

การพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจากโปรโตพลาของพืชตระกูลกะหล่ำ ในสภาพ *in-vitro*

In-vitro Plant Regeneration from Protoplast in *Brassica* Family

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์

Ariyaporn Pongrat

ABSTRACT

Nine species of *Brassica* family were studied for the genetic control of *in vitro* regenerability from protoplast. In *Brassica* family, the protoplast culture should be kept in the dark after the protoplast isolation for the first three days to reduce the phenols as they affected cell division and growth of cells during the culture. The callus formation did not depend on the genotype since the protoplasts of all examined species showed a high microcallus and callus formation in V-KM and on MS-media, respectively. The protoplast regeneration of *Brassicaceae* was strongly dependent on the genotype. The examined species with the A-genome, namely *Brassica campestris* (AA), *B. juncea* (AABB) and *B. napus* (AACC) showed low capability of regeneration. Probably, the A-genome has an inhibitory effect on the regeneration in *Brassica* species. The genomes of *B. nigra* (BB) and *B. oleracea* (CC) had high frequency of protoplast regeneration. Their interaction enhanced the ability to regenerate since *B. carinata* (BBCC) showed the best regenerability from protoplasts. Moreover, *Erucia sativa*, *Raphanus sativus* and *Sinapis alba* could not form shoot from protoplasts.

Key words : *Brassicaceae*, *Erucia sativa*, protoplast regeneration, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาพันธุ์กรรมที่ควบคุมความ
สามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน (regeneration)

จากโปรโตพลาสของพืชตระกูลกะหล่ำ 9 ชนิด (species)
พบว่า ควรเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสของพืชตระกูลนี้
ในที่มืดนาน 3 วันหลังจากการแยกโปรโตพลาสเพื่อ
เป็นการลดปริมาณสารพิษ (toxic substance) เช่น phenol

ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง สำหรับการเจริญของเซลล์ไปเป็นแคลลัสไม่ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมเนื่องจากโปรโตพลาสของพืชที่ศึกษาทุกชนิดสามารถเจริญไปเป็นไมโครแคลลัสและแคลลัสได้ดีทั้งในอาหารสูตร V-KM และ MS ส่วนการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสนั้นถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม โดยจีโนม A มีอิทธิพลไปยังการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาสเนื่องจากแคลลัสของ *Brassica campestris* (AA), *B. juncea* (AABB) และ *B. napus* (AACC) ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ในอาหารที่ศึกษาทุกชนิด ในขณะที่จีโนม B ของ *B. nigra* (BB) และจีโนม C ของ *B. oleracea* (CC) มีอิทธิพลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาสได้ดี และจีโนมอาจมีปฏิริยาสัมพันธ์กันทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจาก *B. carinata* (BBCC) สามารถพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสได้ดีที่สุด ส่วน *Erucia sativa*, *Raphanus sativus* และ *Sinapis alba* ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอาหารที่ศึกษาทุกชนิด

คำนำ

ในปัจจุบันพืชตระกูลกะหล่ำ (*Brassica*) มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ทั้งการบริโภคในรูปของผักสด หรือนำมาปรุงอาหาร เช่น *B. oleracea* (เช่น กะหล่ำ กะหล่ำปลี กะหล่ำปลม) *B. campestris* (หัวเทอร์นิป) *Raphanus sativus* (แรดดิช) และ *B. juncea* (มัสตาร์ด) *Erucia sativa* (มัสตาร์ด) และ *Sinapis alba* (มัสตาร์ดชนิดสีขาว, ดำและเหลือง) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมของการผลิตสี น้ำมันหล่อลื่น และผงซักฟอก เช่น *B. napus* *B. campestris* และ *B. carinata* เป็นต้น

ในการเร่งระยะเวลาการพัฒนาความก้าวหน้า

ของการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลกะหล่ำ ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ เช่น การถ่ายยีน การสร้างสายพันธุ์เป็นหมัน การสร้างสายพันธุ์แท้จาก haploid ซึ่งเรียกว่า dihaploid (DH) เพื่อใช้ในการสร้างลูกผสม (hybrid) การคัดเลือกสายพันธุ์ให้ทนทานต่อโรคแมลงและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเฉพาะจากส่วนของโปรโตพลาส เป็นปัจจัยหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจไปได้ของเทคนิคการถ่ายยีนเท่านั้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส ได้แก่ พันธุกรรม ส่วนของพืชที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาส และเทคนิคการเลี้ยงโปรโตพลาส

Koornneef *et al.* (1987) พบว่า ความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาสของมะเขือเทศถูกควบคุมโดยยีน 2 ตัว ส่วนใน *B. campestris* (AA-genome) และ *B. napus* (AACC-genome) เป็น species ที่มีความสามารถต่ำมากหรือไม่ปรากฏการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาส (Narasimhulu *et al.*, 1988, Vamling and Glimelius, 1990)

Glimelius (1984) แนะนำว่า ส่วนของพืชที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสควรนำมาจากต้นพืชที่เจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่สม่ำเสมอ และพบว่าพืชตระกูลกะหล่ำจำเป็นจะต้องนำต้นพืชมาทำ pre-treatment ในช่วงสั้น ๆ ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาส (Vamling and Glimelius, 1990) เช่น พืชควรอยู่ในที่มืด 1-2 วัน ก่อนนำไปแยกโปรโตพลาส เพื่อที่จะให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตและแข็งแรงจำนวนมาก นอกจากนี้โปรโตพลาสต์ที่แยกมาจากส่วนของ hypocotyl ของต้นอ่อนที่มีอายุ 4-6 วัน จะมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี (Glimelius, 1984; Narasimhulu *et al.*, 1992) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ส่วนของ hypocotyl จำเป็นจะต้องทำการเพาะเมล็ดใหม่ทุกครั้ง ซึ่งยุ่งยากและทำให้เสียเวลา และอาจพบ

ความไม่คงตัวของพันธุกรรมในกรณีที่พืชนั้นยังไม่เข้าสู่ homozygous

Kao and Michayluk (1975) แนะนำว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสในระยะเริ่มต้นควรมีวิตามิน น้ำตาล กรดอินทรีย์ กรดอะมิโนในปริมาณที่สูง ตลอดจนมีน้ำมะพร้าวอ่อนเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้พืชตระกูลกะหล่ำยังต้องการ 2,4-D ในปริมาณสูงในช่วงระยะต้น ๆ เพื่อการพัฒนาของแคลลัส (Vamling and Glimelius, 1990) ต้องการปริมาณ cytokinin เพิ่มสูงขึ้น และ auxin ลดลงเพื่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (Glimelius, 1984)

การศึกษครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสของพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด และโปรโตพลาสของพืชชนิดใดในตระกูลกะหล่ำสามารถพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสได้ดี เพื่อนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกันแต่อยู่ภายในตระกูลเดียวกัน เช่น เพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมในการถ่ายทอดลักษณะความเป็นหมันจาก *Raphanus sativus* ไปยัง species อื่น ๆ ที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้จากโปรโตพลาส ตลอดจนใช้ใน

การคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทนทานต่อโรค เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ใช้ในการศึกษาขบวนการทางชีวเคมีของพืชอีกด้วย

อุปกรณ์ และวิธีการ

ในการศึกษครั้งนี้ใช้พืชทั้งหมด 9 ชนิด (Table 1) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben; the Norddeutsche Pflanzenzucht (NPZ), Hohenlieth ประเทศเยอรมัน

นำเมล็ดพืชทั้ง 9 ชนิดนี้มาฆ่าเชื้อโดยแช่ใน ethanol 70% (V/V) นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ที่มีความเข้มข้น 5% นานประมาณ 10-15 นาที และนำไปล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ได้ไปเพาะบนอาหารแข็งชนิด B5 (Gamborg *et al.*, 1968) ที่เติมวุ้น 8% แล้วนำต้นอ่อนที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เพื่อเพิ่มจำนวนต้นสำหรับการศึกษาดต่อไป

Table 1 List of the plants which were used in this study. (Data taken from Prakash and Chopra, 1991)

Species	Chromosome number	Genome code	Reference
<i>Brassica campestris</i> L.	20	AA	Morinaga, 1934
<i>B. nigra</i> (L.) Kock	16	BB	Morinaga, 1934
<i>B. oleracea</i> L.	18	CC	Morinaga, 1934
<i>B. juncea</i> (L.) Czern	36	AABB	Morinaga, 1934
<i>B. napus</i> L.	38	AACC	Morinaga, 1934
<i>B. carinata</i> A.Br	34	BBCC	Morinaga, 1934
<i>Erucia sativa</i> Mill.	22	-	-
<i>Raphanus sativus</i> L.	18	RR	Sageret, 1926
<i>Sinapis alba</i> L.	24	-	-

การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาส : นำปลายยอดของพืชที่ปลูกในสภาพปลอดเชื้อมาจำนวน 4-6 ยอด มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 0.5-1.0 มม. และบ่มในสารละลายเอ็นไซม์ปริมาตร 12 มล. ซึ่งประกอบด้วย Rohament PC 3% sorbitol 0.5 M และ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5 mM นาน 7-8 ชม. ในที่มีอุณหภูมิ 25°C หลังจากนั้นนำมาแยกโปรโตพลาสออกจากสารละลายเอ็นไซม์โดยการกรองผ่านตะแกรงลวดชนิด V4A ขนาด 40 ไมโครเมตร แล้วนำไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็ว 800 rpm นาน 5 นาที โปรโตพลาสจะตกตะกอนที่ก้นหลอด

นำโปรโตพลาสที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร V-KM (Binding and Nehls, 1977) โดยนำเอาโปรโตพลาสที่แยกได้มาปรับให้มีความหนาแน่นเป็น 10^5 - 10^6 โปรโตพลาสต่อ 1 มล. แล้วนำสารละลายโปรโตพลาสปริมาตร 10-20 ไมโครลิตรผสมกับอาหาร V-KM ที่ประกอบด้วยวุ้น agarose 2% ที่มีอุณหภูมิ 38-40°C แล้วหยดเป็นหยดเล็ก ๆ ซึ่งเรียกว่า lense ตั้งทิ้งไว้รอจนอาหารแข็งตัว แล้วนำเอาอาหารเหลว V-KM มาเติมจนท่วมส่วนของ lense แล้วนำไปเลี้ยงในตูบที่มีอุณหภูมิ 25°C ให้อยู่ในสภาพมีแสงและไม่มีแสง (เฉพาะ 3 วันแรก) ในสภาพที่มีแสงความเข้มของแสงเท่ากับ $3.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เปลี่ยนอาหารเหลวทุก ๆ 3-4 วัน ต่อมาหลังจากเลี้ยงได้ 7-14 วัน ส่วนของ lenses จะถูกย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติมน้ำมะพร้าว 5% (B5C), MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญโต (MS) และ MS ที่เติม 2-4, D 0.5 μM (MSD) เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อน และในกรณีที่ส่วนของเซลล์ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ภายใน 6 สัปดาห์ ก็จะนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร B5 ที่เติมน้ำมะพร้าว 5% , 0.05 ก./ล. IAA, BAP 1.0 ก./ล. และ zeatin 1.0 ก./ล. (B5CBZI) เพื่อกระตุ้นการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นต่อไป

ผลและวิจารณ์

ผลจากการศึกษา พบว่าโปรโตพลาสของพืชในตระกูลกะหล่ำชนิดต่าง ๆ ที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่สามารถแบ่งเซลล์ครั้งแรกได้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร V-KM ไปนาน 24 ชม. และเซลล์สามารถจะพัฒนาเป็นไมโครแคลลัสซึ่งมีรูปลักษณ์ดาว (star shape) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไปนานประมาณ 10-14 วัน (Figure 1a, 1b) อิทธิพลของแสงในช่วง 3 วันแรกของการเลี้ยงโปรโตพลาสในอาหารเหลวจะมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไปเป็นต้นอ่อน จากการศึกษาพบว่าในสภาพที่มีแสงตลอดในช่วง 3 วันแรก จะพบแผ่นฟิล์มบาง ๆ ลอยอยู่บนผิวของอาหารและทำให้เกิดลักษณะสีน้ำตาลขึ้นที่ไมโครแคลลัส จึงจำเป็นจะต้องเปลี่ยนอาหารเหลวบ่อยครั้งขึ้นซึ่งจะพบเห็นอย่างชัดเจนใน *B. napus* เมื่อนำไปเลี้ยงต่อก็จะพบว่าไมโครแคลลัสของพืชที่ทำการศึกษาทุกชนิดเจริญเป็นแคลลัสได้ แต่แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้บนอาหารที่ทำการทดสอบทุกชนิด (Table 2) ส่วนการเลี้ยงโปรโตพลาสในที่มีด 3 วันแรก แล้วนำมาเลี้ยงต่อในสภาพปกติ พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตดี และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับที่เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงตลอดในช่วง 3 วันแรก และแคลลัสในพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นได้เมื่อนำไปกระตุ้นด้วยฮอร์โมน IAA, BAP และ zeatin (Figure 2, Table 3) ดังนั้นจะเห็นว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสควรจะเลี้ยงในที่มืดนาน 3 วัน หลังจากทำการแยกโปรโตพลาส ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากว่าแสงมีอิทธิพลต่อการผลิตสารพิษของโปรโตพลาสเช่น phenol (Schenck and Hoffmann, 1979) ซึ่งอาจจะไปมีผลต่อ membrane ของโปรโตพลาส (Krens *et al.*, 1990) และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้ความสามารถในการ

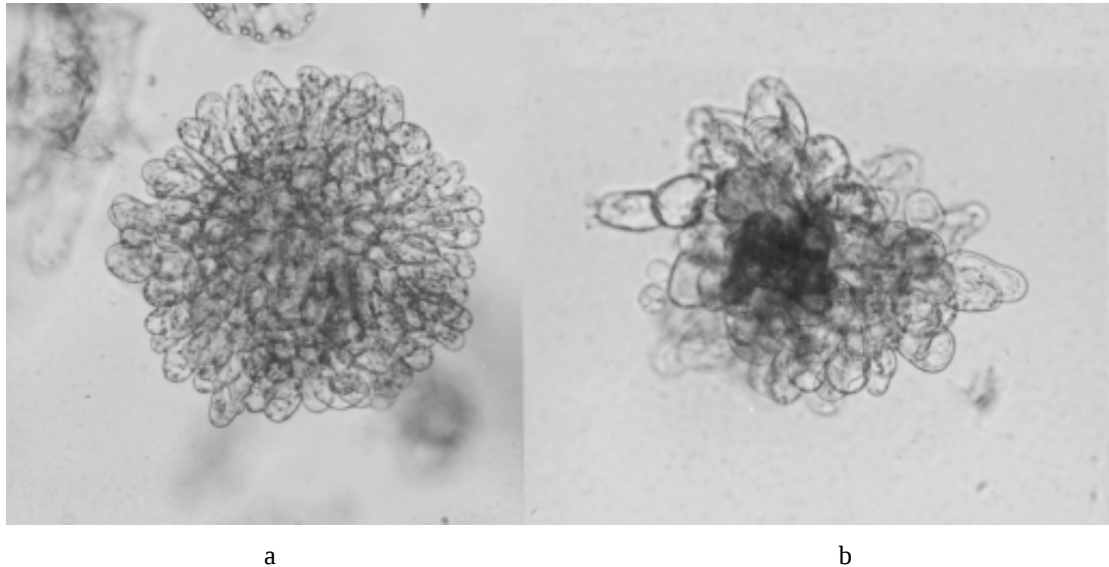


Figure 1 a. Ten days old microcallus derived from protoplast of *B. carinata*. 370X
b. Fourteen days old microcallus with anthocyanin derived from protoplast of *B. carinata*. 370X

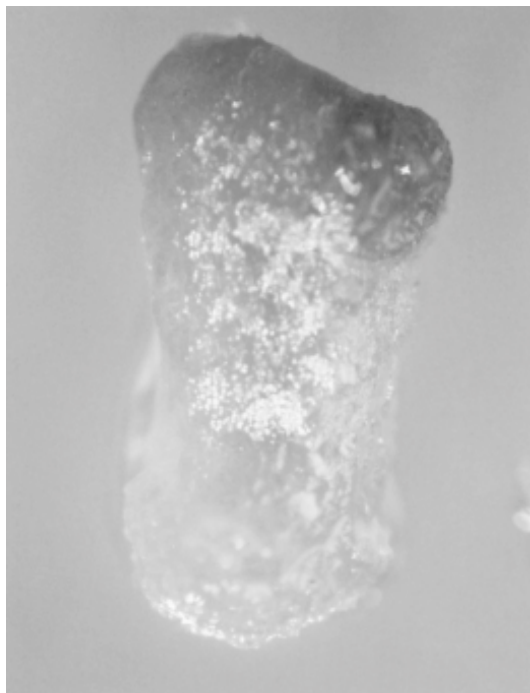


Figure 2 Somatic embryo regenerated from protoplast of *B. carinata*.

พัฒนาไปเป็นต้นสูญเสียไป Narasimhulu *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาพบว่า phenols มีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์พืชชนิด *B. carinata*

การพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจากโปรโตพลาสของพืชตระกูลกะหล่ำนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และอาหารที่ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง จากการศึกษพบว่า *B. carinata* และ *B. nigra* มีความต้องการเพียงอาหาร MS หรือ B5C เท่านั้นเพื่อการเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร V-KM แต่ *B. carinata* มีความสามารถในการพัฒนาจากโปรโตพลาสเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่า คือมีความถี่ของต้นที่เจริญมาจากโปรโตพลาสเท่ากับ 1.0×10^{-4} - 2.1×10^{-2} โดยเซลล์ส่วนใหญ่สามารถเจริญเป็นไมโครแคลลัสที่มีรูปร่าง star shape ภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารสูตร V-KM เพียง 7 วัน และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อนได้หลังจากเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หรือ B5C ประมาณ 7-10 วัน แต่ *B. nigra* จะใช้เวลาในการพัฒนานานกว่าและมีปริมาณ

Table 2 Growth responses from protoplast-derived calli of the *Brassicaceae* on different media under light condition.

Species	Growth responses on different media					
	MS	B5C	MSD	MS	B5C	MSD
				B5CBZI	B5CBZI	B5CBZI
<i>Brassica campestris</i>	C	C	C	C	C	C
<i>B. carinata</i>	C	C	C	C	C	C
<i>B. juncea</i>	C	C	C	C	C	C
<i>B. napus</i>	C	C	C	C	C	C
<i>B. nigra</i>	C	C	C	C	C	C
<i>B. oleracea</i>	C	C	C	C	C	C
<i>Erucia sativa</i>	C	C	C	C	C	C
<i>Raphanus sativus</i>	C	C	C	C	C	C
<i>Sinapis alba</i>	C	C	C	C	C	C

Note: C - callus

Table 3 Growth responses from protoplast-derived calli of the *Brassicaceae* on different media under the dark condition for the first three days culture.

Species	Growth responses on different media					
	MS	B5C	MSD	MS	B5C	MSD
				B5CBZL	B5CBZI	B5CBZI
<i>Brassica campestris</i>	C	C	C	C	C	C
<i>B. carinata</i>	E.S	E,S	C	-	-	C
<i>B. juncea</i>	R	S,R	C	R	-	S,R
<i>B. napus</i>	R	R	R	R	R	R
<i>B. nigra</i>	S	S	C	-	-	R
<i>B. oleracea</i>	C	C	C	C	C	S
<i>Erucia sativa</i>	R	R	R	-	-	-
<i>Raphanus sativus</i>	R	R	C	-	-	C
<i>Sinapis alba</i>	C	C	C	C	C	C

Note: C -callus E -somatic embryos R -root hairs on callus S -shoots - -not tested

ต้นอ่อนน้อยกว่า *B. juncea* และ *B. oleracea* ต้องการฮอร์โมน IAA, BAP และ zeatin สำหรับการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Narasimhulu *et al.* (1988) และ Vamling and Glimelius (1990) ส่วน *B. campestris* และ *B. napus* จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้บนอาหารที่ทำการทดสอบทุกชนิด จากหลักฐานนี้จะชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาสจะขึ้นอยู่กับจีโนมที่มากกว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมการพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสของพืชตระกูลกะหล่ำ พบว่าการเจริญไปเป็นแคลลัสจะไม่ถูกควบคุมโดยพันธุกรรม เนื่องจากว่าโปรโตพลาสจากทุก ๆ พืชที่ศึกษาสามารถพัฒนาเป็นไมโครแคลลัสและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีในอาหารทั้งสูตร V-KM และ MS ส่วนความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นชี้ให้เห็นว่า จีโนม B ของ *B. nigra* (BB) และ จีโนม C ของ *B. oleracea* (CC) มีอิทธิพลต่อลักษณะนี้และปฏิกิริยาสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างทั้ง 2 จีโนมนี้ จะทำให้ความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นนั้นมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก *B. carinata* (BBCC) แสดงผลของการพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสดีที่สุด ส่วนพืชตระกูลกะหล่ำที่มีจีโนม A เป็นองค์ประกอบ เช่น *B. campestris* (AA), *B. juncea* (AABB) และ *B. napus* (AACC) จะไม่แสดงความสามารถการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนเลย ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับคำแนะนำของ Narasimhulu *et al.* (1988) ซึ่งกล่าวว่า จีโนม A จะมีอิทธิพลต่อการยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสในพืชตระกูลกะหล่ำ สำหรับ *Erucia sativa*, *Raphanus sativus* และ *Sinapis alba* ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ในสภาพการเลี้ยงบนอาหารทุกชนิด

สรุป

1. ปัจจัยของแสงจะมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจากโปรโตพลาสของพืชในตระกูลกะหล่ำในช่วง 3 วันแรกหลังจากแยกโปรโตพลาสออกมา
2. การเจริญไปเป็นไมโครแคลลัสและแคลลัสของพืชตระกูลกะหล่ำจะไม่ถูกควบคุมโดยลักษณะทางพันธุกรรม
3. การพัฒนาไปเป็นต้นจากโปรโตพลาสถูกควบคุมด้วยลักษณะพันธุกรรม โดยที่จีโนม A มีอิทธิพลไปยับยั้งการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของพืช จีโนม B และ C ควบคุมการพัฒนาไปเป็นต้นของพืช นอกจากนี้ปฏิกิริยาสัมพันธ์ของทั้ง 2 จีโนมจะส่งเสริมความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของพืชให้ได้ดีขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวพิมลพรรณ มุรุสสิทธ์ ที่พิมพ์เอกสารฉบับนี้มา ณ.ที่ นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Binding, H. and R. Nehls. 1977. Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. Z. Pflanzenphysiol. 85 : 279-280.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Res. 50 : 151-158.
- Glimelius, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. Physiol. Plant. 61: 38-44.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional

- requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density liquid media. *Planta* 126 : 105-110.
- Koornneef, M., C.J. Hanhart, and L. Martinelli. 1987. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 74 : 633-641.
- Krens F.A., D. Jamar, G.J.A. Rouwendal, and R.D. Hall. 1990. Transfer of cytoplasm from new *Beta* CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion : I Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants. *Theor. Appl. Genet.* 79 : 390-396.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Narasimhulu, S.B., P.B. Kirti, S. Prakash, and V.L. Chopra. 1992. Rapid and efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts of *Brassica carinata*. *Plant Cell Rep.* 11: 159-162.
- Narasimhulu, S.B., S. Prakash, and V.L. Chopra. 1988. Comparative shoot regeneration responded of diploid *Brassicas* and their synthetic amphidiploid products. *Plant Cell Rep.* 7: 525-527.
- Prakash, S. and V.L. Chopra. 1991. Cytogenetics of crop *Brassicas* and their allied, pp 161-180. *In* T. Tsuchiya and P.K. Gupta (eds.). *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution Part B*. Elsevier, Oxford.
- Schenck H.R. and F. Hoffmann. 1979. Callus and root regeneration from mesophyll protoplasts of basic *Brassica* species: *B. campestris*, *B. oleracea* and *B. napus*. *Z. Pflanzenzuecht.* 82 : 354-360.
- Vamling, K. and K. Glimelius. 1990. Regeneration of plants from protoplasts of oilseed *Brassica* crops, pp 385-417. *In* Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 10 Legumes and Oilseed Crops*. Springer-Verlag, Berlin.

วันรับเรื่อง : 7 พ.ย. 40
 วันรับตีพิมพ์ : 2 เม.ย. 41