ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.)
ผู้เขียน	นายธีร ศรีสวัสดิ์
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันที่ผ่านการแช่น้ำเป็นเวลา 48 ชม. ในอาหารเหลวสูตร Y3 (Eeuwens, 1978) พบการเจริญเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงคัพภะดังกล่าวในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่มี picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) 8.3 ไมโครโมลาร์ และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสของปาล์มน้ำมันด้วยวิธีโฟลไซโทเมทรี โดยใช้ถั่วเหลือง มะเขือเทศ และข้าวโพด เป็นพืชอ้างอิง พบว่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 4.18±0.04 3.97±0.09 และ 4.34±0.03 พิโคแกรม ตามลำดับ สารพันธุกรรมจากคัพภะ แคลลัส เซลล์แขวนลอย และต้นกล้าของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอร่า (T38) ที่แยกออกมาจะถูกย้อมด้วย propidium iodide ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ แคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 1 ปี มีปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้าจากแหล่งเดียวกัน ในขณะที่คัพภะที่ผ่านการแช่น้ำ 48 ชม. มีจำนวนเซลล์ในช่วงระยะ G2/M ของวงจรเซลล์มากที่สุด โพรโทพลาสต์สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อของคัพภะ แคลลัส และโคนใบหรือยอดของต้นกล้า ปริมาณโพรโทพลาสต์แยกได้มากที่สุดจากคัพภะ (4.77×10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด) ด้วยสารละลาย CPW ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ของน้ำตาลซอร์บิทอล ที่มีเอนไซม์ผสมระหว่าง Cellulase Onozuka R-10 1% Driselase 0.25% และ Macerozyme R-10 0.5% ภายใต้สภาวะวางนิ่งในห้องมืด ที่อุณหภูมิ 25 ° ซ เป็นเวลา 48 ชม. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ด้วยวิธี liquid thin layer มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เริ่มต้นสูงที่สุด แต่พบการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ตามมา และหยุดการเจริญในที่สุด ในขณะที่การเกิดกลุ่มเซลล์โคโลนีจากโพรโทพลาสต์ พบในวิธีการเพาะเลี้ยงที่มีการฝังในวุ้นแบบ agarose bead เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของคัพภะในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ด้วยวิธี bead technique อาศัยผงถ่าน ชนิดของวุ้น น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยงโพรโทพลาสต์

จากดัพภะในอาหารที่ใช้วุ้น agarose และมีสารควบคุมการเจริญเติบโต picloram 8.3 ไมโครโมลาร์ 2,4-D 4.5 ไมโครโมลาร์ kinetin (6-furfurylaminopurine) 9.3 ไมโครโมลาร์ และBA (N^6-benzyladenine) 4.4 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เริ่มต้นสูงสุด คือ 7.0±0.81% ดีกว่าโพรโทพลาสต์จากแคลลัสและโคนใบในแง่ประสิทธิภาพในการแบ่งเซลล์เริ่มต้น ในขณะที่ชนิดของน้ำตาลและผงถ่าน ไม่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบอัตราการเกิดเซลล์โคโลนีสูงสุด (0.03%)ในอาหารที่มี dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid) ร่วมกับ 2,4-D และไซโทไคนิน

Thesis Title	Protoplast Isolation and Culture in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)
Author	Mr.Theera Srisawat
Major Program	Biology
Academic Year	2004

Abstract

Shoots with well developed roots were produced when embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) were imbibed in water for 48 h and cultured in liquid Y3 (Eeuwens, 1978) medium without growth regulator. Embryos imbibed for 48 h cultured in Y3 liquid medium containing 8.3 μM picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) and 4.5 μM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) gave the highest callus induction. We compared DNA contents of oil palm by flow cytometry using soybean (*Glycine max*) cv. Polanka, tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. Stupicke and corn (*Zea mays*) line CE-777 as internal references. The nuclear DNA contents of *Tenera* (T38) cultivar were 4.18±0.04, 3.97±0.09 and 4.34±0.03 pg $2C^{-1}$ nuclei, respectively. Cell nuclei were isolated from embryos, calli, cell suspension, shoots and roots, stained with propidium iodide and analyzed using flow cytometry. DNA contents from one-year-old calli and cell suspension at the 3rd subculture of oil palm were found to be significantly different from that of seedling. Characterization of the DNA content revealed that oil palm embryos imbibed for 48 h had the highest number of cells in the G2/M phase of the cell cycle. Protoplasts were isolated from these embryos, calli and basal leaves. Oil palm embryos imbibed for 48 h showed the

highest yield of protoplasts (4.77×10^6 protoplasts $gram^{-1}$ FW) when treated with an enzyme solution containing 1% Cellulase Onozuka R-10, 0.25% Driselase and 0.5% Macerozyme R-10 for 48 h without agitation in darkness. The high percentage of cell division was derived from protoplasts cultured in liquid thin layer method. However, there was subsequently cell aggregation with no further development. While colonies were obtained in protoplasts derived from the agarose bead embedding method. In agarose bead method, imbibed embryo-derived protoplasts were found to be a more effective source of initial cell division than callus and basal leaf-derived protoplasts. The protoplasts were cultured by employing a bead culture technique in Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with different gelling agents, plant growth regulators, carbon sources and activated charcoal. The highest percentage of cell division (7.0±0.81%) was found in a medium gellified with agarose and supplemented with 8.3 μM picloram, 4.5 μM 2,4-D, 9.3 μM kinetin (6-furfurylaminopurine) and 4.4 μM BA (N^6-benzyladenine). Type of sugar and activated charcoal had no effect on cell division. Plating efficiency, as assessed by colony formation after one month of culture, was better in agarose bead media supplemented with dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid) and 2,4-D combined with different cytokinins than in those with picloram, although the highest plating efficiency was still low (0.03%).