ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและการรวมโปรโตพลาสต์คะน้าจีนและบร็อคโคลี่

ชื่อผู้เขียน นางสาวอัญชัญ วิรัชลาภ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาทพร สมิตะมาน ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. มณีฉัตร นิกรพันธุ์ กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. ดนัย บุณยเกียรติ กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ซึ่งได้แก่ ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก และระยะการพัฒนาของละอองเรณู พบว่าดอกคะน้าจีนและดอกบร็อคโคลี่ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 2.5-3.6 มม. เป็นขนาดดอกที่มีละอองเรณูที่อยู่ในระยะ uninucleate มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์สูงสุดถึง 90 และ 100 ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ในอาหารสูตร B_5 (Gamborg, 1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) สามารถชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นแคลลัสแต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นเอมบริโอได้ และพบว่าอาหารสูตร B_5 ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล สามารถชักนำให้อับละอองเรณูของคะน้าจีนพัฒนาเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด คือ 35.4% ส่วนอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่พัฒนาเกิดแคลลัสสูงสุดในอาหารสูตร B_5 ที่เติม 2,4-D 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. โดยมีจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น 33.3% ในขณะที่อาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ อับละอองเรณูไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ในอาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสในอัตราร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 พบว่า อับละอองเรณูของพืชทั้งสองชนิดสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดคือ 27.1% และ 34.4% ตามลำดับ ในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 4% ในขณะที่การกระตุ้นอับละออง

เรณูของคะน้าจีนโดยเก็บดอกที่อุณหภูมิต่ำ 4 °ซ เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และไม่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าการไม่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่ำมีจำนวนอับละอองเรณูของคะน้าจีนพัฒนาเป็นแคลลัสสูงสุดคือ 27.1% ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเก็บดอกที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีอับละอองเรณูที่เกิดแคลลัส 24.0% ส่วนการกระตุ้นอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่โดยการแช่ดอกในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 40 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับการไม่แช่ พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส และพบว่าแคลลัสของคะน้าจีนสามารถพัฒนาเป็นยอดเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS (1962) ที่ดัดแปลงโดยเติม BAP 0.1 มก./ล., IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล. ในขณะที่แคลลัสบร็อคโคลี่พัฒนาเกิดยอดบนอาหารสูตรเดียวกันแต่เติม BAP 0.25 มก./ล., IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล. ในการตรวจสอบต้นคะน้าจีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูพบว่ามีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่ปากใบไม่แตกต่างจากต้นที่เพาะจากเมล็ด ในขณะที่จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อคู่ปากใบของต้นบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูพบว่าแตกต่างจากต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญ

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ด้วยกระแสไฟฟ้าและหลังจากเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าโปรโตพลาสต์ลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 69.38% ไม่ต่างจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเป็น 77.99% และ 70.54% ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน โปรโตพลาสต์เริ่มแบ่งเซลล์ครั้งแรก และมีปริมาณการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น หลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน โดยคะน้าจีนมีอัตราการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นสูงสุด คือ 11.99% รองลงมาคือ บร็อคโคลี่ และโปรโตพลาสต์ลูกผสมซึ่งมีอัตราการแบ่งเซลล์ 8.05% และ 3.67% ตามลำดับ สำหรับการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ลูกผสมหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่ามีอัตราการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ลูกผสมเกิดขึ้นสูงสุด ถึง 9.7% เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PS (1981) ที่เติม 2,4-D 0.1 มก./ล., NAA 1.0 มก./ล., Zeatin 0.75 มก./ล. และสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์

Thesis Title Anther Culture and Protoplast Fusion of Chinese Kale and Broccoli

Author Ms. Anchan Wirachlarp

M.S. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Prasartporn	Smitamana	Chairman
Assoc. Prof. Dr.Maneechat	Nikornpun	Member
Assoc. Prof. Dr Danai	Boonyakiat	Member

Abstract

Factors influencing Chinese kale and broccoli anther culture were investigated in this study. Flower bud size showed high correlation with the microspore developmental stage of the Chinese kale cv. Veggin 1314 and broccoli cv. Green King, in which 90 and 100% of uninucleate microspore could be observed in the 2.5–3.6 mm. flower buds of Chinese kale and broccoli respectively. Chinese kale and broccoli anthers cultured on modified B_5 medium could not develop to embryo directly, only callus stage could be obtained. Highest average of callus formation (35.42%) of Chinese kale was obtained when cultured on modified B_5 medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l NAA, whereas the highest callus formation of the broccoli anthers (33.33%) were found on modified B_5 medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l and non-callus formation was detected on the hormone free medium. Sucrose concentration at 2, 4, 6, 8 and 10% were added to the modified B_5 medium, the result revealed 4% sucrose was best suited for Chinese kale (27.08%) and broccoli (34.38%) callus development. For the effect of low temperature treatment on the callus induction, Chinese kale anthers were treated at 4^0C for 24, 48 and 72 hr. respectively, no statistical difference was observed in the 24 hr. treated groups which gave the best result (23.96%) and the non pretreated group (27.08%).

Moreover, callus formation was decreased in all treatments that longer than 24 hr. Non significant difference was observed in the broccoli flower buds treated at 45^0C for 1 hr. followed by 40^0C for another 3 hr. and control non-treated group. Shoot formation from Chinese kale callus was obtained when cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA and 0.1 mg/l GA_3, whereas the broccoli shoot was induced using MS medium supplemented with 0.25 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA and 0.1 mg/l GA_3. Number of chloroplast in the guard cell was used for the identification of the ploidy level in tested, only in broccoli was found significantly difference.

Protoplast fusion between Chinese kale and broccoli was performed by using electrofusion method and cultured in PS (1981) medium supplemented with 2.25 mg/l NAA, 0.75 mg/l Zeatin and 0.5 M mannitol. After 7 days, number of viable fusant (69.38%) was not different from parental line Chinese kale (77.99%) and in broccoli (70.54%). The protoplast entered their first cell division three days after culture and the percentage of dividing cells increased after 3 days of culture. After 7 days, highest percentage of cell division was observed in Chinese kale (11.99%) whereas the percentage of cell division of broccoli and fusant were 8.05% and 3.67%, respectively. Fusants between Chinese kale and broccoli were tested on 4 media which were modified from PS (1981) medium. After 7 days, it was found that cell division rates of the fusants which were cultured in PS medium supplemented with 0.1 mg/l. 2,4-D, 0.1 mg/l NAA, 0.75 mg/l Zeatin and 0.5 M mannitol had the highest cell division rate at 9.7%