

Thesis Title	<i>Dendrobium</i> Protoplast Culture	
Author	Mrs. Kaewalin Kunasakdakul	
Doctor of Philosophy	Biotechnology	
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Prasartporn Smitamana	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Danai Boonyakiat	Member
	Lect. Dr. Nuttha Kuanprasert	Member
	Assoc. Prof. Dr. Nitsri Sangduen	Member
	Dr. Salak Phansiri	Member

ABSTRACT

Among ten of *Dendrodium* orchid varieties used in the study, *Dendrobium* Prathum Red was the most preferable used. Expanded young leaves of *in vitro* grown plantlets were effectively used for protoplast isolation. Isolation procedure was performed in mixed enzymes in concentration of 0.25%(w/v) Cellulase Onozuka R-10, 0.15% Macerozyme Onozuka R-10 and inorganic nutrient of 8P medium (Kao and Michayluk, 1975) in 0.5 M. mannitol as osmoticum substance. Overnight incubation in the dark was done. Rate of protoplast viability at 89.2% was found by staining with FDA (fluorescenediacetate). Maximum yield of 4.8×10^6 protoplasts per gram fresh weight was obtained. Orchid protoplasts were successfully cultured at a density of 5.0×10^5 protoplasts/ml in modified PS medium (Smitamana, 1981) supplemented with 0.5 ppm NAA, 0.4 ppm BAP, 0.5 ppm Zeatin, 0.2% sucrose, 0.1% glucose, 10 ppm cystein, 10 ppm tryptophan, 10 ppm proline, 2.5 ppm asparagine, 100 ppm arginine and 0.5 M. mannitol placed under dark condition for 4 days before being transferred to illuminated condition at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and 3,000 lx for 16 hrs per day. Protoplast growth was initiated by performing complete cell wall re-growth, complete cell wall formation which was observed by using calcofluor white staining after being cultured for 24 hours. Then an increase in cell volume and frequency of cytoplasmic streams occurred. First cell division usually appeared after 7-10 days of being cultured while the secondary division was very difficult to observe. However, micro-colonies at 4-5 cells were visible during the first month after the osmotic substance in the medium was gradually reduced. New liquid culture medium without osmoticum was substituted

every two weeks. Maximum plating efficiency of 1.33% was obtained during the two months of being cultured.

Embryogenic callus induction was performed on VW (Vacin and Went, 1949) basal salt medium supplemented with 0.1 ppm GA₃, 2 ppm NAA plus either 0.5 ppm kinetin or BAP and 0.5% activated charcoal and solidified with 0.35% Agarose type VII. Development of a nodular embryogenic like callus was observed after the two month culture period.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้สกุลหวาย	
ชื่อผู้เขียน	นางเกวณีน คุณาศักดากุล	
วิทยาศาสตร์คุณวุฒิปริญญา	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ประสาทพร สมิตะมาน	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. คณัย นุณยเกียรติ	กรรมการ
	อ. ดร. ณัฐา ควรประเสริฐ	กรรมการ
	รศ. ดร. นิตยศรี แสงเคื่อน	กรรมการ
	ดร. ศาลักษณ์ พรณศิริ	กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการทดลองเลี้ยง โปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้สกุลหวาย 10 ชนิด พบว่า *Dendrobium Prathum Red* ตอบสนองต่อการแยกและการเลี้ยงได้ดีที่สุด และพบว่าส่วนของพืชที่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อแยกโปรโตพลาสต์ได้แก่ส่วนของใบอ่อนที่คลี่เต็มที่ จากพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำมาย่อยในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 0.25 % Macerozyme Onozuka R-10 เข้มข้น 0.15% ผสม inorganic nutrient ของ อาหารสูตร 8P (Kao and Michaylux, 1975) ปรับระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการรักษา osmotic pressure ด้วย mannitol เข้มข้น 0.5 M. โดยการย่อยข้ามคืน พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ในปริมาณ 4.8×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักพืช 1 กรัม และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์ภายหลังการย้อมด้วย FDA (fluorescenediacetate) เท่ากับ 89.2 % สามารถเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ในอัตราความเข้มข้น 5.0×10^5 โปรโตพลาสต์ /มล ในอาหารสูตร PS (Smitamana, 1981) ชนิดอาหารเหลวที่มี NAA เข้มข้น 0.5 ppm, BAP เข้มข้น 0.4 ppm, Zeatin เข้มข้น 0.5 ppm, sucrose เข้มข้น 0.2%, glucose เข้มข้น 0.1%, cystein เข้มข้น 10 ppm, tryptophan เข้มข้น 10 ppm, proline เข้มข้น 10 ppm, asparagine เข้มข้น 2.5 ppm และ arginine เข้มข้น 100 ppm ในสารละลาย

ของ mannitol เข้มข้น 0.5 M. โดยเก็บโปรโตพลาสต์ไว้ในที่มีด นาน 4 วัน ก่อนนำมาเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ แสง ความเข้มแสงที่ 3,000 lx นาน 16 ชม/วัน ความชื้นประมาณ 75 % RH จากนั้นตรวจการสร้างผนังเซลล์ โดยการย้อมด้วยสาร calcofluor white พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์เสร็จสมบูรณ์ภายหลังการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้น โปรโตพลาสต์มีการขยายขนาดขึ้น และพบลักษณะของ cytoplasmic streaming ซึ่งแสดงถึงกิจกรรมการหมุนเวียนสารอาหารต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ชัดเจน พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรก หลังจากเลี้ยงแล้ว 7-10 วัน ส่วนการแบ่งเซลล์ครั้งที่สอง ตรวจพบได้ค่อนข้างยาก อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กประกอบด้วย 4-5 เซลล์ เมื่อมีการปรับลดระดับของสารที่ใช้รักษาความดันออสโมซิสลงภายหลังเลี้ยงนาน 1 เดือน ซึ่งการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่นั้นกระทำโดยการแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเดิมที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ไม่มี mannitol นอกจากนี้ยังพบการเจริญโดยเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไป จนมีลักษณะยาวรีคล้ายเซลล์แฉวนลอยทั่วไป ตรวจนับ plating efficiency ได้สูงสุดเท่ากับ 1.33 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการเลี้ยงนานประมาณ 2 เดือน

เมื่อนำกลุ่มเซลล์ไปกระตุ้นให้เกิดการสร้าง embryogenic callus โดยเลี้ยงในอาหาร VW (Vacin and Went , 1949) ที่มี GA_3 เข้มข้น 0.1 ppm NAA เข้มข้น 2 ppm BAP หรือ kinetin เข้มข้น 0.5 ppm และ activated charcoal 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมเป็นอาหารแข็งโดยใช้ Agarose type VII เข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากลุ่มของเซลล์นั้นสามารถเจริญและพัฒนาเกิดโครงสร้างของ embryogenic callus ได้ภายหลังการเลี้ยงนาน 2 เดือน