นิพนธ์ต้นฉบับ

การปรับปรุงเทคนิคการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนมังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Moosikapala, L. and Te-chato, S.
Improved technique for isolation and culture of protoplasts from young leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(2) : 217-225

Improved technique for isolation of protoplasts from young leaves of mangosteen was developed using dark treatment and varying ages of *in vitro*-grown leaves. In this experiment different kinds and concentrations of cellulase Onozuka R-10, macerozyme R-10 and pectolyase Y-23 were used. One gram fresh weight of leaf tissue was incubated in a 10 ml of enzyme solution and placed on a gyratory shaker at 40-50 rpm under darkness for 12 hours. Yield and viability of protoplasts were compared among those treatments, then the density was adjusted and cultured in MS medium supplemented with different kinds and concentrations of growth regulators. The results showed that 8 week-old leaves (after adding liquid culture medium) gave released protoplasts at 1.9×10^5/gram fresh weight (g fr wt.) This result was obtained when 2% cellulase

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1]วท.ม. (พืชศาสตร์) นักศึกษาปริญญาโท [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
Corresponding e-mail : tesompon@ratree.psu.ac.th
รับต้นฉบับ 15 พฤศจิกายน 2544 รับลงพิมพ์ 8 มกราคม 2545

Onozuka R-10, 1% macerozyme R-10 and 0.1% pectolyase Y-23 were used. Viability of the protoplasts was 77.63%. Pretreatment the leaves in the dark for 24 hours before being subjected to protoplast isolation resulted in the greatest release of protoplasts at 1×10^6/g fr wt. Viability of the protoplasts was also the highest (91.35%). The protoplasts at density of 5×10^5/ml could promote cell division at 3.41% in a thin layer of liquid MS with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ.

Key words : improved technique, isolation protoplasts, mangosteen

บทคัดย่อ

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และ สมปอง เตชะโต

การปรับปรุงเทคนิคการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จาก ใบอ่อนมังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(2) : 217-225

การปรับปรุงวิธีการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนมังคุดโดยการเตรียมใบในที่มืดก่อนการแยก และใช้ใบอายุต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 , macerozyme R-10 และ pectolyase Y-23 ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการอินคิวเบทใบสดหนัก 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มล บนเครื่องเขย่าแบบไปมาด้วยความเร็ว 50 รอบ/นาที ในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จึงนำมาแยกโปรโตพลาสต์ นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตเปรียบเทียบกัน จากนั้นปรับความหนาแน่น และเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ใบมังคุดอายุ 8 สัปดาห์ หลังเติมอาหารเหลว ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.9×10^5/กรัมน้ำหนักสด ให้ความมีชีวิตสูงสุด 77.63% เมื่อใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ marcerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% การเตรียมใบมังคุดโดยการเก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาแยกช่วยเพิ่มความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สูงถึง 1×10^6/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.35% เลี้ยงโปรโตพลาสต์มังคุดในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล ด้วยความหนาแน่น 5×10^5 มก/ล พบการแบ่งเซลล์สูงสุด 3.41%

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออก และได้ชื่อว่าเป็นราชินีแห่งผลไม้ เนื่องจากมีรสหวานชวนรับประทาน โดยปกติมังคุดขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ส่วนการขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ เช่น การติดตา เสียบกิ่ง มีข้อจำกัดเนื่องจากมังคุดมียางสีเหลืองมากซึ่งเป็นอุปสรรคในการประสานตัวของรอยต่อระหว่างกิ่งพันธุ์กับต้นตอ ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตต้นกล้ามังคุดได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ จากในและนอกหลอดทดลอง Te-chato และ Lim (1999) รายงานความสำเร็จในการชักนำยอดได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้นโดยใช้เมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังรายงานขั้นตอนในการขยายพันธุ์มังคุดโดยผ่านกระบวนการชักนำเมอริสเต็มมาติคโนดูลาแคลลัส (Te-chato and Lim, 2000)

โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ผ่านกระบวนการย่อยเอาผนังเซลล์ออกด้วยวิธีกลหรือการใช้เอนไซม์ยังคงเหลือเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้มส่วนต่างๆ ของเซลล์ไว้ โปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช ชิ้นส่วนที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ คือ ใบและเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากให้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการชักนำเซลล์ซัสเพนชันในมังคุดหรือพืชในสกุล *Garcinia* ยังไม่ประสบความสำเร็จ ยังคงมีเพียงรายงานการชักนำ friable callus จากการเพาะเลี้ยงเมล็ด

ในสกุล *Garcinia* บางชนิดโดย สมปอง และชวนพิศ (2543) อย่างไรก็ตามแคลลัสที่สร้างมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำและไม่สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชันได้ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชในสกุลนี้จึงมีเพียงการใช้ใบอ่อนในหลอดทดลองของมังคุด (Te-chato, 1998) ใบอ่อนส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) (Te-chato, 1997; ลัดดาวัลย์, 2543) และใบอ่อนมังคุด ส้มแขก และพะวา (Te-chato *et al*., 2000) นอกจากนี้ โปรโตพลาสต์ยังเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการปรับปรังพันธุ์ เช่น สร้างลักษณะที่ดีทางการเกษตร เพื่อต้านทานโรคในส้มพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอจำนวน 8 สายพันธุ์ (Louzada *et al*., 1992) การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างชนิดของพืชในสกุล *Garcinia* เพื่อย้ายลักษณะที่ดีจากพืชพันธุ์ป่า เช่น ลักษณะทนแล้ง สู่มังคุดสามารถเป็นไปได้ โดยเฉพาะโปรโตพลาสต์ส้มแขกซึ่งมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์ค่อนข้างสูง (Te-chato, 1997) การใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ของพืชสองหรือสามชนิด อาจมีการส่งเสริมกันทำให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ หรือได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการได้ นอกจากนี้อาจใช้โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือในการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญ เช่น ยีนทนแล้ง ทนเค็ม หรือต้านทานโรคและแมลงสู่มังคุดได้ แม้ว่า Te-chato (1998) ได้รายงานการแยกโปรโตพลาสต์มังคุดก็ตาม แต่ไม่ได้รายงานปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้น้อย ไม่เพียงพอต่อการศึกษาต่อไป ดังนั้นบทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยขั้นต้นในการแยกโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจำนวนมากให้เพียงพอต่อการศึกษาการเพาะเลี้ยงหรือพัฒนาการของโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนมังคุด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ใช้ใบอ่อนมังคุดจากกลุ่มยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.1 มก/ล เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) เติมน้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล NAA 0.06 มก/ล TDZ 0.03 มก/ล และ BA 0.03 มก/ล ปริมาตร 7.5 มล หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์ แล้วตัดใบมาแยกโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

หลังจากอินคิวเบทชิ้นส่วนใบในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำมากรองผ่านผ้ากรองมิราครอทฆ่าเชื้อขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ซม ผ่านไปยังหลอดปั่นขนาด 15 มล นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 800 รอบ/นาที นาน 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง ปริมาตร 5 มล ค่อยๆ ดูดเป่าให้เข้ากัน แล้วลอยบนสารละลายซูโครส 21% เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์ โดยปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากตอนกลางระหว่างแมนนิทอลและซูโครส แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2-3 ครั้ง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ ปรับความหนาแน่นด้วยอาหารเลี้ยงเพื่อเลี้ยงต่อไป

การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ใช้สารละลายโปรโตพลาสต์ 100 ไมโครลิตร ย้อมด้วย FDA (fluoresceindiacetate) 0.1% ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเท่ากัน ดูดเป่าให้เข้ากันในสไลด์หลุม ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ดูการเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงสีเขียว-เหลือง ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้แยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดอายุ 7 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 1 และ 2% แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1, 0.5 และ 1.0% เปรียบเทียบกับเอนไซม์ cellulase Onozuka RS 4% ร่วมกับ macerozyme R-10 2% และ pectolyase Y-23 1% โดยอินคิวเบทใบสด 1 กรัมในสารละลายเอนไซม์

ปริมาตร 10 มล บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 26±0.5°C นาน 12 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธีการที่กล่าวแล้วข้างต้น นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์

การศึกษาอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มังคุด

ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% แยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดที่ดูแลในอาหารสองชั้นเป็นเวลาต่างๆ คือ 4, 8, และ 12 สัปดาห์ หลังจากอินคิวเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5°C ทำการแยกโปรโตพลาสต์ นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่ละอายุใบ

การศึกษาการเตรียมใบมังคุดที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ใบอายุ 8 สัปดาห์ เตรียมใบมังคุดที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ 2 วิธี คือ ตัดใบแล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตัดใบแล้วแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกับใบสดที่ไม่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการใดๆ อินคิวเบทใบที่เตรียมด้วยวิธีการที่แตกต่างกันทั้ง 3 วิธีในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็ว 50 รอบ/นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์ บันทึกจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเตรียมใบ

การศึกษาความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์มังคุดด้วยความหนาแน่น 5×10^4, 1×10^5, 1.5×10^5, 2.5×10^5, 5×10^5, และ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล และสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ปิดจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 26±0.5°C บันทึกการสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นที่เลี้ยง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 หรือ 2 สัปดาห์

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมังคุดในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% สารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 มก/ล แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA 1.0 มก/ล ปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยง 3 มล และเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1, 2 และ 3 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล (เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล ค่าตัวแปรที่ใช้ในการเปรียบเทียบคือการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ (การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อ) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 หรือ 2 สัปดาห์

ผล

ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบมังคุด ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 หรือ cellulase Onozuka RS และ pectolyase Y-23 ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% ให้จำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด 5.6×10^5/กรัมน้ำหนักสด และ 65.63% ตามลำดับ (Table 1)

ผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบมังคุด อายุ 4, 8 และ 12 สัปดาห์ หลังการเติมอาหารเหลวด้วยเอนไซม์ cellu-

Table 1. Effect of various enzyme combinations on yield and viability of mesophyll protoplasts.

Enzyme (%)				Yield of protoplasts/g fr wt ($\times 10^5$)	Viability (%)
CRS	CR-10	MR-10	PY-23		
4	0	2	1	0.6	44.00
0	1	1	0.1	0.5	73.17
0	2	1	0.1	5.6	65.63
0	2	1	0.5	Burst, not purified	0.00
0	2	1	1	Burst, not purified	0.00

CR-10 = cellulase Onozuka R-10 **CRS = cellulase Onozuka RS**
MR-10 = macerozyme R-10 **PY-23 = pectolyase Y-23**

lase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที ในที่มืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ใบมังคุดอายุ 12 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 2.7×10^5/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 68.12% อย่างไรก็ตามมังคุดอายุใบ 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกัน คือ 1.9×10^5/กรัมน้ำหนักสด แต่ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 77.63% (Table 2)

Table 2. Effect of age of leaves on yield and viability of mesophyll protoplasts.

Age of leaves after overlay (weeks)	Yield of protoplasts/ g fr wt ($\times 10^5$)	Viability (%)
4	0.3	72.97
8	1.9	77.63
12	2.7	68.12

ผลของการเตรียมใบมังคุดที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดจากกลุ่มยอดที่เลี้ยงบนอาหารสองชั้นอายุ 10 สัปดาห์หลังจากเติมอาหารเหลว โดยใช้ใบที่ตัดไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือตัดใบแล้วแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกับใบสด โดยอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±0.5 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการตัดใบแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1×10^6/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.35% (Table 3, Figure 1)

ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อพัฒนาการของโปรโตพาสต์

การเลี้ยงโปรโตพลาสต์มังคุด ด้วยความหนาแน่นต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 7.69% เมื่อเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล อย่างไรก็ตามการแบ่งเซลล์เป็นแบบที่ไม่สมมาตรมีการแตกหน่อสูง 4.67% ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเพิ่มขึ้นเป็น 5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ใกล้เคียงกัน คือ 3.41 % (Table 4, Figure 2A) และมีการแตกหน่อต่ำ 2.57 % อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เหี่ยว เมื่อลดความเข้มข้นของออสโมติคัมลงเป็น 0.6 โมลาร์ พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เหี่ยวและไม่มีการพัฒนาใดๆ และตายในที่สุด (Figure 2B)

Table 3. Effect of leaf pretreatment on yield and viability of mesophyll protoplasts.

Leaf pretreatment	Yield of protoplasts/g fr wt ($\times 10^5$)	Viability (%)
No pretreatment (fresh leave)	1	80.49
Kept in the dark for 24 hr.	10	91.35
Soaked in the washing solution and kept in dark for 24 hr	Very few, not purified	-

- Not detected

Table 4. Effect of density of protoplasts in the culture on the percentage of normal division and budding at 7 days after culture.

Density (protoplasts/ml)	Normal division (%)	Budding(%)
5×10^4	4.05	3.43
1×10^5	6.55	4.76
1.5×10^5	7.69	4.67
2.5×10^5	5.72	4.45
5×10^5	3.41	2.57
1×10^6	2.45	0.00

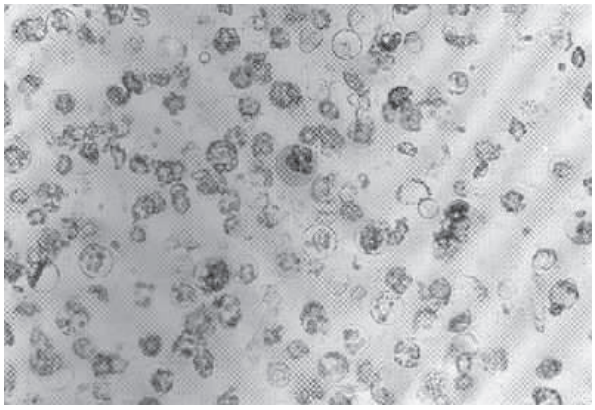

Figure 1. Fresh mesophyll protoplasts isolated from young leaves which pretreated in the dark for 24 hours before incubated with 2% cellulase Onozuka R-10, 1% macerozyme R-10 and 0.1% pectolyase Y-23 ($\times$ 300).

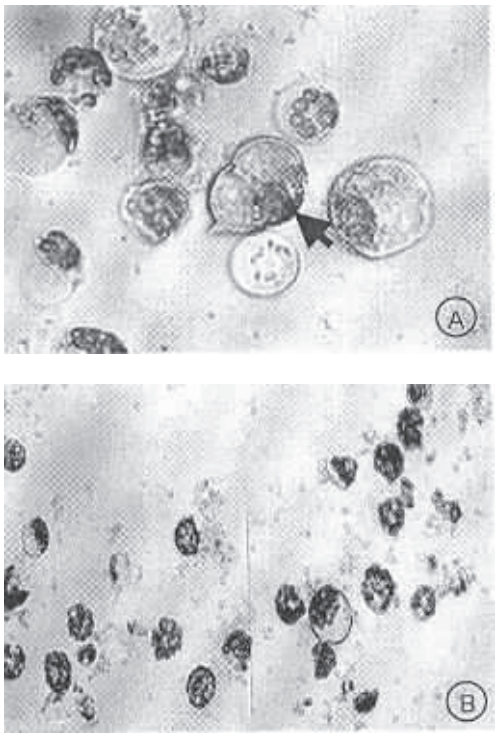

Figure 2. The culture of mesophyll protoplasts in MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l TDZ and 0.7 M mannitol at 5×10^5 protoplasts/ml
(A) first division at 7 days of culture (arrow) ($\times$ 300)
(B) plasmolysis at 2 weeks of culture ($\times$ 300)

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

หลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มังคุดในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ และเติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1, 1.5 และ

2 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล ด้วยความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล ส่วนใหญ่แตก และเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นส่งผลให้โปรโตพลาสต์แตกและตายหมดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล พบการแบ่งเซลล์ครั้งแรก 6.93% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่ NAA ร่วมกับ BA ทุกความเข้มข้น โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่แตก อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว เมื่อลดความเข้มข้นของออสโมติคัมเป็น 0.6 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ไม่มีพัฒนาการใดๆ และตายในที่สุด

วิจารณ์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของมังคุด Te-chato (1998) รายงานว่าโครงสร้างของใบมังคุดค่อนข้างเหนียว และมีองค์ประกอบของยางมาก ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้ยากจำเป็นต้องใช้เวลาในการอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์นานขึ้นหรือใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นและกิจกรรมสูง โดยเฉพาะ cellulase Onozuka RS และจำเป็นต้องใช้สารละลายเอนไซม์ pectolyase Y-23 ร่วมด้วย จากรายงานการแยกโปรโตพลาสต์ใบอ่อนสีแดงของมังคุดในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka RS 4% ร่วมกับ marcerozyme R-10 2% และ pectolyase Y-23 1% ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ เพียง 5×10^4/กรัมน้ำหนักสด ในขณะที่การศึกษานี้ ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2% ร่วมกับ macerozyme R-10 1% และ pectolyase Y-23 0.1% ให้จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดสูงกว่า (5.6×10^5/กรัมน้ำหนักสด) ที่รายงานโดย Te-chato (1998) จากความแตกต่างนี้ อาจเนื่องจากสารลายเอนไซม์ที่ใช้ คือ cellulase Onozuka R-10 เป็นอันตรายต่อเซลล์น้อยกว่า และแม้ว่าจะมีกิจกรรมต่ำกว่า cellulase Onozuka RS แต่มีความบริสุทธิ์กว่า นอกจากนี้ การเพิ่มระยะเวลาในการอินคิวเบทเป็น 12 ชั่วโมง ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นด้วย การเตรียมใบก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ในการศึกษานี้ พบว่า การตัดใบมังคุดไว้ในที่มืดก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด (1×10^6/กรัมน้ำหนักสด และ 91.35% ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าการแยกจากใบสดในหลอดทดลอง (1×10^5/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 80.49%) ส่วนการตัดใบแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่มีแมนนิทอลเป็นองค์ประกอบ 0.7 โมลาร์ ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดได้เลย ในขณะที่ Marchant และคณะ (1997) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบในหลอดทดลองของกุหลาบ (*Rosa hybrida* L.) พันธุ์ Abraham Darby และพันธุ์ Marie Pavie โดยแช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่มีแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ (CPW 13 M) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาแช่ในเอนไซม์ที่เหมาะสมว่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.55×10^6 และ 1.87×10^6/กรัมน้ำหนักสดตามลำดับ Webb และคณะ (1994) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนที่ไม่แผ่เต็มที่ของ *Lactuca perennis* โดยนำใบแช่ในสารละลาย CPW13M เพื่อให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซีส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วอินคิวเบทด้วยสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสม ก็สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงกว่าและให้ความมีชีวิตสูงกว่าด้วย โดยทั่วไปแล้วการเก็บใบในที่มืดหรือพลาสโมไลซีสในสารละลาย CPW ในที่มืดเป็นการลดการสังเคราะห์แสงทำให้การสร้างสารสังเคราะห์พวกน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสไปสะสมที่ผนังเซลล์ลดลง ทำให้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น จำนวนโปรโตพลาสต์มีมากด้วย อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ให้ผลดีในกรณีที่ตัดใบเก็บในที่มืด ส่วนการพลาสโมไลซีสให้ผลต่ำทั้งนี้เพราะมังคุด และพืชสกุลนี้มียาง เมื่อจุ่มแช่ ยางออกมาในสารละลาย CPW มากอาจก่อให้เกิดความเครียด อาจส่งผลให้มีการสร้างสารมาสะสมที่ผนังเซลล์ จึงทำให้ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เลย ในขณะที่การเก็บใบในที่มืดธรรมดานั้นยางจากส่วนผนังเซลล์ที่ไหลออกมาสูญหายออกไปจากใบเมื่อนำมาหั่นฝอยและจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์แล้ว ไม่มีปริมาณน้ำยางผสมในเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์จึงสูง ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้สูงกว่าการแยกจากใบสดมาก ดังนั้นในพืชที่มีการสร้างยางมากหากต้องการแยก

โปรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนมากจำเป็นต้องตัดใบเก็บไว้ในที่มืดก่อนนำมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้อายุของชิ้นส่วนที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวน ความมีชีวิตและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยงด้วย สมปอง (2530) รายงานว่า อายุของใบมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป Marchant และคณะ (1997) รายงานว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนกุหลาบให้จำนวนและความมีชีวิตสูงกว่าใบที่แผ่เต็มที่ Perales และ Schieder (1993) รายงานว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนแอปเปิ้ลหรือใบที่อยู่ในที่มีความเข้มแสงต่ำ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงกว่าที่แยกจากใบแผ่เต็มที่และใบจากยอดที่ดูแลภายใต้การให้แสงปกติ เนื่องจากแสงกระตุ้นให้มีการสร้างสารลิกนินและสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์อื่นๆ ทำให้เอนไซม์ย่อยใบได้ยาก ในการศึกษานี้ พบว่าแยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดอายุ 12 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 2.7×10^5/กรัม น้ำหนักสด ความมีชีวิต 68.12% ในขณะที่ใบอายุ 8 สัปดาห์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกันคือ 1.9×10^5/กรัมน้ำหนักสด แต่ให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุด 77.63% สำหรับใบที่มีอายุน้อยหรือมากกว่านี้ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากใบที่อายุน้อยเนื้อเยื่อของใบจะนุ่มเนื่องจากยังไม่มีการสะสมสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์มากนักทำให้รอยตัดไม่เรียบ นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นๆ ที่มีในเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์พวก protease หรือ nuclease ซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ด้วย ทำให้ใบได้รับความเสียหายมากขึ้น ในขณะที่ใบอายุมากมีการสะสมสารประกอบ พวก ลิกนิน ซูเบอร์ลิน และคิวติน ที่ผนังเซลล์ซึ่งยากแก่การย่อยด้วยเอนไซม์ในอัตรา ส่วนที่เหมาะสมนี้ Kao และ Michayluk (1975) รายงานว่า จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์มีการแพร่สารเมตาบอไลต์ที่สร้างลงในอาหารเลี้ยงและสารเหล่านี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน จากการศึกษานี้ เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มังคุดความหนาแน่น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล ในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 7.69% อย่างไรก็ตามมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อสูง 4.67% ในขณะที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล ให้การแบ่งเซลล์ใกล้เคียงกัน 3.41% และ มีการแตกหน่อต่ำ 2.57% และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มเหี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นระยะเวลานานขึ้น โปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์มีการแพร่สารเมตาบอไลต์ที่สร้างลงในอาหารเลี้ยงมากขึ้น หรือโปรโตพลาสต์มีการดูดน้ำ อาหาร เพื่อการแบ่งเซลล์ อาจส่งผลให้ระดับออสโมติคัมในอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง (เพิ่มขึ้น) ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปอาจมีการศึกษาการลดออสโมติคัม โดยการเติมอาหารเหลวที่ลดออสโมติคัมเพื่อให้โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาการต่อไป ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ พืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไป Te-chato (1998) รายงานว่า การใช้ BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล ซึ่งส่งเสริมการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วยังส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของมังคุดอีกด้วย เช่นเดียวกันในการศึกษานี้พบว่า การใช้ BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ครั้งแรกสูงสุด 3.41% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่ NAA ร่วมกับ BA ไม่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในโปรโตพลาสต์ของมังคุด ในขณะที่ Te-chato (1997) รายงานว่า การเติม 2,4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 5 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของใบส้มแขกสูงสุด 34.5% หลังการเลี้ยงนาน 7 วัน จากความแตกต่างนี้ อาจเนื่องจากใบอ่อนมังคุดมีองค์ประกอบของออกซินค่อนข้างสูง การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินลงในอาหาร ส่งผลให้ยับยั้งการแบ่งเซลล์หรือการสร้างแคลลัส (Te-chato, 1998) อย่างไรก็ตามบทความนี้รายงานถึงการแยกและเพาะเลี้ยงเริ่มต้นได้โปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเท่านั้น ต่อไปอาจมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น เช่น ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ ศึกษาการเติมอาหารเหลวเพื่อการลดออสโมติคัม หรือเติมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลลงในอาหารเลี้ยง เพื่อส่งเสริมการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชในสกุลส้มและมังคุด ซึ่งได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากงบประมาณประจำปี หมวดเงินอุดหนุนการวิจัย และต้องขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาแก่นักศึกษาปริญญาโทในสาขาพืชศาสตร์ด้วย

เอกสารอ้างอิง

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และสมปอง เตชะโต. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.). ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 : 411-420.

สมปอง เตชะโต. 2530. การพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอในแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของใบถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 9 : 153-158.

สมปอง เตชะโต และชวนพิศ นิยะกิจ. 2543. ผลของอายุผลและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสในพืชสกุล *Garcinia*. ว. เกษตร 16 : 31-45.

Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1975. Nutrition requirements for growth of *Vicia* hajastana cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126 : 105-110.

Louzada, E. S., Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Nielsen, Jr. B. and Chandler, J. L. 1992. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. Hort Science 27 : 1033-1036.

Marchant, R., Davey, M. R. and Power, J. B. 1997. Isolation and culture of mesophyll protoplast from *Rosa hybrida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50 : 131-134.

Perales, E. H. and Schieder, O. 1993. Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 71-76.

Te-chato, S. 1997. Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony. Songklanakarin J. Sci. Technol. 19 : 255-262.

Te-chato, S. 1998. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20 :15-20.

Te-chato, S. and Lim, M. 1999. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59 : 89-93.

Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. Scientia Horticulturae. 86 : 291-298.

Te-chato, S., Musigapala, L. and Lim, M. 2000. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Garcinia* spp. Proceedings of Annual Agricultural Seminar for Year 2000, January 2000 : 98-111.

Webb, C. L., Davey, M. R., Lucas, J. A. and Power, J. B. 1994. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Lactuca perennis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38 : 77-79.