การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้

Protoplast Culture of Cacao

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์

Charuvat Chantrapradist

เลขหมู่ QK 725 .C64 2534
เลขทะเบียน 030397
25 S.A. 2534

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2534

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้

ผู้เขียน นายจารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2534

บทคัดย่อ

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

เมื่อนำส่วนของใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MSG 1 ที่มีน้ำมะพร้าว 100 มล/ล และ NAA 1.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่ไม่มีน้ำมะพร้าวและ NAA สามารถชักนำการเกิดเอ็มบริออยด์ได้ และเอ็มบริออยด์ที่ได้มีลักษณะเป็นตุ่มสีเขียวผิวเรียบ

จากการศึกษาทางกายวิภาคของเอ็มบริออยด์พบว่า เอ็มบริออยด์ที่ได้อยู่ในระยะตอร์ปิโด และมีส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบ, ยอด, กลุ่มท่อลำเลียง และราก คล้ายเอ็มบริโอของพืชใบเลี้ยงคู่โดยทั่วไป

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 ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ไดรซีเลส (Driselase) 2 เปอร์เซ็นต์, น้ำตาลซอร์บิทอล 0.5

โมลาร์, $CaCl_2.2H_2O$ 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 ทดสอบโดยการย้อมสีฟลูออเรส-ซีนไดอะซีเตต เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร MSG 2 ที่มี 2,4-D 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ ในที่มืดโดยใช้จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น 4×10^5 โปรโต-พลาสต์/มล หลังจากเพาะเลี้ยง 8 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และมีการแบ่งเซลล์เกิดเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ เหล่านี้มาทำการเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.09 โมลาร์ (3 เปอร์เซ็นต์)

Thesis Title Protoplast Culture of Cacao

Author Mr. Charuvat Chantrapradist

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1991

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.

Embryoids were regenerated from cacao cotyledons 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.

Histological analysis revealed that the embryoid was in torpedo stage of development. Embryoid showed anatomical structures similar to those of the zygotic embryo, including leaf primordium, shoot apex, vascular strand and root apex.

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 $CaCl_2.2H_2O$, 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%)