บทคัดย่อ

T 146617

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์บัวหลวง โดยนำใบในสภาพปลอดเชื้อมาทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้โดยทำการสับใบแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka R-10 2 % (w/v) , macerozyme onozuka R-10 1 % (w/v) และ 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid 5 mM ละลายในสารละลาย CPW ที่เติม mannitol 0.5 โมลาร์ ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.4 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 33 x10^4โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และการทดลองที่ 2 ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานและความหนาแน่นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่างๆกัน เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ KM8P(B) และใช้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 2.5x10^4 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยจะทำให้โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแตกสลายน้อยที่สุดและพบโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น และการทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์บัวหลวง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร KM8P(B) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ กัน 4 แบบ คือ 2,4-D ร่วมกับ BA , 2,4-D ร่วมกับ TDZ , NAA ร่วมกับ BA และ NAA ร่วมกับ TDZ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์ได้หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โดยเกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น 4 แบบ คือแบ่งเซลล์แบบเท่ากัน , แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อหลายหน่อ , แบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเดียว, แบ่งเซลล์แบบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยการเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวสูตร KM8P(B) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรจะกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์แบบต่างๆมากที่สุดคือ 18.29 เปอร์เซนต์

TE146617

ABSTRACT

Protoplast culture of Lotus was conducted in 3 experiments. In first experiment, preliminary factors on protoplast isolation were studied. The best method for protoplast isolation was the incubation of thin strips of young leaves in enzyme solution containing 2 % (w/v) cellulase onozuka R-10 , 1 % (w/v) macerozyme onozuka R-10 and 5 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid in CPW with 0.5 M mannitol at pH 5.4 for 6 hours and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes,$33x10^4$ protoplasts per gram fresh weight were achieved. In second experiment, the basic medium and protoplast density were studied. It was found that the lowest number of blasted and brown protoplasts and protoplast division were obtained on KM8p (B) medium and the density was $2.5x10^4$ protoplasts per ml. In third experiment, the suitable plant growth regulators for protoplast culture were observed by using four different combinations of following auxin and cytokinin : 2,4-D and BA , 2,4-D and TDZ , NAA and BA , NAA and TDZ. The first division of protoplast was occurred within 1 day of incubation. There were 4 different types of division (equal division, budding division with multiple cells, budding division with single cell and changed form division) after 2 weeks of incubation. The highest percentages of cell division was 18.29 which obtained from mesophyll protoplasts cultured on KM8p medium containing 2 mg/l NAA.