การแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) และการปลูกถ่ายยีน

Isolation and Culture Protoplasts of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) and Gene Transformation

ชวนพิศ นิยะกิจ

Chuanpit Niyakit

ก

เลขหมู่ QK725 ช53 2544

Bib Key 216898

...../...../.....

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) และการปลูกถ่ายยีน
ผู้เขียน	นางสาวชวนพิศ นิยะกิจ
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน การแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) จากแหล่งต่าง ๆ คือ ใบอ่อนของต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงคัพภะ, ใบจากการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง, ปลายราก และเซลล์ซัสเพนชันอายุต่าง ๆ หลังการย้ายเลี้ยงศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชัน จำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลอง เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยความหนาแน่นต่างกัน สำหรับการปลูกถ่ายยีนใช้ชิ้นส่วนข้อใบเลี้ยงของต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงคัพภะยางพารา โดยวิธีการจุ่มแช่ในซัสเพนชันอะโกรแบคทีเรียมให้โดนหรือปลายสัมผัสเชื้อ แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตรวจสอบทางเนื้อเยื่อเคมีจากกิจกรรมของ GUS (β-glucuronidase) จากการศึกษา พบว่า เซลล์ซัสเพนชันที่ย้ายเลี้ยงทุก 7 วัน ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 3-5 วัน ส่วนการย้ายเลี้ยงทุก 10 วัน ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 7-9 วัน และการย้ายเลี้ยงทุก 15 วัน ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลังการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 10-12 วัน การใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 1.0 มิลลิลิตร ในเซลล์ซัสเพนชันที่ย้ายเลี้ยงทุก 7 และ 10 วัน พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์สามารถเป็น 3 ระยะอย่างชัดเจน ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่างๆ พบว่า ใบอ่อนของต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงคัพภะในหลอดทดลองให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $2.5x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ เซลล์ซัสเพนชัน ($1.3x10^7$), ใบจากการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง ($2.6x10^6$) และปลายราก ($2.2x10^5$) จากการตรวจสอบความมีชีวิต พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันให้ความมีชีวิตสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลายราก (90 เปอร์เซ็นต์) ใบอ่อนของต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงคัพภะ (77 เปอร์เซ็นต์) และใบจากการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (66 เปอร์เซ็นต์) โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันที่ย้ายเลี้ยงทุก 15 วัน หลังการย้ายเลี้ยง 5 วัน มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร

MS เติม TDZ (thidiazuron) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์เริ่มสร้างผนังเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง มีลักษณะรี และแบ่งเซลล์ครั้งแรก หลังวางเลี้ยง 2 วัน และแบ่งเซลล์ครั้งที่ 2 ประกอบด้วยเซลล์ประมาณ 4 เซลล์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5-10 วัน ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันที่ย้ายเลี้ยงทุก 7 วัน หลังการย้ายเลี้ยง 4 วัน สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นไมโครโคโลนีได้เมื่อนำไมโครโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA (α-napthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส ขณะนี้กำลังชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสดังกล่าว

สำหรับการปลูกถ่ายให้กับชิ้นส่วนข้อใบเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงคัพภะยางพาราโดยวิธีการจุ่มแช่ในซัสเพนชันของ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 จากการตรวจสอบไม่พบกิจกรรมของ GUS ไม่ว่าใช้ส่วนโคน หรือปลายสัมผัสเชื้อ หลังจากเลี้ยงบนอาหารชักนำยอด เป็นเวลา 1 เดือน

Thesis Title Isolation and Culture Protoplasts of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) and Gene Transformation.

Author Miss Chuanpit Niyakit

Major Program Plant Science

Academic Year 2001

Abstract

Cell suspension culture of rubber *(Hevea brasiliensis* Muell Arg.) was established and protoplasts were isolated from different sources, i.e. young leaves from seedling raised *in vitro* or cultured cotyledonary node, root tip and cell suspension culture. The number and viability of protoplasts were examined. Isolated protoplasts were cultured in MS medium supplemented with various types and concentrations of plant growth regulators at different densities. Division of protoplasts were observed and compared in each treatment. In the gene transformation study, basal or top part of cotyledonary nodes derived from culturing zygotic embryos were dipped into *Agrobacterium tumefaciens* suspension. The cotyledonary nodes were then transferred to MS medium supplemented with 0.25 mg/l BA (6-benzyladenine) for shoot formation, following which GUS (β-glucuronidase) activity was tested histochemically after a month. The results showed that cell suspension which subcultured every 7, 10 and 15 days gave exponential growth (log phase) at 3-5 , 7-9 and 10-12 days after subculture, respectively. Initial inoculum 1.0 ml packed cell volume of cell suspension culture which were subcultured every 10 and 15 days gave a clear three cell growth phase. The protoplasts isolated from young leaves of seedlings gave the highest yield at $2.5x10^7$protoplasts/g fresh weight, followed by cell suspension culture ($1.3x10^7$), leaves from cultured cotyledonary node ($2.6x10^6$) and root tip ($2.2x10^5$). For percentage of viability, protoplasts which were isolated from cell suspension culture gave the highest viability at 93%, followed by root tip (90%), young leaves from seedling (77%) and leaves from cultured cotyledonary node (66%). In the case of cell suspension culture, protoplasts from suspensions which were subcultured every 15 days at 5 days after subculture gave the highest division at 8% when they were cultured by embedding in semi-solid MS medium supplemented with 0.1 mg/l TDZ (thidiazuron) and 0.5 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) at a density of $1x10^5$

protoplasts/ml. Protoplasts started to regenerate cell wall within 24 hours, then first and second division occurred after culture for 2-10 days. Protoplasts from cell suspension culture which subculture every 7 days, at 4 days after subculture divided and developed to microcolonies and callus after maintenance on solid MS medium supplemented with 4.0 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA (α-napthaleneacetic acid) for a month.

The transformation study showed that cotyledonary nodes from cultured zygotic embryo which were dipped in both strains of *A. tumefaciens* suspension, LBA4404 containing pBI121 or EHA101 containing pIG121, were not found to have GUS activity neither basal nor top part of cotyledonary nodes after culture for a month.