



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การแยก การเลี้ยงและการเกิดต้นจาก
โปรโตพลาสต์ของโกโก้

Isolation, Culture and Regeneration
of Cacao Protoplasts

โดย

दानุณ กานจนภูมิ

งบประมาณโครงการวิจัย ปีงบประมาณ 2534

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดโกโก้ด้วยสารละลายคลอโรกซ์ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ของเนื้อเยื่อที่ไม่ปนเปื้อนและอัตราการรอดชีวิตสูงสุด เอ็มบริโอเจริญเป็นต้นกล้าเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MSG 2 ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ตัดแบ่งต้นกล้าโกโก้และนำไปชักนำแคลลัสในอาหารสูตร MSG 1, MSG 2 และ MSG 3 พบว่าส่วนเนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSG 3 ที่มี 2,4-D 0.0125 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล ให้แคลลัสที่มีลักษณะร่วนฟูสีเหลืองอ่อนจนถึงขาวซีด

นำแคลลัสลักษณะร่วนฟูสีเหลืองอ่อน ไปเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย ในอาหารเหลวสูตร MSG 2 ที่มี 2,4-D 0.5 มก/ล ย้ายเลี้ยง ทุก ๆ 10 วัน ทำการกรองเซลล์แขวนลอยที่ได้หลาย ๆ ครั้ง จนได้เซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอ เหมาะสำหรับนำไปแยกโปรโตพลาสต์ นำเซลล์แขวนลอยอายุ 6 วัน มาย่อยผนังเซลล์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ไดเรซีเลส (Driselase) 2 เปอร์เซ็นต์, น้ำตาลซอร์บิทอล 0.5 โมลาร์, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 มิลลิโมลาร์, MES 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 นาน 3 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์หนัก 0.25 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 20 มล ได้โปรโตพลาสต์ประมาณ 4.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล ความมีชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบโดยการย้อมสีฟลูออเรสซินไดอะซีเตด เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MSG 2 ที่มี 2,4-D 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ ในที่มีดโดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น 4×10^5 โปรโตพลาสต์/มล หลังจากเพาะเลี้ยง 8 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และมีการแบ่งเซลล์เกิดเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ เหล่านี้มาทำการเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.09 โมลาร์ (3 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากใบเลี้ยงและแคลลัสที่ได้จากโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MSG 1 ที่มีน้ำมะพร้าว 100 มล/ล และ NAA 1.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน ที่ไม่มีน้ำมะพร้าวและ NAA สามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอออกได้ และเอ็มบริโอออกที่ได้มี ลักษณะเป็นตุ่มสีเขียวผิวเรียบ ซึ่งเอ็มบริโอออกที่ได้สามารถ

พัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากการศึกษาดังกล่าวของเอ็มบริโอของพืชพบว่า เอ็มบริโอของพืชที่มี
ส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบ, ยอด, กลุ่มท่อลำเลียง และราก คล้ายเอ็มบริโอของพืชใบเลี้ยงคู่
โดยทั่วไป

Abstract

Seeds of cacao which were surfaced sterilized in a solution of 30% Clorox for 30 minutes gave the highest percentage of noncontamination and viability. Sterile seeds were cultured on MSG 2 medium without plant growth regulator. Segments of cacao seedlings were excised and cultured on MSG 1, MSG 2 and MSG 3 media. It was found that yellowish friable callus was initiated from epicotyl cultured on MSG 3 medium supplemented with 0.0125 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA.

Epicotyl-derived callus was transferred to MSG 2 liquid medium containing 0.5 mg/l 2,4-D to establish cell suspension culture. Cell suspension was subcultured every 10 days and filtered several times until the desired uniform size was met. Protoplasts were isolated from 6 day old cells after each subculture. A sample of cells, of 0.25 g fresh weight, was incubated in a 20 ml solution of 0.5 M sorbitol, 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM MES and Driselase 2% (w/v) at pH 5.0 for 3 hours. The yield of isolated protoplasts was 4.5×10^5 protoplasts/ml and the protoplast viability as monitored by fluorescein diacetate was 95%. The protoplasts were cultured in the dark at a density of 4×10^5 protoplasts/ml in the same liquid medium as cell suspension, except 0.5 M sucrose was added to maintain osmolarity of the protoplasts. After 8 days in culture, wall formation was evident and cell division of cultured protoplasts appeared within 4 weeks. The small aggregate cells obtained were multiplied by culturing in the same liquid medium with a reduction

of sucrose to 0.09 M (3%)

Embryoids were regenerated from callus derived from cacao cotyledons and protoplasts cultured on MSG 1 medium supplemented with 100 ml/l coconut water and 1.5 mg/l NAA for 4 weeks and then subsequently transferred to the same medium without coconut water and NAA. By subculture onto a similar medium for several times, the embryoid developed into complete plantlets. Histological analysis revealed that the embryoid showed anatomical structures similar to those of the zygotic embryo, including leaf primordium, shoot apex, vascular strand and root apex.