3 1,650 มก./ล. และ B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. และ NH_4NO_3 1,650 มก./ล. ไฮโปคอทิลส่วนที่ต่ำกว่าข้อใบเลี้ยง 2 มม. เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากไฮโปคอทิล คือ อาหาร RV-5 เสริมด้วย IAA 0.1-0.4 มก./ล. และ BA 0.5-3 มก./ล. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นคือ สูตร RV-5เสริมด้วย BA 0.5 มก./ล. และ IAA 0.2 มก./ล.

ในการเตรียมโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์เพาะเลี้ยงถั่วเหลืองพบว่าแคลลัสแบบ friable ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D และ BA เท่านั้นที่สามารถใช้เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์ได้ สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์จากแคลลัสคือ ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5% แมนนิทอล 11 และ 13% pH 5.6 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง และอายุของเซลล์อยู่ในช่วง log phase การเติม $CaCl_2$ 10 mM จะช่วยเพิ่มผลผลิตของโปรโตพลาสต์ ส่วนในการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์คือ ความเข้มข้นเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:05% แมนนิทอล 10% pH 5.2 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง อายุของเซลล์อยู่ในช่วง log phase

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน และ K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล., BA 0.5 มก./ล., NAA 1 มก./ล. และ zeatin 4 มก./ล. จะสามารถเกิดผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ได้ 2 เซลล์

สำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มีอายุ 12-15 เดือนในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ 2,4-D 2 มก./ล. ให้เกิด regeneration นั้น พบว่า อาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. สามารถชักนำทำให้เกิด regeneration ได้

พอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C126076 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : PLANT REGENERATION, PROTOPLAST, SOYBEAN
PHONGYUTH NUALBUNRUANG : PLANT REGENERATION FROM CALLUS AND PROTOPLAST OF SOYBEAN (Glycine max (L.) Merr.) THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D., ASSI. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. 187 pp. ISBN 974-581-696-5

The procedures for plant regeneration from primary leaf and hypocotyl callus of soybean (Glycine max) cv. SJ4 were developed. The conditions for callus induction from the primary leaf were on B5 medium supplemented with 1-3 mg/l BA, 0.10-0.20 mg/l NAA and 1,650 mg/l NH_4NO_3. The optimum medium for regenerating primary leaf callus were B5 medium supplemented with 1 mg/l BA, 0.15 mg/l NAA, 1,650 mg/l NH_4NO_3 and the same medium with 2 mg/l BA, 0.15 mg/l NAA and 1,650 mg/l NH_4NO_3. For the hypocotyl, a piece located 2 mm lower from the cotyledonary node can be regenerated. The condition for callus induction from hypocotyl were on RV-5 medium supplemented with 0.1-0.4 mg/l IAA and 0.5-3 mg/l BA. The appropriate medium for regenerating hypocotyl callus was RV-5 medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.2 mg/l IAA.

For the protoplasts isolation from callus, only friable callus which was cultured on B5 medium under the presence of 2,4-D and BA can be used as a source. The optimum conditions for protoplasts isolation from callus were demonstrated by using 4% Cellulase R10, 0.5% Macerozyme R10 in 11 and 13% mannitol at pH 5.6. Appropriate incubation time was found at 2 hour in the dark on the rotary shaker at 100 rpm. The addition of 10 mM $CaCl_2$ increased the yield of protoplasts. Three percents Cellulase R10 and 0.5% Macerozyme in 10% mannitol at pH 5.2 were found to be the proper combination for the isolation of protoplasts from intact cells growing in liquid culture. BA and 2,4-D were proved to be essential components for the cell lines used in protoplasts isolation.

The purified protoplasts obtained were cultured in K8P liquid medium free hormone and K8P liquid medium containing various combination of 2,4-D, BA, NAA and zeatin. The condition for regenerating cell wall was studied and illustrated. Cells regenerating from protoplast started to divide in four days after cultivated in the proper conditions.

Callus cultivated for over 12-15 months on the established medium supplemented with 2,4-D and BA can be regenerated in B5 medium supplemented with 0.15 mg/l NAA and 1 mg/l BA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย ตีเอกนามกุล ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ความรักและกำลังใจ ตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา บุณณพยัคฆ์ ที่ได้ให้ความกรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาทพร สมิตะมาน สำหรับความรู้ ตลอดจนคำแนะนำอันมีค่า

ขอขอบคุณ คุณเกวลิน สินสุวรรณ สำหรับความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนเทคนิคต่างๆ ทางด้านโปรโตพลาสต์ คุณอำพล เพื่องแก้ว คุณภูษิต โชติชนะ คุณเกื้อกูล บุญญานุภาพพงศ์ และ คุณดำรง เวฬุวัสน์ สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง คุณสมพร ประเสริฐสงสกุล สำหรับความช่วยเหลือด้านงานวิจัย คุณจิรนันท์ ราชแสนเมือง สำหรับความอนุเคราะห์ในการทำกราฟต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีและเจ้าหน้าที่ ที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านความช่วยเหลือ สารเคมี เครื่องมือและสถานที่ ในระหว่างทำวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้องๆ ในภาควิชาชีวเคมี และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และเพื่อนในกลุ่มอดีตหอ 5 ทุกคน สำหรับความรัก มิตรภาพ กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือ ที่มีให้ตลอดมา

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณลุง คุณแม่ คุณป้า คุณตา คุณยาย และครอบครัวนวลบุญเรืองทุกคน สำหรับความรัก ความอบอุ่น กำลังใจ และความช่วยเหลือ ที่มีให้ต่อผู้เขียนตลอดมา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... น

สารบัญรูป ..... ค

คำย่อ ..... ผ

บทที่

1 บทนำ 1

2 วิธีทดลอง 17

2.1 ครุภัณฑ์ 17

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์ 18

2.2.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง 18

2.2.2 สารเคมี 18

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์ 19

2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 19

2.5 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลว 19

2.6 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนใบคู่แรก 19

2.6.1 การเตรียมและฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อ 19

2.6.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากอาหารที่มีรายงายสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสและออร์แกโนเจเนซิส 20

หน้า

2.6.3 การชักนำการเกิดแคลลัสและต้นในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. 22
2.6.4 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหารที่เสริมด้วยแอมโมเนียมไนเตรต 23
2.6.5 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสและการเกิดต้น 23
2.6.6 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหาร B5สูตรดัดแปลง 24
2.7 การเกิดแคลลัสและการกลับคืนเป็นต้นจากส่วนไฮโปคอทิล 24
2.7.1 การเตรียมเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอทิลให้อยู่ในสภาพปลอดภัย 24
2.7.2 การเกิดแคลลัสและการเกิดต้นจากส่วนไฮโปคอทิลและอีพิคอทิล 24
2.7.3 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนไฮโปคอทิล..... 25
2.7.4 การใช้อาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากไฮโปคอทิลไปใช้ชักนำให้เกิดต้นในเนื้อเยื่อใบคู่แรก 25
2.8 การชักนำให้เกิดรากจากยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 26
2.9 การเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่เกิดขึ้นจากการกลับคืนเป็นต้นจากแคลลัส 26
2.10 การแยกโปรโตพลาสต์ 26

หน้า

2.10.1 การเตรียมเอนไซม์สำหรับแยกโปรโตพลาสต์ 27
2.10.2 สภาวะที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ 27
2.10.3 การนับปริมาณโปรโตพลาสต์ 27
2.10.4 การหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
ของโปรโตพลาสต์ 28
2.10.5 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ใบเลี้ยง
และไฮโปคอทิล 28
2.10.6 การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส 29
2.10.6.1 การศึกษาชนิดของแคลลัสที่เหมาะสมในการ
แยกโปรโตพลาสต์ 29
2.10.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์
มาเซโรไซม์ที่พอเหมาะในการแยกแคลลัส
ให้เป็นเซลล์เดี่ยว 29
2.10.6.3 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์
ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 30
2.10.6.4 การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแคลลัสกับ
ปริมาณของสารละลายเอนไซม์
ที่เหมาะสม 30
2.10.6.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยก
โปรโตพลาสต์ 30
2.10.6.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ
แมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์..... 31

หน้า

2.10.6.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 31

2.10.6.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์ 31

2.10.6.9 การศึกษาผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์ 32

2.10.7 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย 32

2.10.7.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอยเพื่อใช้แยกโปรโตพลาสต์.....32

2.10.7.2 การศึกษาอัตราส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย 33

2.10.7.3 การศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นของถั่วเหลืองในการแยกโปรโตพลาสต์ 33

2.10.7.4 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 34

2.10.7.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย 34

2.10.7.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย 34

2.10.7.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

โปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย 34
2.10.7.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพการแยกโปรโตพลาสต์.... 35
2.10.7.9 การศึกษาผลของระยะเวลาการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์..... 35
2.10.8 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 35
2.10.8.1 การทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ 35
2.10.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 36
2.10.8.3 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่แปรผัน zeatin 36
2.11 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ 37
3 ผลการทดลอง 38
3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนใบคู่แรก 38
3.1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากอาหารสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสและออร์แกโนเจเนซิส 38
3.1.2 การศึกษาการเกิดแคลลัสและต้นในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. 44
3.1.3 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหารที่เสริมด้วย

หน้า

แอมโมเนียมไนเตรต 44
3.1.4 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากไฮโปคอทิล 47
3.1.5 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหาร B5 สูตรดัดแปลง 48
3.2 การเกิดแคลลัสและการกลับคืนเป็นต้นจากไฮโปคอทิล 56
3.2.1 การเกิดแคลลัสและต้นจากส่วนไฮโปคอทิลและอีพิคอทิล 56
3.2.2 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากไฮโปคอทิล 64
3.2.3 การใช้อาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากไฮโปคอทิลไปชักนำให้เกิดต้นในเนื้อเยื่อใบคู่แรก ..64
3.3 การชักนำให้เกิดรากจากยอดที่เกิดขึ้น 76
3.4 การเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่เกิดขึ้นจากการกลับคืนเป็นต้นจากแคลลัส 76
3.5 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ใบเลี้ยง และไฮโปคอทิล ... 79
3.6 การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส 81
3.6:1 การศึกษาแคลลัสที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์.....81
3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอเรไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 85
3.6.3 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 85

หน้า

3.6.4 การศึกษาอัตราส่วนปริมาณแคลลัสกับปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 91
3.6.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ .91
3.6.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์ 91
3.6.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ .95
3.6.8 การเติมศึกษาผลกระทบของเกลือแร่ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ 97
3.6.9 ผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์.....97
3.7 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย 99
3.7.1 การหาอาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอย 99
3.7.2 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย .99
3.7.3 การศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นของถั่วเหลืองในการแยกโปรโตพลาสต์ 104
3.7.4 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 104
3.7.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ 109
3.7.6 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์ 109
3.7.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

จากเซลล์แขวนลอย 109
3.7.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ 109
3.7.9 ผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์ 113
3.8 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 113
3.8.1 การทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ 113
3.8.2 การหาความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ 117
3.8.3 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P แปรผัน zeatin 117
3.9 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์.....122
3.10การตรวจพบเซลล์ท่อลำเลียงในการเพาะเลี้ยงแคลลัส.....122
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 128
บรรณานุกรม 150
ภาคผนวก
1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog 161
2 สูตรอาหาร Gamborg B5 medium 162
3 สูตรอาหาร RV-5.....163
4 สูตรอาหาร K8P medium 164
5 การเตรียม stock MS 165
6 การเตรียม stock B5 166

หน้า

7 สูตรของสารละลาย CPW ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ 168
8 การเตรียม fluorescein diacetate 168
9 การเตรียมสี fluorescent bitener 169
10 การคำนวณหาปริมาณโปรโตพลาสต์โดยใช้ haemacytometer.....170
11 ตารางแสดงน้ำหนักของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. ในแต่ละสัปดาห์.....171
12 ตารางแสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่ความเข้มของเซลลูเลสและมาเซโรไซม์ต่างๆ กัน 172
13 ตารางแสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส เมื่อใช้แคลลัสน้ำหนักต่างๆ กัน 173
14 ตารางแสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส ที่เวลาต่างๆ กัน.174
15 ตารางแสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส ที่ความเข้มข้นของแมนนิทอลต่างๆ กัน 175
16 ตารางแสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส ที่ pH ต่างๆ กัน.176
17 ตารางแสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส เมื่อเติมเกลือแร่และบัฟเฟอร์ 177
18 ตารางแสดงน้ำหนักของเซลล์แขวนลอย ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในแต่ละสัปดาห์ 178
19 ตารางแสดงจำนวนของเซลล์แขวนลอยที่ถูกแยกด้วยมาเซโรไซม์ 1 %. 179
20 ตารางแสดงจำนวนของเซลล์ของแคลลัสที่ถูกแยกด้วยมาเซโรไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 179
21 ตารางแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ กัน 180

หน้า

22 ตารางแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอย ที่เวลาต่างๆ กัน 181
23 ตารางแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอย ที่ pH ต่างๆ กัน 182
24 ตารางแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอย ที่ความเข้มข้นของแมนนิทอล ต่างๆ กัน 183
25 ตารางแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอย เมื่อเติมเกลือแร่และบัฟเฟอร์ 184
26 ตารางแสดงน้ำหนักแคลลัสและปริมาณโปรโตพลาสต์ที่สัปดาห์ต่างๆ กัน. 185
27 ตารางแสดงน้ำหนักเซลล์แขวนลอยและปริมาณโปรโตพลาสต์ที่สัปดาห์ต่างๆ กัน 186
ประวัติผู้เขียน 187

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 การพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงไปเป็นเอมบริออยด์ ในกระบวนการเอมบริโอเจเนซิส 5

2 การเพาะเมล็ดถั่วเหลืองในหลอดทดลอง โดยเพาะใน water agar ที่อายุประมาณ 10 วัน 21

3 ลักษณะการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงใน water agar ที่อายุประมาณ7 วัน สังเกตการพัฒนาของใบคู่แรกและไฮโปคอทิล 39

4 แสดงการเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกถั่วเหลืองในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. 42

5 แสดงการเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกถั่วเหลืองในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. 43

6 กราฟแสดงการเจริญของแคลลัสใบคู่แรกของถั่วเหลือง ที่เลี้ยงในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. 45

7 ลักษณะแคลลัสใบคู่แรกที่เกิดขึ้นในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.10, 0.15, และ0.20 มก./ล. 51

8 ลักษณะแคลลัสใบคู่แรกที่เกิดขึ้นในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1,2,และ 4 มก./ล. 52

9 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นต้นในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. 53

10 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นต้นในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล.และ NAA 0.15 มก./ล. 54

11 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นรากในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 3-4 มก./ล. และ NAA 0.15-0.20มก./ล. . 55

หน้า

12 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. 59

13 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกที่เป็นรากในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. 61

14 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล.และ NAA 0.15 มก./ล. 62

15 การเกิด regeneration ของแคลลัสใบคู่แรกในอาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. 63

16 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิล ที่เป็นเอมบริออยด์ ในระยะ heart-stage ในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. 68

17 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย NAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. 70

18 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. 72

19 การเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิลในอาหาร RV-5 ที่เสริมด้วย IAA 0.1-0.3 มก./ล. และ BA 0.5-1 มก./ล. 75

20 การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเกิด regeneration ของแคลลัสไฮโปคอทิล ในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย IBA 5 มก./ล.... 78

21 การเพาะเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่เป็นต้นสมบูรณ์ ที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นของแคลลัสใบคู่แรก ในขวดที่บรรจุ vermiculite 80

22 เซลล์เดี่ยวๆที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์ของใบ 82

23 ลักษณะของเซลล์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงของถั่วเหลือง 83

หน้า

24 ลักษณะของแคลลัสใบคู่แรกแบบ friable กับแคลลัสแบบ compact.. 84
25 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส 87
26 แสดงการย้อมโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสถั่วเหลือง ด้วย fluorescent bitener 88
27 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 89
28 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัส จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 90
29 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสที่แยกได้จากแคลลัส จากการแปรผันปริมาณแคลลัส 92
30 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่เวลาต่างๆกัน .. 93
31 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่ความเข้มข้นแมนนิทอลต่างๆกัน 94
32 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสที่ pH ต่างๆกัน... 96
33 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแคลลัสเมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM 97
34 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความมีชีวิต เมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM 98
35 ผลกระทบของระยะการเจริญของแคลลัสถั่วเหลืองต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์ 100
36 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล 101

หน้า

37 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล.และ BA 1 มก./ล.....102

38 ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ ล.และ BA 2 มก./ล.....103

39 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ ล. และ BA 2 มก./ล.....105

40 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลือง.....106

41 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอย จากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์.....107

42 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จาก เซลล์แขวนลอยจากการแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์108

43 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยที่ เวลาต่างๆกัน.....110

44 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยที่ ความเข้มข้นของแมนนิทอลต่างๆกัน.....111

45 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยที่ pH ต่างๆกัน.....112

46 กราฟแสดงปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยเมื่อทำการ เติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM 114

47 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความมีชีวิต เมื่อทำการเติม $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM 115

48 ผลกระทบของระยะการเจริญของเซลล์แขวนลอยถั่วเหลืองต่อผลผลิต โปรโตพลาสต์.....116

หน้า

49 การทำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสถั่วเหลือง 118

50 การทำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์แขวนลอยถั่วเหลืองให้บริสุทธิ์ 119

51 การแบ่งเซลล์โปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหาร K8P ที่ไม่ได้เสริมด้วยฮอร์โมนและแมนนิทอล 121

52 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองในอาหาร K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล. BA มก./ล. NAA 1 มก./ล. และ zeatin 4 มก./ล. 124

53 ลักษณะของเซลล์ท่อลำเลียง (vessel member) ที่เกิดขึ้นในแคลลัส .127

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ผลผลิต ความต้องการ และการใช้ประโยชน์ของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมต่างๆ 2

2 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสและลักษณะแคลลัสในอาหาร 6 สูตร 39

3 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล 40

4 แสดงน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล 44

5 แสดงน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล.และ NH_4NO_3 47

6 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสในอาหาร B5 ที่มีอัตราส่วนของ BA และ NAA ต่างๆกัน 49

7 แสดงจำนวนแคลลัสที่เกิด regenerationในอาหาร B5 ที่มีอัตราส่วนของ BA และ NAA ต่างๆกัน 52

8 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสและลักษณะแคลลัส และจำนวนแคลลัสที่เกิด regeneration 56

9 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร CS23 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล 57

10 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล 59

11 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของส่วนไฮโปคอทิลที่ 2,4,6 มม. และส่วนอีพิคอทิลในอาหาร RV-5 3 สูตร 63

หน้า

12 แสดงจำนวนแคลลัสของส่วนไฮโปคอทิลที่เกิด regeneration และเปอร์เซนต์ regeneration ในอาหาร RV-5 3 สูตร..... 64

13 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร RV-5 เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล..... 65

14 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร RV-5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล..... 67

15 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีการเกิด regeneration ในอาหาร RV-5 เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล..... 69

16 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสในอาหาร RV-5 ที่มีอัตราส่วนของ IAA และ BA ต่างๆกัน..... 72

17 แสดงจำนวนแคลลัสที่เกิด regenerationในอาหาร RV-5 ที่มีอัตราส่วนของ IAA และ BA ต่างๆกัน..... 73

18 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อใบคู่แรกในอาหาร RV-5 ที่มีอัตราส่วนของ BA และ NAA ต่างๆกัน..... 76

19 แสดงปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นเมื่อถูกย่อยด้วยมาเซเรไรซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง..... 87

20 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่อัตราส่วนของเซลลูเลสและมาเซโรไซม์ต่างๆกัน..... 88

21 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่ปริมาณแคลลัสต่างกันต่อเอนไซม์ 3 มล..... 91

22 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่เวลาต่างๆ..... 93

23 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่ความเข้มข้นของแมนนิทอลต่างๆ.. 95

24 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่ pH ต่างๆ..... 98

หน้า

25 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่เมื่อเติมสารบางชนิดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 100

26 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัสและปริมาณโปรโตพลาสต์ที่อายุต่างๆ ... 102

27 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่อัตราส่วนของเซลลูเลสและมาเซโรไซม์ต่างๆกัน 111

28 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่เวลาต่างๆ 113

29 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่ความเข้มข้นของแมนนิทอลต่างๆ .. 115

30 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่ pH ต่างๆ 118

31 แสดงปริมาณโปรโตพลาสต์เฉลี่ยที่เมื่อเติมสารบางชนิดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 120

32 แสดงน้ำหนักแห้งของแคลลัสและปริมาณโปรโตพลาสต์ที่อายุต่างๆ ... 123

33 แสดงเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ สร้างผนังเซลล์ และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ในอาหาร K8P ที่ความเข้มข้นของแมนนิทอลต่างๆกัน 128

34 แสดงเปอร์เซนต์การแบ่งเซลล์ สร้างผนังเซลล์ และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ในอาหาร K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล. BA 0.5 มก./ล. NAA 1 มก./ล. และแปรผันความเข้มข้นของ zeatin 130

35 แสดงปริมาณแคลลัสที่เกิดออร์แกโนเจเนซิสและเปอร์เซนต์ regeneration ในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย BA และ NAA ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน 134

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

มก./ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร
^{0}C	=	องศาเซลเซียส
MS	=	Murashige and Skoog
B5	=	Gamborg
NAA	=	naphthalene acetic acid
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
IAA	=	indole acetic acid
IBA	=	indole butyric acid
MCPA	=	2-metyl-4-chlorophenoxy acetic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย