การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

Plant Regeneration from Callus Culture and Protoplast Isolation of *Euphorbia milii* Desmoulin

อุษา พันฤทธิ์ดำ

Usa Panritdam

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2547

เลขหมู่ OK495.E9 อ70 2547

Bib Key 241983

25 ต.ค. 2547

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน
ผู้เขียน	นางสาวอุษา พันฤทธิ์ดำ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

ในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ ลำต้น ข้อ และใบของโป๊ยเซียนสร้างแคลลัส พบว่าข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (1.95 เซนติเมตร) และแคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง เซลล์เกาะตัวกันแน่น สีเขียว ส่วนแคลลัสที่มาจากข้อในอาหารที่มี Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด (12.10 ยอดต่อแคลลัส) ลักษณะยอดเป็นยอดเล็กๆ ไม่ยืดยาว ใบมีสีเขียว การชักนำรากจะย้ายเลี้ยงยอดโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA IBA และ NAA ในความเข้มข้นต่างๆ และไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากได้สูงสุด (15.80 รากต่อยอด) ลักษณะราก สีน้ำตาล ยาว แตกแขนง และแข็งแรง นำต้นโป๊ยเซียนที่ได้ไปอนุบาลในเวอร์มิคูไลต์เป็นเวลา 30วัน จากนั้นนำไปปลูกในดิน พบว่าต้นโป๊ยเซียนมีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะลำต้น สมบูรณ์ แข็งแรง และมีดอกเกิดขึ้น

เมื่อนำใบของโป๊ยเซียนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 30 วัน โดยใช้ใบที่มีน้ำหนักสด 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์โดยเก็บใบไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการแยกโพรโทพลาสต์ นำไปอินคูเบทที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าได้จำนวนโพรโทพลาสต์เฉลี่ย 4.62×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตรวจสอบความมีชีวิตโดยใช้ FDA ซึ่งให้ความมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 84.14 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์นั้น พบว่าโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเริ่มต้น 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ในที่มืด มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้สูงสุด ภายใน 5-6 วัน (58.30 เปอร์เซ็นต์) และเริ่มแบ่งเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปไม่พบการเจริญของกลุ่มเซลล์

Thesis Title	Plant Regeneration from Callus Culture and Protoplast Isolation of *Euphorbia milii* Desmoulin
Author	Miss Usa Panritdam
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2004

Abstract

The optimum culture media for callus induction from stems, nodes and leaves of *Euphorbia milii* Desmoulin was studied. It was found that nodes cultured on MS (Murashige and Skoog) solid medium supplemented with 1.0 mg/l 2,4-D gave the largest size of callus formation (1.95 cm in diameter) and the calli were compact and green. Node-derived callus initiated on MS medium containing 2.0 mg/l Kinetin gave the highest number of shoot (12.10 shoots per callus) when cultured on MS medium supplemented with 3.0 mg/l BA.The obtained shoots were small, short and green. For root induction, all shoots were transferred to MS medium supplemented with either IAA IBA NAA or hormone free MS medium. The results revealed that MS medium containing 3.0 mg/l NAA gave the highest number of roots (15.80 roots per shoot explant). The obtained roots were brown, long, branch and healthy. Rooted shoots were carefully acclimatized in sterile vermiculite for 30 days. After acclimatization, complete and healthy plants were transplanted to pots and grown in the greenhouse with a 100 % survival rate. Normal looking *Euphorbia* plants with flowers were obtained.

Protoplasts were isolated from 30 days old leaves collected from aseptically grown *Euphorbia* plantlets. One gram fresh weight of leaves was digested with 10 ml of enzyme solution containing 1 % (w/v) Cellulase ''Onozuka R-10 '', 0.5 %(w/v) Driselase, 0.5%(w/v) Macerozyme R-10 and 0.4 M mannitol. The leaves were kept in darkness for 24 hours prior to protoplast isolation. The mixture of leaves and enzyme solution was incubated at 30 $\pm$1 ^{0}C under dark condition for 3 hours on a gyratory shaker with an agitation speed of 50 rpm. The average yield of isolated protoplasts was 4.62 x 10^{5} protoplasts/g.f.wt and viability as monitored by FDA was 84.14%. The protoplasts were cultured at a density of 1 x 10^{5} protoplasts/ml in MS semi-solid medium supplemented with 1.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA and 0.4 M mannitol under dark