การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน

(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

Protoplast Isolation and Culture from Leaves of Shogun

(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

อุมาพร ศรีภักดี

Umaporn Sripakdee

Order Key 20158
BIB Key 160172

เลขหมู่ SB370.S5 อ74 2541
เลขทะเบียน 12/1 มิ.ย. 2542
ค.1

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2541

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน
(*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)

ผู้เขียน นางสาว อุมาพร ศรีภักดี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) นั้นใช้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเมล็ดงอกใช้ใบอายุต่างๆ กันมาหั่นฝอยละเอียด จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สัดส่วนของใบหนัก 1 กรัมต่อเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ทั้งหมดที่ศึกษาละลายในแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ MES (2-(N-morpholinoethanesulfonic acid)) เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ $MgSO_4.7H_2O$ 1.7 มิลลิโมลาร์ และ $CaCl_2.\ 2H_2O$ 2.99 มิลลิโมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างต่างๆ กันในช่วง 5.4-6.2 หน่วย นำใบที่อินคูเบทในเอนไซม์แต่ละชุดไปเขย่าในสภาพที่มืดอุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ5 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกโปรโตพลาสต์ ศึกษาจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

จากการศึกษาพบว่า การฟอกเมล็ดด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่ว่าเพาะทั้งเมล็ดที่มีเปลือกหุ้ม หรือไม่มีเปลือกหุ้ม เมื่อนำชิ้นส่วนลำต้นส่วนปลายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker) เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวม (เปอร์เซ็นต์ และ จำนวน) สูงที่สุดชิ้นส่วนดังกล่าวใช้เป็นแหล่งในการแยกโปรโตพลาสต์ต่อไป จากการทดสอบชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์พบว่า เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์ 10 เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ อินคูเบทในสภาพเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงที่สุด $6.6x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 83.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์ที่ให้จำนวนสูงที่สุด $1.1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสดคือ 5.6 และที่ความเป็นกรดด่างนี้ยังให้ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงที่สุด 79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบอายุของใบของต้นกล้าที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์พบว่า ใบอายุ 35 วันหลังจากเมล็ดงอกให้จำนวนสูงที่สุด $6.8x10^5$ โปรโตพลาสต์กรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 82 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มเวลาการอินคูเบทจาก 3 เป็น 5 ชั่วโมง ส่งเสริมให้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นจาก $3.7x10^6$ เป็น $4.5x10^6$ ต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อเปรียบเทียบแหล่งของใบจากต้นกล้ากับใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้น (หรือจากการทำไมโครคัตติ้ง) พบว่าใบจากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงมากกว่าใบจาก

ไมโครคัตติ้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเป็นชั้นบางๆ ด้วยความหนาแน่นต่างๆ พบว่าความหนาแน่น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุดประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มโชกุนคือสูตร MS เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเข้มข้นออสโมติคัมด้วยแมนนิตอล 0.7 โมลาร์ สภาพแวดล้อมการวางเลี้ยงที่เหมาะสมคือในที่มืด อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในสภาพที่สารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมส่งเสริมการแตกหน่อจำนวนมาก ดังนั้นการแบ่งเซลล์ในระยะต่อมาจึงยังไม่ประสบผลสำเร็จ

Thesis Title	Protoplast Isolation and Culture from Leaves of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun)
Author	Miss Umaporn Sripakdee
Major Program	Plant Science
Academic Year	1998

Abstract

Isolation of protoplasts of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) was carried out using seedlings germinating on hormone-free basal MS (Murashige and Skoog) medium. After the seeds germinated, the leaves at various physiological ages were collected, cut into narrow strips and incubated in different kinds and concentrations of enzymes. Usually 1 g of leaf tissue was incubated with10 ml. of enzyme. The combination of enzymes used in this investigation was dissolved in 0.7 M mannitol in the presence of 3 mM MES (2-(N-morpholinoethanesulfonic acid)), 1.7 mM $MgSO_4.7H_2O$, and 2.9 mM $CaCl_2.2H_2O$. The pH of the enzyme mixture solution was adjusted ranging from 5.4-6.2 Incubation was carried in an orbital shaker at 40 rpm under dark condition at $27\pm2^{\circ}C$ for three and five hours. At the end of incubation, a number and yield of released protoplasts were seperately compared in each treatment by completely randomized design.

The results revealed that surface sterilization of the seeds for 20 min gave 100% germination in both the presence and absence of seed coat. Culturing seedling stems at the distal end onto MT (Murashige and Tucker) medium supplemented with 0.5 mg/l BA (benzyladenine) provided the best result in multiple shoot formation (percentage and number). Those shoots were further used as plant material for protoplast isolation. Among enzymes tested, it was found that 1.5% cellulase from *Trichoderma viride* in combination with 1.5% macerozyme R-10 gave the highest yield and viability of protoplasts of $6.6x10^5$/g fresh weight and 83.6%, respectively, after incubation on an orbital shaker at 40 rpm for 3 h. The optimum pH for the highest yield of released protoplasts was 5.6. This pH provided $1.1x10^6$ protoplasts/g fresh weight and percentage viability of 79. In the case of leaf ages, 35-day old leaves after emerging or germination gave the highest yield and viability of protoplasts of $6.8x10^5$ and 82%, respectively. Increasing the time of incubation to 5h increased the number of protoplasts, significantly to $4.5x10^6$, the number at 3h had been $3.7x10^6$. For sources, seedling leaves gave much greater yields of protoplasts than microcutting.

The culture of mesophyll protoplsts in thin layer of liquid MS medium at various densities revealed that $2x10^5$ protoplasts/ ml promoted the highest division at approximately 4%. The most suitable culture medium was MS supplemented with 5 mg/l NAA (α-naphthaleneacetic acid) and 1 mg/l BA and adjusted osmoticum with mannitol to 0.7M. The cultures were maintained under dark condition at $27\pm2^{\circ}C$. First division of the protoplasts was observed after a week of culture. In an unsuitable of plant growth regulators, a high frequency of budding occurred. Accordingly, further division and development of protoplasts in this experiment was not evident.