บทคัดย่อ

T 138203

ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ใช้ใบเลี้ยง และใบจริงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog medium) ซึ่งปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 1 เดือน มาอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้สัดส่วนของใบหนัก 1 กรัม ต่อเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ หลังจากนั้นแยกโปรโตพลาสต์ ศึกษาจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด สำหรับการปลูกถ่ายยีนทำโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* การปลูกถ่ายยีนให้กับลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยวิธีการหยดเชื้อ และการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบโดยการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนจากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมและแคลลัส ภายหลังการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน และการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อเคมีจากกิจกรรมของ GUS (β–glucuronidase)

จากการศึกษา พบว่า ใบเลี้ยง ใบจริงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.09x10^7$, $3.07x10^7$ และ $8.48x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 80.90, 85.86 และ 89.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อแยกด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ การอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด $9.20x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 81.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 พบว่า ให้จำนวนและความมีชีวิต$6.14x10^6$ และ $7.50x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 88.40 และ 87.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สำหรับการฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS โดยใช้วุ้นไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม NAA (α-naphthalene acetic acid) เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีพัฒนาการได้ดีที่สุด โปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 13.33 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน รองลงมา คือ โปรโตพลาสต์จากใบจริงจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง มีการแบ่งเซลล์ 9.19 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ในกรณีของโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ 4.00 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker medium) เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 29.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ อาหารสูตร MS เติม NAA และ BA ความเข้มข้นเดียวกัน โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 20.83 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถชักนำการสร้างโคโลนีและแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มจุกจากทั้ง 3 แหล่งได้

การปลูกถ่ายยีนโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) เป็นเวลา 5 นาที ให้ความมีชีวิตรอดมากที่สุด 64 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ใด ๆ ส่วนการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงด้วยวิธีการหยดเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ส่งเสริมการสร้างยอด 93 เปอร์เซ็นต์ ยอดใหม่ที่สร้างทั้งหมดมีสีซีด หลังนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่หยดด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 (pIG121) ให้การสร้างยอด 50 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนนี้มีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถเลี้ยงบนอาหารที่มีคานามัยซินได้ เป็นเวลา 1 เดือน จากการศึกษาผลของความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง พบว่า *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอดรวม 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ EHA101 (pIG121) ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม 75 เปอร์เซ็นต์ พบกิจกรรมของ GUS ในลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเจริญและการรอดชีวิตของยอดบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบ พบว่า สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัส 25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ EHA101 (pIG121) ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัส 56 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของ GUS จากการเลี้ยงร่วมแผ่นใบกับ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้

TE 138203

Protoplasts were isolated from cotyledons and seedling leaves of the neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) raised on hormone-free MS (Murashige and Skoog) medium and leaves derived from culturing epicotyl explants on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA (benzyladenine). One month old leaves from all sources were stripped and incubated in a 10 ml solution of various combinations of enzymes at 25±2 °C for different periods, following which the number of viable protoplasts were counted and compared in each treatment using a completely randomized design. In the gene transformation study, epicotyl and leaf protoplasts were co-cultured with *Agrobacterium* with or without sonicator, following which the survival percentage of protoplasts, the percentage of multiple shoots and callus formation on kanamycin-containing medium were determined. GUS (β-glucuronidase) activity was tested histochemically.

The results showed that cotyledons and leaves derived from seedling and epicotyl culture gave mesophyll protoplasts of 1.09×10^7, 3.07×10^7 and 8.48×10^6 protoplasts/g fresh weight and gave the highest viability of 80.09, 85.86 and 89.19%, respectively, when incubated in 0.1% Pectolyase Y-23, 1.5% Cellulase Onozuka RS and 1.0% Macerozyme R-10. Incubating the leaves with the above enzyme solution for 3 hours also gave the highest yields of viable protoplasts at 9.20×10^6 protoplasts/g fresh weight and 81.43%, respectively. Comparing the first and second pair of leaves, it was found that the number of viable protoplasts was not significantly different.

Culturing of the protoplasts by embedding in semisolid MS medium supplemented with 0.15% Phytagel, 3% sucrose, 0.7 M mannitol, 1.0 mg/l NAA (α-naphthaleneacetic acid) and 5.0 mg/l BA at a density of 1×10^5 protoplasts/ml gave the

best results in division of the protoplasts. Division of protoplasts from leaves derived from culturing epicotyl explants gave the highest frequency of 13.33% after 7 days of culture, followed by seedling leaves which gave division of protoplasts at 9.19% after 20 days of culture. Protoplasts isolated from cotyledons gave a budding frequency of 4.00% after 7 days of culture. The highest division of protoplasts, 29.92%, was obtained with MT (Murashige and Tucker) medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 2.0 mg/l BA followed by MS medium supplemented with NAA and BA at the same concentration. However, microcolony or callus formation could not be induced from all sources of the protoplasts.

The transformation study showed that co-cultivation of protoplasts with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) for 5 minutes gave the highest survival rate of 64% after 72 hours of culture. However, division of protoplasts was not seen. Epicotyls co-cultured with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) gave the highest percentage of shoot formation (93%). All shoots were pale (unhealthy) when they were transferred for culture onto kanamycin-containing medium. Epicotyls co-cultured with *Agrobacterium*, EHA101 (pIG121) gave 50% shoot formation. Ten percent of the shoots could be maintained for a month on kanamycin-containing medium. For density of *Agrobacterium* tested, it was found that co-culture of epicotyl explants with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) at a density of $1x10^{12}$ cells/ml gave shoot formation of 81% while EHA101 (pIG121) at a density of $1x10^{10}$ cells/ml gave shoot formation of 75%. Positive activity of GUS was observed in the original epicotyl explants co-cultured with both strains of *Agrobacterium*. However, growth and survival of the shoots were not evident in 100 mg/l kanamycin-containing medium. A study on the effect of the density of *Agrobacterium* on leaf transformation showed that *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) at a density of $1x10^{12}$ cells/ml together with sonicator gave callus formation of 25%. EHA101 (pIG121) at a density of $1x10^{10}$ cells/ml together with sonicator gave callus formation of 56%. GUS activity was found in the calli derived from the leaves co-cultured with both strains of *Agrobacterium;* however, the calli could not be regenerated on selective medium supplemented with 50 mg/l kanamycin.