การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง

[*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs]

Plantlet Regeneration, Isolation and Culture of Protoplasts from Leaf of Neem

[*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs]

นิจวรรณ สนิทงาม

Nitjawan Sanitngam

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2545

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs]

ผู้เขียน นางสาวนิจวรรณ สนิทงาม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงใบย่อยชุดที่สองนอกหลอดทดลองของสะเดาช้างบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า NAA (1-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 2.0 มก./ล. ร่วมกับ KN (kinetin) เข้มข้น 0.5-1.0 มก./ล. ชักนำคอมแพคแคลลัส ได้สูงสุด 100% และแคลลัสเพิ่มขนาดได้ใหญ่ที่สุด 4.2 มม. 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5-1.0 มก./ล. ชักนำฟรายเอเบิลได้สูงสุด 90% และเพิ่มขนาดได้ใหญ่ที่สุด 7.5 มม. อย่างไรก็ตาม เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ การเติมเคซีนไฮโดรไลเสทสามารถชักนำตายอดได้ 11.9% จำนวน 4 ตายอดต่อชิ้นส่วน หลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้างนอกหลอดทดลองด้วยสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 3-10 ชั่วโมง ปรับความหนาแน่น และเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ใบสดที่มีความกว้าง 2.1-3.0 ซม. อินคิวเบทด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2% ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1% ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แยกโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุด 8.9×10^6 ต่อกรัมน้ำหนักสด การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมล. ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 สูงสุด 3.0% และ 1.4% ตามลำดับ อาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 2 มก./ล ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มก./ล. เป็นเวลา 2 วัน แล้วเติมอาหารเหลวสูตรเดิมที่ลดออสโมติคัมเป็น 0.3 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์สูงสุด 10.9% นอกจากนี้แหล่งของชิ้นส่วนอื่น ๆ ที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ ได้แก่ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 5.4×10^5 และ 3.5×10^4 ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5-1.0 มก./ล

ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้การแบ่งเซลล์ 8.2% และ 27.9% ตามลำดับ โปรโตพลาสต์จากแคลลัสให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์ดีที่สุดจำนวน 6 เซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยง 4 วัน

Thesis Title	Plantlet Regeneration, Isolation and Culture of Protoplasts from Leaf of Neem [*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs]
Author	Miss Nitjawan Sanitngam
Major Program	Plant Science
Academic Year	2001

Abstract

The second pair of *ex vitro* compound leaves of Neem were cultured on Murashige and Skoog (MS) supplemented with various kinds and concentrations of plant growth regulators. The results showed that 2.0 mg/l 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.5-1.0 mg/l kinetin (KN) provided the highest percentage of compact callus at 100% and the highest callus size at 4.2 mm whereas 0.5 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5-1.0 mg/l benzyladenine (BA) induced and proliferated the highest percentage of friable callus at 90% and 7.5 mm, respectively. However, when callus were subcultured on a medium supplemented with various concentrations of BA for a month, plantlet could not be generated. The addition of casein hydrolysate to the medium, induced shoot bud formation at 11.9% with 4 shoot buds/ callus after a month of culture.

Isolation of protoplasts from *ex vitro* leaves of Neem was carried out using various kinds and concentrations of enzymes on a gyratory shaker at 50 rpm under darkness for 3-10 hours then the density of protoplasts was adjusted and culturing in MS medium supplemented with various kinds and concentrations of plant growth regulators. The results showed that 2.1-3.0 cm. wide fresh leaves incubated in 2% cellulase Onozuka RS, 1.0% macerozyme R-10 and 0.5 M manitol gave the highest released protoplasts at 8.9×10^6/g.fr.wt. Culturing of the protoplasts at a density of 5×10^5/ml promoted the highest first and second division at 3.0% and 1.4%, respectively. A culture medium supplemented with 2.0 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l BA for 2 days and with added liquid medium which reduced osmoticum to 0.3 M promoted the highest division of protoplasts at 10.9% after cultured for a week. The

other two sources of explants, callus and cell suspension culture, were also investigated for protoplast isolation. Protoplast number was recorded $5.4x10^5$ and $3.5x10^4$/g.fr.wt. were obtained from callus and cell suspension, respectively. Culturing of the protoplasts in a medium supplemented with 0.5-1.0 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA resulted in cell division at 8.2% and 27.9%, respectively. Protoplasts from callus showed the most effective since 6 cell were development after 4 days of culture.