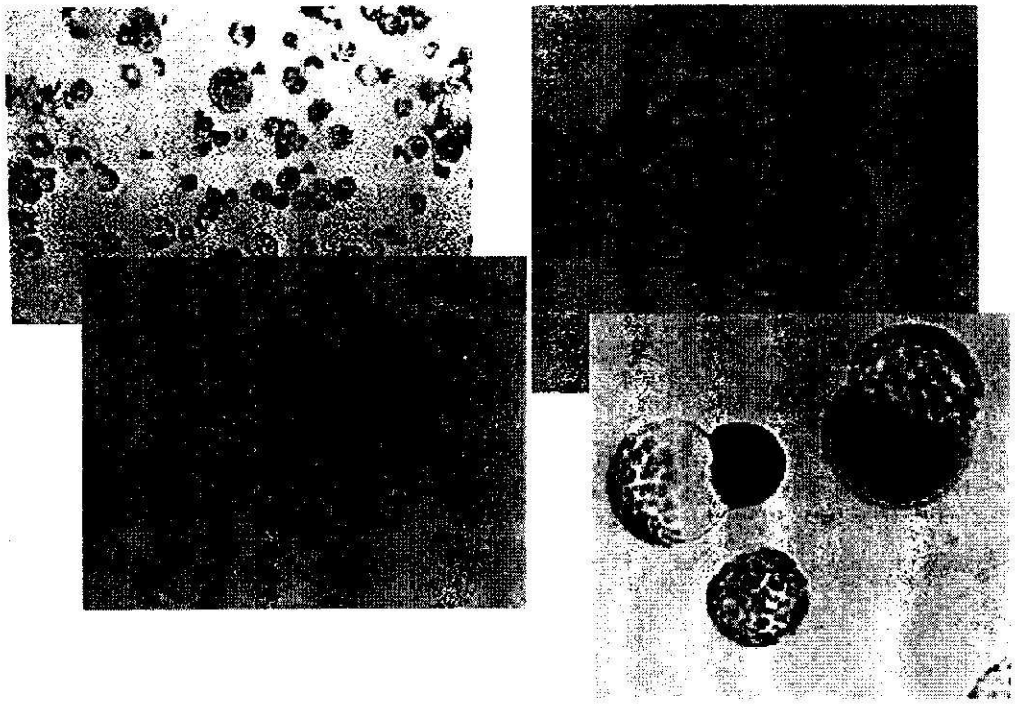
รายงานวิจัย

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลในตระกูลส้มและมังคุด

Isolation and Culture Protoplasts of *Citrus* and *Garcinia*



โดย

สมปอง เตชะโต

มงคล แซ่หลิม

[illegible]
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับแล้ว

ภาควิชาพืชศาสตร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1 เพื่อหาชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมที่ให้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก และมีความมีชีวิตสูงใช้เป็นเครื่องมือขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชดังกล่าว

2 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของมังคุดและส้มเพื่อชักนำการพัฒนาเป็นโคโลนี แคลลัส และพืชต้นใหม่ต่อไป

3 เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงการรวมโปรโตพลาสต์พืชในกลุ่มเดียวกันด้วยสารเคมี

สถานที่ทดลอง และ/หรือเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก เรือนระแนง และแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2541 ถึงเดือนกันยายน 2544 รวมเวลา 3 ปี

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. นำความรู้ที่ได้จากการวิจัยไปใช้ในการพัฒนาการสอนในระดับปริญญาตรี และโท วิชาเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก (510-401) และเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงของพืชปลูก (510-501)
2. ผลิตบัณฑิตในระดับบัณฑิตศึกษาจำนวน 3 คนโดยทำวิทยานิพนธ์ และนำออกเผยแพร่และนำเสนอในที่ประชุมสัมมนาทางวิชาการภายในประเทศ และนานาชาติจำนวน 6 เรื่องคือ
   2.1 Isolation and Culture of Protoplast of Somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to Microcolony
   2.2 Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts of Mangosteen
   2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.)
   2.4 Isolation and Culture of Mesophyll Protoplast of *Garcinia* spp.
   2.5 The Isolation, Culture and Division of Protoplasts from Shogun Leaves
   2.6 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมใบอ่อนและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

1. การเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อเตรียมใบอ่อน

ในขั้นต้นเป็นการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มในอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หลังจากนั้นเก็บรวบรวมใบที่แผ่เต็มที่จากต้นกล้าในหลอดทดลองมาหั่นฝอยใช้แยกโปรโตพลาสต์ ในกรณีของนิวเซลลาเอ็มบริโอย้ายไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS หรือ MT ดัดแปลงโดยการเติมน้ำตาล 5% สารสกัดจากมอลท์ และกรดอะมิโนเชิงซ้อนที่จำเป็นต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส นอกจากนี้อาจเติม BA เข้มข้น 5-10 มก./ล. ย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมเพื่อชักนำซัสเพนชันไว้ใช้แยกโปรโตพลาสต์ต่อไป

สำหรับมังคุด พะวา และส้มแขกทำการย้ายเลี้ยงกลุ่มยอดรวมขนาดเล็กไปเลี้ยงในอาหารสองชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA หรือ TU 0.1 มก./ล. ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติเติม NAA และ BA หรือ TDZ ระดับความเข้มข้นต่ำเพื่อชักนำใบอ่อนที่เหมาะต่อการแยกโปรโตพลาสต์

2 การแยกโปรโตพลาสต์

เก็บรวบรวมใบที่เตรียมจาก 1 มาหั่นฝอยชั่งน้ำหนักปรับให้ได้ 1 กรัม ในกรณีของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน ดูดตะกอนเซลล์ ปริมาตร 1 มล. อินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ ในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์มีการศึกษาปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ดังนี้คือ

2.1 <u>การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์</u> ในการศึกษานี้ใช้เซลลูเลสชนิดต่างๆ ที่มีจำหน่ายในรูปการค้าร่วมกับมาเซอโรไซม์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกัน เอนไซม์ทั้งสองใช้ร่วมกันในระดับความเข้มข้นต่างๆ ละลายในสารละลายออสโมติคัมซึ่งประกอบด้วยแมนนิตอล เข้มข้น 0.4-0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.8 ทำให้เอนไซม์ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองจุลินทรีย์หลังจากอินคูเบทกับใบหรือเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเป็นเวลาต่างๆ ทำการแยกโปรโพลาสต์มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างจำนวนและความมีชีวิต

2.2 การศึกษาชนิดของออสโมติคัม ในที่นี้จะใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่นแมนนิตอล ซอร์บิตอล ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์สำหรับเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน และ 0.7 โมลาร์ สำหรับใบ ใช้เอนไซม์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการศึกษาแรก นำมาละลายในสารละลายออสโมติคัมชนิดต่างๆ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.8 กรองฆ่าเชื้อแล้วนำไปอินคูเบทชิ้นส่วนพืช จากนั้นแยกโปรโตพลาสต์ นับจำนวนและความมีชีวิตเปรียบเทียบกันในระหว่างชนิดของออสโมติคัม

2.3 การศึกษาความเป็นกรดด่าง ใช้สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์ให้อยู่ในช่วง 5.4-

6.2 โดยเพิ่มขึ้นครั้งละ 0.2 หน่วย กรองฆ่าเชื้อสารละลายเอนไซม์ นำไปอินคูเบทแล้วนำมาแยกโปรโตพลาสต์ตรวจสอบจำนวน และความมีชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่ละค่าของความเป็นกรดด่าง

3. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์

หลังจากแยกโปรโตพลาสต์และทำให้โปรโตพลาสต์สะอาดปราศจากสิ่งเจือปนแล้วนำไปปรับความหนาแน่นต่างๆ แล้วเลี้ยงด้วยวิธีการเลี้ยงต่างๆ เช่นเลี้ยงเป็นหยดตั้ง หยดแขวน เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบางๆ 1-2 มล. ฝังเลี้ยงในอากาโรสแบบอากาโรสบีด หรืออากาโรสติส และฝังเลี้ยงในวุ้นเจลไรท์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ใหม่ การแบ่งเซลล์เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเลี้ยง ในระยะต่อมาเป็นการศึกษาวิธีการลดความเข้มข้นออสโมติคในอาหารเลี้ยงร่วมด้วยสารเติมบางชนิด เช่น ผงถ่าน หรือ PVP เพื่อส่งเสริมการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องจนได้แคลลัส หลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ตามที่พัฒนาไว้แล้วในการศึกษาที่ผ่านมาเพื่อส่งเสริมการสร้างพืชต้นใหม่ต่อไป

เนื่องจากการแยกโปรโตพลาสต์และหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อแยกโปรโตพลาสต์ที่มีความมีชีวิตสูง การพัฒนาการเลี้ยงในขั้นต้นต้องใช้เวลานาน ดังนั้นกิจกรรมที่เสนอขอข้างต้นอาจใช้เวลาส่วนใหญ่ในหัวข้อ 1-2 ส่วน 3 นั้นอาจทำได้เพียงบางส่วน อย่างไรก็ตามสำหรับหัวข้อที่ 2 โดยเฉพาะ 2.2 และ 2.3 ไม่ได้มีการศึกษามากนักทั้งนี้เพราะว่าการใช้สารละลายที่มีค่ามาตรฐาน เช่นสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ก็มีความเพียงพอต่อการแยกโปรโตพลาสต์ที่มีความมีชีวิตจำนวนมากเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงในการศึกษาต่อไปแล้ว คณะผู้วิจัยจึงคิดว่าไม่ได้ใช้ความพยายามในตรงนี้ จากการศึกษานี้พบว่าชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้เป็นปัจจัยหลักในการแยกโปรโตพลาสต์ของพืชในสกุลที่ทำการศึกษา รองลงมาเป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเป็นวัสดุเริ่มต้นในการแยกโปรโตพลาสต์ และคาดว่าจากข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาเดิมที่ได้เคยทำไว้สามารถนำมาปรับใช้และทำให้การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในครั้งต่อไปประสบผลสำเร็จได้เร็วยิ่งขึ้น

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony

Sompong Te-chato[1]

Abstract:

Te-chato, S.[1]

Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony

Songklanakarin J. Sci. Technol., 1997, 19(3) : 255-262

Young leaves of somkhag derived from culturing shoot tip with node *in vitro* were used as a source for isolation of protoplasts. The leaves were stripped and incubated in various combinations of cellulase Onozuka R10 and macerozyme R10. Incubation was carried out by gently shaking at 50 rpm on an orbital shaker under dim illumination. After incubation for 4 hours complete protoplasts were collected, their densities adjusted and then cultured in various types of culture medium containing various kinds and concentrations of phytohormones. The results showed that 1% cellulase R10 in combination with 2% macerozyme gave the highest yield of protoplasts, $2.6x10^6$ protoplasts/ml. Protoplasts started to change from globular to oval shape after 24 hour of culture and first division was obtained after 2 days of culture. Embedding the protoplasts in the Murashige and Skoog (MS) medium solidified with 0.2% Phytagel (Sigma) and containing 3% sucrose, 0.7M mannitol 0.5mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 5.0 mg/l benzyladenine (BA) gave the best results on division of protoplasts. Time consumed from culture to first division in this medium was also shorter than in other types of medium (liquidified and agarose containing medium). An optimal density for division was $1x10^5$ protoplasts/ml. In this medium protoplast-derived microcolony occurred after 21 days of culture while another types of culture medium fail to provide a further division.

Keywords : protoplast, somkhag, *Garcinia atroviridis*, microcolony, isolation and culture

[1]M.Agr.(Crop Biotech.) Assoc. Prof. Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Received, June 1997

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตสพลาสต์ส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) เป็นโคโลนีขนาดเล็ก

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2540 19(3) : 255-262

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนส้มแขกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่มีข้อรวมอยู่ด้วยในหลอดทดลอง ตัดใบอ่อนตามแนวขวางเป็นเส้นขนาดเล็กจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสอาร์ 10 และมาเซอโรมีไซม์อาร์ 10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ 10 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. วางบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสงความเข้มต่ำ หลังจากอินคูเบทเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแยกโปรโตพลาสต์มานับจำนวนเปรียบเทียบกัน ปรับความหนาแน่น และเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเซลลูเลสเข้มข้น 1% ร่วมด้วยมาเซอโรไซม์เข้มข้น 2% ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด 2.6×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนรูปร่างจากกลมเป็นรี และมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกให้เห็นอีก 24 ชั่วโมงต่อมา การเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารมูราชิกและสกุค (MS) เติมผงวุ้นไฟต้าเจล 0.2% น้ำตาลซูโครส 3% แมนนิตอล 0.7 โมลาร์ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติคแอซิด (2,4-D) ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และเบนซิลอะดินีน (BA) เข้มข้น 5.0 มก./ล. ส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวและการพัฒนาก็สั้นกว่าในอาหารประเภทอื่น ๆ (อาหารเหลว และอาหารเติมวุ้นอากาโรส) ความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงคือ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ในอาหารดังกล่าวส่งเสริมการสร้างโคโลนีขนาดเล็กได้หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ในขณะที่อาหารประเภทอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำการแบ่งเซลล์เกินระยะแรกไปได้

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and culture of mesophyll protoplasts of mangosteen

Sompong Te-chato[1]

Abstracts

Te-chato, S.

Isolation and culture of mesophyll protoplasts of mangosteen

Songklanakarin J. Sci. Technol., 1998, 20(1) : 15-20

Various concentrations and combinations of enzymes used for isolation mesophyll protoplasts of mangosteen was studied. Isolated protoplasts were cultured in medium supplemented with cytokinin alone or in combination with auxin. The results showed that 4% cellulase Onozuka RS, 2% macerozyme R10 and 1% pectolyase Y-23 provided the highest released protoplasts (5x104/ml). Those enzyme combinations were dissolved in 13% mannitol in the presence of mineral salts of MS (Murashige and Skoog) medium and 3 mM MES (2-morpholinoethylsulfonate). In the absence of pectolyase Y-23, an isolation of protoplast was not obtained. A higher number of divided protoplasts (1-2%) was obtained when they were cultured in 1-2 ml aliquot of MS medium supplemented with 13% mannitol, 0.5 mg/l BA (benzyladenine) and 0.5 mg/l TDZ (thidiazuron). Culture medium containing BA and NAA (naphthaleneacetic acid) retarded division of protoplasts. A large number of anthocyanin containing protoplasts started to divide faster than normal ones. Division of protoplasts was observed at 4 days after culture.

Key words : culture, isolation, mangosteen, mesophyll protoplasts, anthocyanin

M. Agr. (Crop Biotech.), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 901 12 Thailand.

Received 5 August 1997, accepted 15 October 1997

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบมังคุด

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(1) : 15-20

ทำการย่อยใบอ่อนสีแดงของมังคุดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส มาเซอโรไซม์อาร์ 10 และเพคโตไลเอสร่วมกันความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละความเข้มข้นร่วมใช้ปริมาตร 10 มล. เพื่ออิดิวเบทใบจำนวน 1 กรัม น้ำหนักสด การอินดิวเบทท่าในจานพลาสติคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. ที่ฆ่าเชื้อด้วยแก๊ซ หลังจากปิดด้วยพาราฟิล์มแล้ววางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสงต่ำ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองส่วนผสมของเนื้อเยื่อใบและสารละลายเอนไซม์ผ่านแผ่นกรองขนาดช่อง 60 ไมครอน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกโปรโตพลาสต์ จากวิธีการข้างต้น พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด $5x10^4$ เมื่อใช้ส่วนผสมของเซลลูเลส 4% มาเซอโรไซม์ 2% และเปคโตไลเอส 1% หากปราศจากเปคโตไลเอสแล้วไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เลย การแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ครั้งแรกปรากฏให้เห็นหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ เป็นเวลา 4 วัน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการแบ่งตัวคือสูตรมูราชิกและสกุดเติมน้ำตาลแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 3% เบนซิลอะดินีน 0.5 มก/ล และไธไดอะซูรอน 0.5 มก/ล การเติมกรดแนปธาลีนลงในอาหารเลี้ยงท่าให้การแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ลดลง อย่างไรก็ตามการชักนำการสร้างโคโลนีขนาดเล็กและแคลลัสยังกำลังศึกษาและดำเนินการอยู่

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

นิพนธ์ต้นฉบับ

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.)

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Moosikapala, L. and Te-chato, S.

Factors affecting isolation and culture of protoplasts of Somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(4) : 411-420

Isolation of protoplasts was carried out from vitro-grown leaves of Somkhag at different ages of culture. Various concentrations of cellulase Onozuka R-10 and macerozyme R-10 were tested. A sample of leaves was incubated in a mixture solution of the two enzymes on a gyratory shaker at 40 rpm under darkness for 12 hours. Various densities of released protoplasts were adjusted and cultured with different kinds and concentrations of growth regulator. Leaves at 3 months of culture incubated in 2 % cellulase Onozuka R-10 and 1 % macerozyme R-10 gave released protoplasts at $1.25x10^7$/g.fr.wt. Viability of protoplasts was the highest (91.19 %). Culturing of the protoplasts embedded in MS with 0.2 % Phytagel, 3 % sucrose, 0.7 M manitol, 0.5 mg/l dicamba and 1 mg/l benzyladenine (BA) promoted the best result in division of protoplasts. Age of leaves and culture density play important roles in development of the protoplasts. Protoplasts from leaves after one month of culture at density of $1.5x10^5$/ml underwent microcolony formation after 4 weeks of culture.

Key words : Somkhag, *Garcinia atroviridis* Griff., protoplast

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

[1]วท.บ. (เกษตรศาสตร์) นักศึกษาปริญญาโท, [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

Corresponding e-mail : tesompon@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 8 มีนาคม 2543 รับลงพิมพ์ 7 มิถุนายน 2543

บทคัดย่อ

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และ สมปอง เตชะโต

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(4) : 411-420

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนส้มแขกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้นบนอาหารสองชั้น เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ตัดใบตามแนวขวางเป็นเส้นขนาดเล็กจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka R-10 และ macerozyme R-10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มล บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบ/นาที ในที่มืด หลังจากอินคิวเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาแยกโปรโตพลาสต์ นับจำนวนเปรียบเทียบกัน ปรับความหนาแน่นและเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การใช้ใบที่มีอายุ 3 เดือนหลังเติมอาหารเหลว อินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % และ macerozyme R-10 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูง 1.25×10^7/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.19 % การเลี้ยงแบบฝังในอาหารสูตร MS เติม Phytagel 0.2 % น้ำตาลซูโครส 3 % แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ dicamba 0.5 มก/ล และ BA 1 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุด อายุของใบและความหนาแน่นในการเลี้ยงเริ่มต้นมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ คือเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบที่มีอายุ 1 เดือน ด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5/มล ในอาหารดังกล่าวส่งเสริมการสร้างโคโลนีขนาดเล็กได้หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Isolation and Culture of Mesophyll Protoplast of *Garcinia* spp.

Sompong Te-chato, Ludawan Musigapala and Mongkol Lim

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, 90112 Songkhla

Abstract

Young leaves of three species in *Garcinia mangostana* Linn. (mangosteen), *G. atroviridis* Griff. (somkhag) and *G. speciosa* Wall. (pawa) were stripped and digested enzymatically. Isolated protoplasts were cultured in various phytohormone-containing media. The results showed that 1% cellulase Onozuka R10 and 2% macerozyme R10 yielded the highest number of protoplasts ($2.6x10^6$/g fresh weight). In case of mangosteen and pawa, pectolyase Y-23 at concentration of 0.1% and the higher concentration of cellulase (3-4%) were required to produce high yields of protoplasts of mangosteen ($2.5x10^5$/g fresh weight) and pawa ($1.4x10^6$/g fresh weight). The highest frequency of protoplast division (34%) and earliest time for the first division (2 days) and macro-colony formation (3 weeks) was found in somkhag. For development of protoplasts of mangosteen and pawa, a period for the first division was 4-6 days after culture. So far, only first division was obtained both in mangosteen (2%) and pawa (6%) after 4weeks of culture. Further development of the protoplasts did not occur. 2,4-D in combination with BA promoted division of protoplasts of somkhag and pawa while TDZ and BA (only two cytokinins) promoted division of mangosteen protoplasts.

Keywords : mesophyll protoplast, *Garcinia* spp., somkhag, mangosteen, pawa

ORIGINAL ARTICLE

The isolation, culture and division of protoplasts from Shogun leaves

Sompong Te-chato[1] and Schlida Sriphakdi[2]

Abstract

Te-chato, S. and Sriphakdi, S.
The isolation, culture and division of protoplasts from Shogun leaves
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(2) : 143-151

High yields (6.6 x 10^5 to 1.1x10^6 protoplasts/g.f.wt.) of isolated protoplasts were obtained from seedling leaves of *Citrus sinensis* Blanco cv. "Shogun". Kinds and concentrations of enzyme, pH, physiological ages of the leaves, period of incubation and sources of leaves were important in obtaining high viability of preparations as determined by FDA fluorescence. Seedling leaves at 35 days after emerging or germination incubated in a mixture of enzyme solution composed of 1.5% cellulase (from *Trichoderma viride*) and 1.5% macerozyme R-10 dissolved in 0.7 M mannitol and adjusted pH 5.6 for 3-5 hours gave the highest yield and viability of protoplasts. The culture of mesophyll protoplasts in thin layer of liquid MS medium supplemented with 5 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 mg/l BA (adjusted osmoticum to 0.7M) under dark conditions at 25 ± 2 °C at densities of 2x10^5/ml promoted the highest division and microcolony formation (ca.8-10 cells) at approximately 4%. Adding malt extract to the medium did not improve plating efficiency of the protoplast.

Key words : protoplast isolation, Shogun, plating efficiency

[1]Ph.D. (Plant Cell Technology) Assoc. Prof., [2]M.S. (Plant Science) Master Student, Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.
Received, 22 September 1999 Accepted, 11 January 2000

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต และ ชลิดา ศรีภักดี
การแยก เพาะเลี้ยง และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน
ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(2) : 143-151

สามารถแยกโปรโตพลาสต์จำนวนมาก ($6.6x10^5$ ถึง $1.1x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด) ได้จากใบของต้นกล้าส้มโชกุน (*Citrus sinensis* Blanco cv. Shogun) โดยที่ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ อายุของใบ เวลาการอินคูเบชัน และแหล่งของใบที่นำมาใช้แยก มีผลต่อความมีชีวิตเมื่อตรวจสอบด้วยฟลูออเรสเซนไดอะซีเดท ใบจากต้นกล้าอายุ 35 วันหลังจากงอก ให้จำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิตสูงสุดเมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส (จากเชื้อ *Trichoderma viride*) เข้มข้น 1.5% ร่วมกับมาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5% ซึ่งละลายในแมนนิตอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง การเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นชั้นบาง ๆ ในอาหารเหลวสูตรมูราชิเกะและสกูคเติมกรดแนปธาลีนอะซิติค (NAA) 5 มก./ล. และเบนซิลอะดินีน (BA) 1 มก./ล. (ปรับความดันออสโมติคัมเป็น 0.7 โมลาร์) ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25±2 °C ด้วยความหนาแน่น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์/มล. ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้สูงสุด ในอาหารสูตรดังกล่าวสามารถชักนำการสร้างโคโลนีขนาดเล็ก ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวน 8-10 เซลล์ ประมาณ 4% การเติมสารสกัดจากมอลท์ลงไปในอาหารเลี้ยงไม่ช่วยเพิ่มการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

พิมพ์ต้นฉบับ

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*

โสภา ทวีคณะโชติ[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Taweekanachote, S. and Te-chato, S.

Factors affecting isolation of protoplasts of neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) and gene transformation by *Agrobacterium*

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(1) : 15-23

Protoplasts of the neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) were isolated from various sources. One-month-old leaves from all sources were stripped and incubated in various combinations of enzymes for 2, 3 and 4 hours on a reciprocal shaker at 40 rpm. For transformation study, leaf protoplasts were used to co-culture with *Agrobacterium*, at different periods. The results showed that leaves derived from seedling gave the highest number of mesophyll protoplasts (3.07×10^7 protoplasts/g. fr. wt.). However, leaves from cultured epicotyl gave the highest viability of the protoplasts of 89.19%. An optimum enzyme combination for the best result was consisted of 1.5% Cellulase Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23 and 1.0% Macerozyme R-10 dissolved in 0.7 M mannitol. Incubation periods of 3 hours gave the highest yields and viablity of protoplasts of

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

[1]วท.ม. (พืชศาสตร์) นักศึกษา [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

รับต้นฉบับ 7 กันยายน 2542 รับลงพิมพ์ 28 ตุลาคม 2542

9.20x10^6 protoplasts/g fr. wt. and 81.43%, respectively. In comparison of the first with the second pairs of leaves, it was found that the number of viable protoplasts was not significantly different. Transformation study showed that co-cultivation of protoplasts with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) for 5 minutes gave the highest survival rate of 64% at 72 hours of culture. However, division of protoplasts was not seen.

Key words : *Citrus reticulata* Blanco, citrus, protoplasts, transformation, co-culture, *Agrobacterium*

บทคัดย่อ

โสภา ทวีคณะโชติ และ สมปอง เตชะโต

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(1) : 15-23

แยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) จากแหล่งต่าง ๆ โดยนำใบอายุ 1 เดือน มาทั่นฝอยแล้วอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าเป็นไปมาที่ความเร็ว 40 รอบ/นาที สำหรับการปลูกถ่ายยีนทำโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลาต่าง ๆ จากผลการศึกษา พบว่า ใบจริงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 3.07x10^7 โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีความมีชีวิตสูงสุด 89.17% เมื่อแยกด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะ-อาร์เอส เข้มข้น 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1.0% เอนไซม์ดังกล่าวละลายอยู่ในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ การอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด 9.20x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด และ 81.43% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 พบว่า ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับการปลูกถ่ายยีนโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) เป็นเวลา 5 นาที ให้ความมีชีวิตรอดมากที่สุด 64% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์

สารบัญ

ลำดับเรื่องที่	ชื่อเรื่อง	หมายเลขเรื่อง
1	Isolation and Culture of Protoplast of Somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to Microcolony	1-1
2.	Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts of Mangosteen	1-2
3	ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.)	1-3
4	Isolation and Culture of Mesophyll Protoplast of *Garcinia* spp.	1-4
5.	The Isolation, Culture and Division of Protoplasts from Shogun Leaves	1-5
6	ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*	1-6

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony

Sompong Te-chato[1]

Abstract:

Te-chato, S.[1]

Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony

Songklanakarin J. Sci. Technol., 1997, 19(3) : 255-262

Young leaves of somkhag derived from culturing shoot tip with node *in vitro* were used as a source for isolation of protoplasts. The leaves were stripped and incubated in various combinations of cellulase Onozuka R10 and macerozyme R10. Incubation was carried out by gently shaking at 50 rpm on an orbital shaker under dim illumination. After incubation for 4 hours complete protoplasts were collected, their densities adjusted and then cultured in various types of culture medium containing various kinds and concentrations of phytohormones. The results showed that 1% cellulase R10 in combination with 2% macerozyme gave the highest yield of protoplasts, $2.6x10^6$ protoplasts/ml. Protoplasts started to change from globular to oval shape after 24 hour of culture and first division was obtained after 2 days of culture. Embedding the protoplasts in the Murashige and Skoog (MS) medium solidified with 0.2% Phytagel (Sigma) and containing 3% sucrose, 0.7M mannitol 0.5mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 5.0 mg/l benzyladenine (BA) gave the best results on division of protoplasts. Time consumed from culture to first division in this medium was also shorter than in other types of medium (liquidified and agarose containing medium). An optimal density for division was $1x10^5$ protoplasts/ml. In this medium protoplast-derived microcolony occurred after 21 days of culture while another types of culture medium fail to provide a further division.

Keywords : protoplast, somkhag, *Garcinia atroviridis*, microcolony, isolation and culture

[1]M.Agr.(Crop Biotech.) Assoc. Prof. Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Received, June 1997

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตสพลาสต์ส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) เป็นโคโลนีขนาดเล็ก

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2540 19(3) : 255-262

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนส้มแขกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดที่มีข้อรวมอยู่ด้วยในหลอดทดลอง ตัดใบอ่อนตามแนวขวางเป็นเส้นขนาดเล็กจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสอาร์ 10 และมาเซอโรมีไซม์อาร์ 10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการอินคูเบทในสารละลายเอนไซม์ 10 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. วางบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที ภายใต้การให้แสงความเข้มต่ำ หลังจากอินคูเบทเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแยกโปรโตพลาสต์มานับจำนวนเปรียบเทียบกัน ปรับความหนาแน่น และเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเซลลูเลสเข้มข้น 1% ร่วมด้วยมาเซอโรไซม์เข้มข้น 2% ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด 2.6×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนรูปร่างจากกลมเป็นรี และมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกให้เห็นอีก 24 ชั่วโมงต่อมา การเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารมูราชิกและสกุค (MS) เติมผงวุ้นไฟต้าเจล 0.2% น้ำตาลซูโครส 3% แมนนิตอล 0.7 โมลาร์ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติคแอซิด (2,4-D) ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และเบนซิลอะดินีน (BA) เข้มข้น 5.0 มก./ล. ส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวและการพัฒนาก็สั้นกว่าในอาหารประเภทอื่น ๆ (อาหารเหลว และอาหารเติมวุ้นอากาโรส) ความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงคือ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ในอาหารดังกล่าวส่งเสริมการสร้างโคโลนีขนาดเล็กได้หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ในขณะที่อาหารประเภทอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำการแบ่งเซลล์เกินระยะแรกไปได้

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) belongs to the family Guttiferae which includes some economically improtant species e.g. *G. mangostana* Linn. (mangosteen), *G. speciosa* Wall. (pawa), *G.cowa* Roxb.(chamuang) and *G. dulcis* Kurz. (mapood) etc.. The trees can grow well under humid conditions and are generally found at the same place as commercially grown of mangosteen. These species are distributed widely in the three southernmost provinces of Thailand, Yala, Pattani and Narathiwat. Small numbers are found scattered in other provinces, e.g. Songkhla, Satun, Nakhon Si Thammarat. All non-commercial species in this family are grown as backyard plants and also grow naturally in their original area. Fruits of somkhag, both fresh and dried, are used for cooking. The fruit, sliced into small pieces and dried under the sun, can be stored for a long period of time (2-3 years or more) and this is routinely carried out by growers. The fruits naturally contain an important chemical, known as hydroxy citric acid. This chemical is able to convert lipid (fatty acid) to unsaturated fatty acid which is not stored in the form of fat tissue. Because of this properties of the chemical, many companies are attempting to extract the chemical from these fruits to produce some dietary products. In nature, two types of plants are found, male and female. Unlike mangosteen, the plants bear only female flowers (unpublished data). In case of male plants, they never produce fruits. Accordingly, the grower must be careful to select only female seedlings to grow.

Propagation of the plants is routinely carried out by seed and on some occasions by root cutting. When propagating through seeds it is quite not sure that female plants will be obtained. The latter technique is limited due to the propagation rate obtained and time consumed. Regarding these constraints, tissue culture might help solve many of the problems as has been reported for gooseberry (Shen *et al.*, 1990), *Prunus spp.* (Predieri *et al.*, 1989) and

Pyrus communis (Mante *et al.*, 1989). Firstly, tissue culture can help micropropagation of an elite tree in a short time. Second, it helps the establishment of cell suspension and its modification to produce secondary metabolites, especially hydroxy citric acid for commercial use. There have been no recent reports on cell suspension culture in any species of *Garcinia*. Among three species of *Garcinia*, mangosteen, pawa and somkhag, it was revealed that friable callus could be induced from somkhag. So far, suspension is still very difficult to establish. Cell culture of the tree becomes an excellent source for secondary metabolites which will be produced year-round. So far, cell suspensions have been being initiated from callus which was induced from various sources of explants (Te-chato, 1997). But the good cell suspension was not obtained. Mesophyll protoplasts might be monitored as an alternative source for establishing the suspension.

In this paper, the author reports protoplast isolation and culture from somkhag leaves in order to establish cell suspension and further regeneration.

Materials and Methods:

Plant material: Seeds of somkhag were excised and the seed coat and vascular tissue removed. The seeds were surface-sterilized by 20% clorox solution for 20 minutes, followed by successive washing for three times with sterile distilled water. The seeds were then sown on Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose and 5 mg/l benzyl adenine (BA). After a month of culture, shoot tips with node were dissected and micropropagated on micropropagation medium. The medium was woody plant medium (WPM) supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l poly-vinylpyrroridone (PVP), 0.1 mg/l BA and 0.1 mg/l thiourea (TU). Two to four weeks after culture, half strength liquid MS containing 500 mg/l PVP, 0.06 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA), 0.03 mg/l BA was added and cultured for a further 2-4 weeks. The leaves derived from multiple shoots were cut off and used as plant material for protoplast isolation and culture.

Enzyme solution: In this experiment, cellulase Onozuka R10 and macerozyme R10 were combinely used at various concentrations. All combinations of those enzymes were dissolved in 0.7M mannitol in the presence of major and minor salts of MS and 3mM 2- (morpholino) ethane sulfonic acid (MES). The pH of the solution was adjusted to 5.7 by 0.1N KOH. Sterilisation of the enzyme solution was carried out by passing through sterilised Millipore filter of pore size 0.45 μ.

Washing solution: Washing solution was composed of 0.7 M mannitol, major and minor salts of MS. The pH of the solution was adjusted to 5.7 before autoclaving at 1.07 kg/cm^2, 121°C for 15 minutes.

Purified solution: We used two-phase layer technique to isolate protoplast. According to the processes, 21% sucrose was selected and used as the lower phase solution. The solution was sterilised by autoclaving at 1.07 kg/cm^2, 121°C for 15 minutes.

Protoplast isolation: One gram leaf tissue was stripped and incubated in 6x1.5cm Petri-plate containing 10 ml of various enzyme combinations. Incubation was carried out under dim illumination on a shaker which was shaken at 50 rpm for 4 hours. At the end of the incubation period, the mixture of enzyme solution and leaf protoplasts was passed through a nylon mesh with pore size 77μ and centrifuged at 800 rpm for 3 minutes. Supernatant (enzyme solution above the pellet) was discarded and the pellet was resuspended in 5 ml washing solution. Crude protoplast suspension together with debris was then floated on 5 ml purified solution. The two-phase solution was again centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes. Complete protoplasts at the mid phase between sucrose and mannitol were collected by Pasteur Pipette and transferred to a new centrifuge tube. The protoplasts were washed two times with washing solution and washed once with culture medium. They were then counted and the density adjusted to culture in various methods.

Protoplast culture: After adjusting protoplasts to the desired density, they were cultured in 6x1.5 cm Petri-plates containing various types of culture media and plant growth regulators. They were then

maintained in the dark at 26°C. After 21 days of culture one ml of fresh liquid medium containing 0.35M mannitol was added and cultured at the same conditions for 2-3 weeks.

Effect of various combinations of enzymes on yield of protoplasts

Cellulase Onozuka R10 at concentration 1 to 2% and macerozyme R10 at the same concentration were used in combination for isolation of mesophyll protoplasts of somkhag (Table 1). After incubating one gram leaf tissue in enzyme solution for a 4 hour period, protoplasts were isolated according to isolation processes and the numbers of released protoplasts were compared statistically.

Effect of plant growth regulators on division of protoplasts.

MS medium was used in the presence of various combinations between NAA or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and BA (Table 1 and 2). Protoplasts at density of $1x10^5$ were resuspended in those media and placed in 6x1.5cm Petri-plates. During the culture, development of protoplasts was observed every day using an inverted microscope. The number of divided protoplasts was counted and compared in each culture medium at 3 week of culture.

Effect of protoplast densities and types of culture media on division of protoplasts.

Two types of culture media, liquid and solid medium, were employed to test the division of

Table 1 Effect of various enzyme combinations on yield of mesophyll protoplasts

Enzyme (%)		average yield of protoplasts
Cellulase R-10	Macerozyme R-10	
1.0	1.0	$1.45x10^4$c
1.0	1.5	$2.0x10^6$a
1.0	2.0	$2.6x10^6$a
2.0	1.0	$9.0x10^5$b
2.0	1.5	$9.5x10^5$b
2.0	2.0	$2.4x10^6$a

Average not having letters in common differ significantly (P=0.05) by DMRT

Table 2 Effect of NAA and BA at various concentrations on division of protoplasts.

plant growth regulators		% protoplast division	
NAA (mg/l)	BA (mg/l)	day 7	day 14
0.5	0.5	1.0	6.5
	1.0	3.5	8.5
	3.0	1.5	6.5
	5.0	5.5	10.5
1.0	0.5	2.75	7.5
	1.0	0	0
	3.0	0	0
	5.0	0	0

protoplasts. In case of solid medium, the medium was solidified by two different gelling agents, 0.6% agarose and 0.2% Phytagel (Sigma). Density of the protoplasts was varied and cultured under the same conditions as those described in the former two experiments. After culture for 3 weeks, division of protoplasts was counted and compared in each density and type of culture medium separately.

Results

Effect of various combinations of enzymes on yield of protoplasts

Cellulase Onozuka R10 at low concentration of 1% in combination with 1.5 to 2.0% macerozyme R10 was enough to macerate leaf tissue and release mesophyll protoplasts (Table 1). Increase in concentration of the cellulase from 1% to 2% was not proved to promote a large number of released protoplasts whereas macerozyme R10 at higher concentration play a significant role on yield of protoplasts. However, 1% cellulase Onozuka R10 in combination with 2% macerozyme R10 gave the best result on yield of protoplasts (Table 1).

Effect of plant growth regulators on division of protoplasts.

Types of auxin used in culture of protoplasts played a significant role on division of protoplasts. A low concentration of NAA at 0.5 mg/l in combination with BA at all concentrations ranging from 0.5 to 5.0 promoted an increment in division of the protoplasts (Table 2). NAA at concentration of 1.0 mg/l in combination with BA at concentration higher than 0.5 mg/l produced an inhibitory effect on division of protoplasts. Division of protoplasts from those combinations of NAA with BA was not obtained. Different results were obtained when auxin in the presence of 2,4-D was applied. 2,4-D provided far greater percentage of division of protoplsts than did NAA both in frequency and time consumed. Optimum concentrations of 2,4-D and BA were 0.5 and 5.0 mg/l, respectively (Table 3). In the medium containing 2,4-D, first division of protoplasts was able to see at day 2 of culture (Figure. 1a). After culture for 3 days, division of protoplasts was recorded to be 2% and this greatly increased to 34.6% at one week of culture (Table 3). Even a high concentration of 2,4-D and BA still provided division of protoplasts but percent division was far lower than at low concentrations.

Effect of protoplast densities and types of culture media on division of protoplasts.

It was clearly seen that low density of protoplasts provided a low frequency of division. Density of $1x10^5$ gave the best result on protplast divison when they were embedded in Phytagel (Table 4). Similar results were obtained in all types of cultures. Time consumed for wall formation, first divison and further division of protoplasts differed greatly between the two types of culture media. Embedding protoplasts by using Phytagel promoted

Table 3 Effect of various concentrations of 2,4-D and BA on division of protoplasts.

plant growth regulators 2,4-D (mg/l)	% protoplast division		
	BA (mg/l)	day 3	day 7
0.5	0.5	1.6	27.7
	1.0	1.3	22.5
	3.0	1.5	26.0
	5.0	2.0	34.5
1.0	0.5	0.6	10.4
	1.0	1.0	17.3
	3.0	1.0	17.3
	5.0	1.0	17.3

Table 4 Effect of density of protoplasts in culture on percentage and types of division.

gelling agent	density			types of division
	$5x10^4$	$1x10^5$	$5x10^5$	
0.6 %Agarose	1.3	3.5	5.6	symmetric
0.15% Phytagel	6.5	18.0	2.6	asymmetric

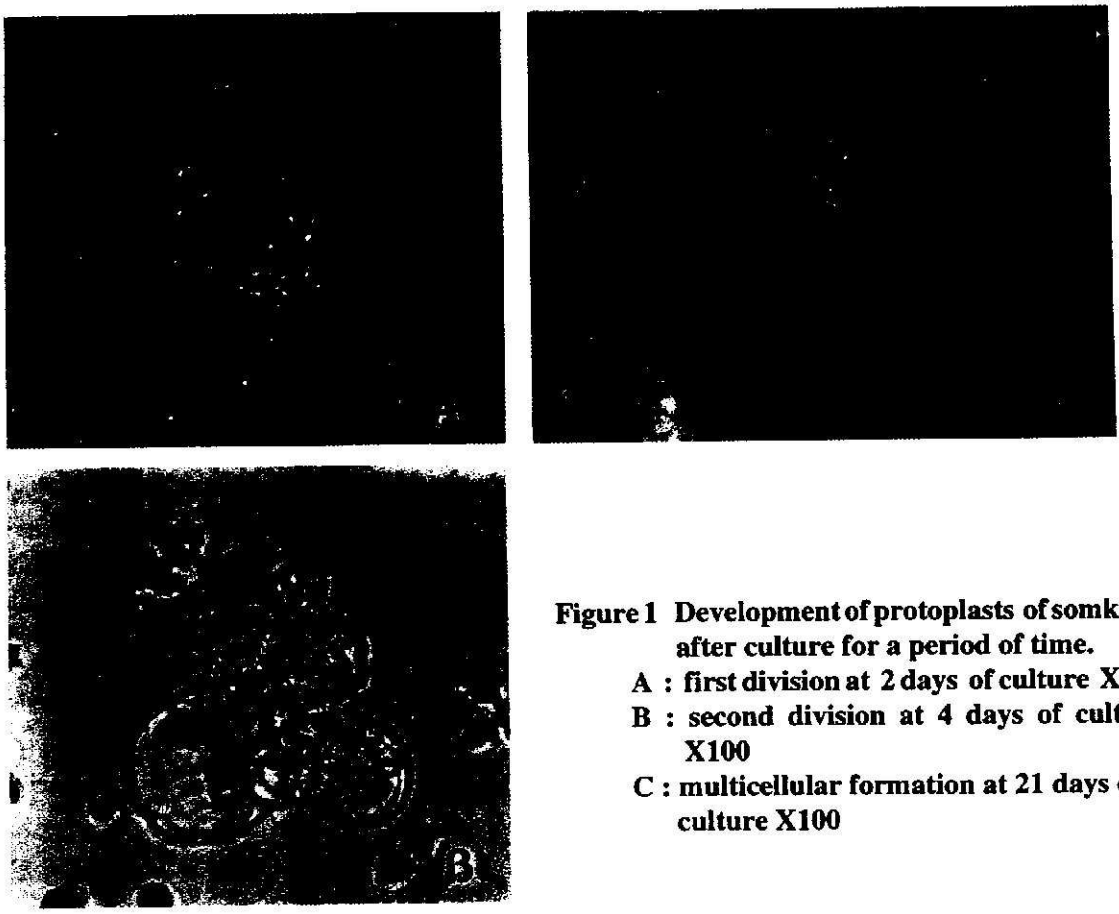


Figure 1 Development of protoplasts of somkhag after culture for a period of time.
A : first division at 2 days of culture X100
B : second division at 4 days of culture X100
C : multicellular formation at 21 days of culture X100

a rapid division of protoplasts. Divided protoplasts were observed in the medium within 1 to 3 days of culture while culture in liquid and solid medium solidified with agarose took 7-10 days. Division of protoplasts obtained in medium solidified with agarose was mostly symmetric whereas Phytagel promoted asymmetric division. (Table 4) Second division of the protoplasts in the medium solidified with Phytagel required 5-7 days of culture (Figure. 1b). Microcolony or multicellular formation (more than 10 cells) was obtained in the culture medium solidified with Phytagel only (Table 5, Figure. 1c) . The other types of culture medium, so far, have not provided more than two cell division.

Table 5 Time consumed for division and development of protoplasts in various types of cultures

types of culture	time consumed (day) for		
	1st division	2nd division	>2nd division
liquid embedding	7-10	-	-
-Agarose	7-10	21	-
-Phytagel	1-3	5-7	10-14

Discussion

Tissue culture of *Garcinia* spp. has been developed for at least five years. Most of the techniques focused on micropropagation through culturing seeds and young leaves. Species being studied are limited to commercial varieties, i.e. mangosteen. The other wild types of these species are necglected. However, the future improvement of mangosteen by biotechnological methods is inevitably to use germplasm from wild species. Even though many researchers have been interested in mangosteen, callus and cell suspension cultures have not yet been reported and established, thus hindering the improvement of this fruit tree through cell culture. Raj Bhansali *et al.* (1991) reported success in the establishment of cell suspension culture from immature cotyledon of peach. This success opened a wide scope for improvement of the fruit tree by biotechnological methods. However, among those fruit trees, citrus has been widely reported on protoplast isolation, culture and fusion to produce somatic hybrid both in cultivated and rootstock species (Grosser, 1991; Deng *et al.*, 1992). So far, many authors reported success in protoplast isolation and culture to plantlets in citrus (Hidaka and Kajiura, 1988; Kobayashi *et al.*, 1989; Vardi *et al.*, 1975; Vardi *et al.*, 1982). Besides citrus, there are also reports on protoplast isolation and culture in *Prunus*, *Pyrus* and *Diospyros*. Sources of protoplasts differ from species to species. In the case of satsuma, embryogenic callus from nucellar embryo proved to be the best source (Ling *et al.*, 1990). However, leaves are another good source of protoplast, especially when somatic cell fusion is employed. In case of *Garcinia*, so far, leaves appear to be a good source for isolation protoplasts due to no other good sources as mentioned earlier. Texture and components of leaves in each species of the genus are quite different leading to a degree of difficulty on isolation protoplasts. Mangosteen leaves are very tough and composed of a large quantity of yellow gum. Isolation of protoplasts from the leaves required a long time and a high concentration of enzyme components, especially pectolyase Y23 (data not shown). The results obtained in mangosteen differed greatly from that in somkhag (*Garcinia atroviridis*). A large number of protoplasts (2×10^6 protoplasts/ml) was isolated from young leaves raised *in vitro* like those reports in another fruit trees. Development of the protoplasts was also fast. New wall formation was observed within 24 hour of culture followed by first division 24 hour later. In suitable culture medium protoplasts can undergo division to form multicellular or microcolonies at 21 days of culture. Unfortunately, macrocolony and callus was not obtained. From the observation in culture, it was clearly seen that a long time of culture promoted a large volume of vacuole instead of macrocolony development. This phenomenon is generally observed in culture of protoplasts of perennial tree. To prevent this phenomenon and promote further development of protoplasts in order to gain callus some antioxidant or phenolic compound inhibitants, e.g. polyvinylpyrroridone or activated charcoal, must be added to the dilution medium after a period of culture.

References

Deng, X.X., Grosser, J.W. and Gmitter Jr, F.G. 1992. Intergenerics ornatic hybrid plants from protoplasts fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar Meiwa with *Citrus sinensis* cultivar Valencia. Scientia Horticulturae 49 : 55-62.

Grosser, J.W. 1991. Hybrid root stocks from cell fusion offer great potential. Citrus Industry 41-42.

Hidaka, T. and Kajiura, I. 1988 Plantlet differentiation from callus protoplast induced from citrus embryo. Scientia Horticulturae 34 : 85-92.

Kobayashi, S. and Ohgawara, T. 1988. Production of somatic hybrid plants through protoplast fusion in citrus. J. Agr. Rev.Quart. 22 : 181-188.

Ling, J., Nito, N., Iwamasa, M. and Kunitake, H.1990. Plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic callus of satsuma. HortScience 25 : 970-972.

Mante, S., Scorza, R. and Cordts, J.M. 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica, Prunus domestica,* and *Prunus cerasus.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19 : 1-11.

Predieri, S., Fasolo Fabbri Malavasi, F., Passey. A.J., Ridout, M.S. and James, D.J. 1989. Regeneration from *in-vitro* leaves of Conference and other pear cultivars (*Pyrus communis*). Journal of Horticultural Science 64 : 553-559.

Raj Bhansali, R., Driver, J. and Durzan, D.J. 1991. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Prunus persica* (L.). Journal of Horticultural Science 66 : 601- 605.

Shen, X., Wan, J. and Luo, W. 1990. Propagation *in vitro* of chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*) through the development of axillary buds. Scientia Horticulturae 42 : 45-54.

Vardi, A., Spiegel-Roy, P. and Galun, E. 1975. Citrus cell culture: Isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagenes and regeneration of embryos. Plant Science Letters 4 : 231-236.

Vardi, A., Spiegel Roy, P. and Galun, E. 1982. Plant regeneration from citrus protoplasts : Variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Applied Genet. 62 : 171-176.

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and culture of mesophyll protoplasts of mangosteen

Sompong Te-chato[1]

Abstracts

Te-chato, S.

Isolation and culture of mesophyll protoplasts of mangosteen

Songklanakarin J. Sci. Technol., 1998, 20(1) : 15-20

Various concentrations and combinations of enzymes used for isolation mesophyll protoplasts of mangosteen was studied. Isolated protoplasts were cultured in medium supplemented with cytokinin alone or in combination with auxin. The results showed that 4% cellulase Onozuka RS, 2% macerozyme R10 and 1% pectolyase Y-23 provided the highest released protoplasts (5x104/ml). Those enzyme combinations were dissolved in 13% mannitol in the presence of mineral salts of MS (Murashige and Skoog) medium and 3 mM MES (2-morpholinoethylsulfonate). In the absence of pectolyase Y-23, an isolation of protoplast was not obtained. A higher number of divided protoplasts (1-2%) was obtained when they were cultured in 1-2 ml aliquot of MS medium supplemented with 13% mannitol, 0.5 mg/l BA (benzyladenine) and 0.5 mg/l TDZ (thidiazuron). Culture medium containing BA and NAA (naphthaleneacetic acid) retarded division of protoplasts. A large number of anthocyanin containing protoplasts started to divide faster than normal ones. Division of protoplasts was observed at 4 days after culture.

Key words : culture, isolation, mangosteen, mesophyll protoplasts, anthocyanin

M. Agr. (Crop Biotech.), Assoc. Prof., Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 901 12 Thailand.

Received 5 August 1997, accepted 15 October 1997

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต

การแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบมังคุด

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(1) : 15-20

ทำการย่อยใบอ่อนสีแดงของมังคุดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส มาเซอโรไซม์อาร์ 10 และเพคโตไลเอสร่วมกันความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละความเข้มข้นร่วมใช้ปริมาตร 10 มล. เพื่ออิดิวเบทใบจำนวน 1 กรัม น้ำหนักสด การอินดิวเบทท่าในจานพลาสติคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. ที่ฆ่าเชื้อด้วยแก๊ซ หลังจากปิดด้วยพาราฟิล์มแล้ววางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสงต่ำ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองส่วนผสมของเนื้อเยื่อใบและสารละลายเอนไซม์ผ่านแผ่นกรองขนาดช่อง 60 ไมครอน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกโปรโตพลาสต์ จากวิธีการข้างต้น พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด $5x10^4$ เมื่อใช้ส่วนผสมของเซลลูเลส 4% มาเซอโรไซม์ 2% และเปคโตไลเอส 1% หากปราศจากเปคโตไลเอสแล้วไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เลย การแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ครั้งแรกปรากฏให้เห็นหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ เป็นเวลา 4 วัน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการแบ่งตัวคือสูตรมูราชิกและสกุดเติมน้ำตาลแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 3% เบนซิลอะดินีน 0.5 มก/ล และไธไดอะซูรอน 0.5 มก/ล การเติมกรดแนปธาลีนลงในอาหารเลี้ยงท่าให้การแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ลดลง อย่างไรก็ตามการชักนำการสร้างโคโลนีขนาดเล็กและแคลลัสยังกำลังศึกษาและดำเนินการอยู่

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Mangosteen is an economically important fruit crop of southern Thailand. Propagation of this plant is routinely carried out by seed. Asexual propagation is limited due to latex or gum produced by the plant. Recently, propagation through tissue culture technique has become very common and is routinely used in some laboratory. Various explants from seedlings or adult tree can be used as starting material for propagation *in vitro*. Among those explants young leaves from both seedling raised *in vitro* and field grown trees were the most suitable for clonal propagation. Te-chato, *et al.* (1995a, b and c) reported tissue culture protocol for multiplication of plantlets directly and through meristematic nodule callus. Successive multiplication of mangosteen can be carried out through meristematic nodule callus. Plantlets obtained from this technique, so far, are true-to-type. No morphological abnormalities were observed from those plants.

Protoplasts are the cells whose cell wall has been digested mechanically or enzymatically. They are isolated from various sources of explants. The two most common sources which provide a large amount of viable protoplast are leaves and suspension, especially, embryogenic suspension. Many perennial fruit crops, such as *Citrus* (Ling *et al.*, 1990), Japanese persimmon (Tamura *et al.*, 1995) have been reported to be successfully propagated through protoplasts. In some plants, e.g. oil palm, zygotic embryos was proved to be the best explant for a high yield of protoplasts ($9x10^6$/ml) (Sekak *et al.*, 1985). Moreover, protoplasts are a wonderful tool which for use in crop improvement. Examples includes production of dodecaploid plant of Japanese persimmon by colchicine treatment (Tamura *et al.*, 1996). In addition, fusion of protoplasts with electricity was also reported to produce hybrid commercial varieties in Japanese persimmon (Tamura *et al.*, 1995). In some rootstock species of *Citrus*, protoplast technology has also offered a great potential in improving some horticultural values such as disease resistance, drought tolerance, etc. (Deng *et al.*, 1992; Grosser, 1991). So far, only one attempt has been made to isolate and culture protoplasts from young leaves of somkhag (*Garcinia atroviridis*) (Te-chato, 1997). The isolation and culture of protoplasts of other species belonging to *Garcinia* has not yet been reported. Before stepping to the use of protoplasts as a

tool in improvement of the species, in this paper, preliminary studies on isolation and culture of mangosteen mesophyll protoplasts is described.

Materials and methods

Vitro-plant induction and leaf preparation

In this experiment plantlets derived from cultured leaves maintained in two phase medium were used. The lower phase medium was woody plant medium (WPM) supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l polyvinylpyrroridone (PVP) and 0.1 mg/l benzyladenine. Overlay medium was Murashige and Skoog in which all the components were reduced to half concentration except for sucrose (1/2MS) and supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l PVP, 0.06 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.03 mg/l thidiazuron (TDZ). In this medium, young purple or red leaves were induced and used as leaf explant for isolation of protoplasts.

Purple leaves from plantlets maintained in two-phase medium were excised and sliced into small strips. One gram of leaf tissue was used for incubation with 10 ml of enzyme solution.

Leaf incubation and isolation of mesophyll protoplasts

One gram stripped leaves was placed in 10 ml aliquots of the enzyme mixture contained in 15x60 mm Falcon plastic dishes. The enzyme consisted of various combinations of cellulase Onozuka RS and macerozyme R-10 as showed in Table 1. All combinations were dissolved in an osmoticum which consisted of mineral salts (macro and microelements) of MS, 13% Mannitol, 3mM 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES). All combinations of enzyme were adjusted to pH 5.6 by 1N KOH. The enzyme solution was then purified by filtering through a Millipore of pore size 0.45 µm. After adding enzyme to leaf sample, Petri-dishes were sealed with Parafilm and incubated under dim illumination on a shaker at 50 rpm. Six hours after incubation, the mixture of leaf-enzyme solution containing released protoplasts was pelleted by centrifuging at 800 rpm for 3 minutes. Protoplasts were washed once with washing solution and twice with culture medium, and counted.

Culture of released protoplasts

One ml aliquot of protoplasts were cultured in 15x60 mm Petri-dish at the density which was isolated. Culture medium used in this experiment was Murashige and Skoog (MS) supplemented with 13% Mannitol, 0.5 mg/l benzyladenine (BA) in combination with 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) or 0.1 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA). The cultures were incubated at 27°C in the dark condition. At five days of culture, divided protoplasts were counted and compared among each combination of phytohormones.

Results

Isolation of mesophyll protoplasts

It was clearly seen that all combinations of cellulase and macerozyme in the absence of Pectolyase Y-23 gave no result on protoplast isolation. Protoplasts were not released under those conditions of enzyme solution. However, 2% cellulase and 2% macerozyme gave small amount of released protoplasts which could not be isolated by the regular procedure. Addition of Pectolyase Y-23 at low concentration of 0.5% promoted a higher yield of released protoplasts. Yield of protoplasts obtained from this combination of enzyme (2% cellulase, 2% macerozyme and 0.5% Pectolyase Y-23) was $1x10^4$/ml. Increasing concentration of cellulase and Pectolyase Y-23 to 4% and 1%, respectively gave the best result of release protoplasts of $5x10^4$/ml. Concentration of those enzymes higher than the above concentrations did not provide protoplasts (Table 1).

Mesophyll protoplasts released from leaves composed of two distinct types. One is anthocyanin-containing protoplasts. Another is normal or chlorophyll-containing protoplasts (Figure 1). The number of anthocyanin-containing protoplasts was lower than chlorophyll-containing ones. After they were cultured in liquid MS medium supplemented with two different kinds of cytokinins with or without NAA, 0.5% BA in combination with 0.5% TDZ promoted a better result on dividing of protoplasts. Protoplasts lost their globular shape after culture in that medium for 2-3 days. At 4 days of culture first division of some of the protoplast was observed (Figure 2).

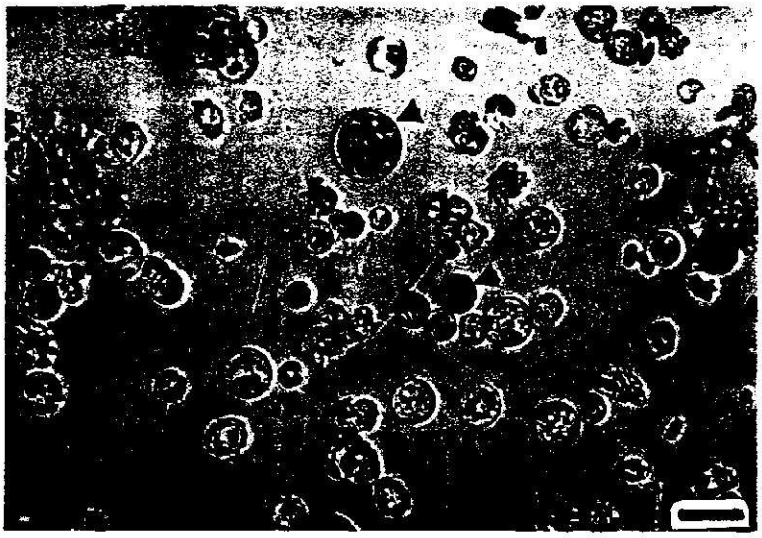


Figure 1. Fresh mesophyll protoplasts isolated from young purple leaves of mangosteen which consisted of both anthocyanin-containing (arrow) and chloroplast-containing protoplasts. (Bar = 50μ)

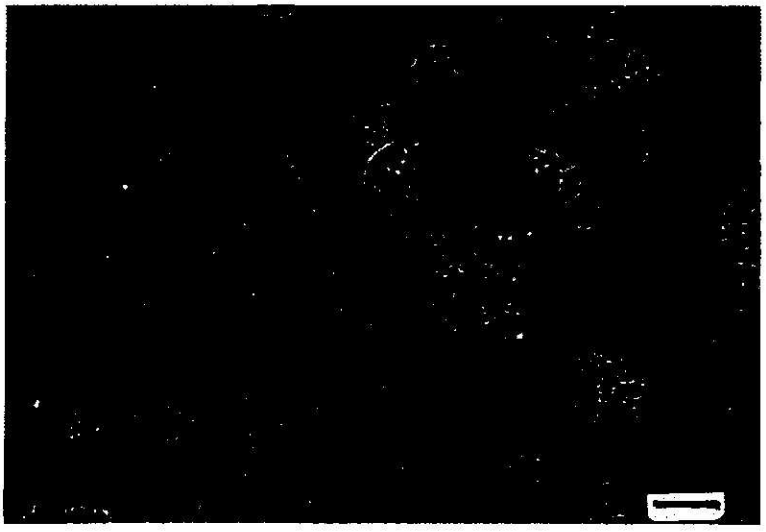


Figure 2. First division of mesophyll protoplast at 4 days of culture in MS medium supplemented with 0.5% BA and 0.5% TDZ. (Bar=50μ)

Percent division of protoplast in this medium was 1-2% while NAA containing medium gave only 0.1-0.5% (Table 2).

In this experiment, it was observed that divided protoplasts were mainly from anthocyanin-containing ones. Division of normal protoplasts was also observed but the time taken for division was more longer than that required by anthocyanin-containing protoplasts. After anthocyanin containing protoplasts started to divide, anthocyanin which was contained in the protoplast gradually decreased. After first division was observed anthocyanin completely disappeared.

Table 1. Effect of various enzyme combinations on isolation of mesophyll protoplast of mangosteen.

cellulase (%)	macerozyme(%)	pectolyase Y-23(%)	released protoplasts
1	1	-	0
1	2	-	0
2	1	-	nd
2	2	-	+
2	2	0.5	$1x10^4$
4	2	1	$5x10^4$
4	4	1.5	0

nd: non detected, -:not added, +: few but cannot be purified

Table 2. Effect of phytohormones on division of protoplasts.

BA	TDZ	NAA	division rate
0.5	0.5	-	+++ (1-2%)
0.5	0	0.1	+ (0.1-0.5%)

+++: fairly good division, +: poor division

Discussion

So far, there has only one report on isolation and culture of mesophyll protoplasts of somkhag (Te-chato, 1997). This species provided a large amount of viable protoplasts ($2.6x10^6$/ml). The most effective enzyme combination and concentration was 1% cellulase Onozuka R10 and 2% macerozyme R10. In this species, it was proved that only a mild activity of the enzyme (cellulase Onozuka R10) was enough to isolate a large quanity of protoplast in the absence of Pectolyase Y-23. For mangosteen a high concentration of high activity enzyme (cellulase Onozuka RS) in the presence of Pectolyas Y-23 was required. Even when a high concentration of those enzymes was used in combination, only small number of protoplasts ($5x10^4$/ml) were obtained. The difference in yield of protoplasts between the two species might be due to the diiference in leaf structure and chemical components contained in the leaves. In the case of mangosteen, leaves are very tough and composed of a high quantity of laticiferous cells leading to difficulty in isolating protoplasts.

A higher percentage division of mesophyll protoplasts of mangosteen was obtained in the medium supplemented only BA and TDZ. BA in combination with NAA provided a lower percentage of protoplast division. The result was similar to the culture of young leaves which developed of both direct shoots and meristematic nodules when cultured on the medium containing BA or BA in combination with TDZ. The phenomenon provides supporting evidence that young leaves of mangosteen contain a high concentration of auxin. Addition of exogenious auxin produced an inhibitory effect on both callus formation and division of protoplasts. In the case of mesophyll protoplasts of somkhag, protoplasts divided rapidly in culture medium containing NAA and BA. The same result was also obtained when young leaves were culture in those phytohormones-containing medium.

Anthocyanin pigment produced by epidermal cells was reported to promote cell division leading to callus formation from culture young purple leaves of mangosteen (Te-chato, 1995c). A similar phenomenon was also found in protoplasts. Protoplasts containing anthocyanin pigment started to divide faster than non-containing ones. From this point of view, if culture medium was modified to provide a high quantity of purple leaves, then the leaves used as a source of protoplasts, divided protoplasts subsequent to callus formation might be obtained. In grape vine cell suspension culture, concentration of sucrose in the medium was reported to play an improtant role in

Central Library
Prince of Songkla University

anthocyanin formation. The higher concentration used the higher number of anthocyanin containing cells obtained (Decendit and Merillon, 1996). Contrary results were obtained in our studies in mangosteen. We found that TDZ promoted formation of anthocyanin in the cell of epidermal layer (Te-chato *et al.*,1995c). However, protoplast isolation in this experiment is only a preliminary study. Further experiments on culturing methods, especially embedding technique and concentrations of phytohormones must be made.

References

Decendit, A. and Merillon, J.M. 1996. Condensed tannin and anthocayanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 15:762-765.

Deng, X.X., Grosser, J.W. and Gmittee Jr., F.G. 1992. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cv. Meiwa and *C. sinensis* cv. Valencia. Scientia Horticulturae 49:55-62.

Grosser, J.W. 1991. Hybrid rootstocks from cell fusion offer great potential. Citrus Industry 41-42.

Ling, J., Nito, N., Iwamasa, M. and Kunitake, H. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of satsuma. HortScience. 25:970-972.

Sekak, M.A., Hassan, A.H. and Noor, M.R. 1985. Research note on oil palm protoplasts culture. Porim Bulletin 14:1-4.

Tamura, M., Tao, R. and Sugiura, A. 1995. Regeneration of somatic hybrid from electrofused protoplasts of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). Plant Science 108:101-107.

Tamura, M., Tao, R. and Sugiura, A. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by colchicine treatment protoplasts. Plant Cell Reports 15:470-473.

Te-chato, S. 1997. Protoplast isolation and culture of somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.) to microcolony. Songklanakarin J.Sci.Technol. 19(3):255-262.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:115-120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J.Sci.Technol. 17:129-135.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c. Type of medium and cytokinin in relation with purple leaf and callus formation in mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:121-127.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.)

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Moosikapala, L. and Te-chato, S.

Factors affecting isolation and culture of protoplasts of Somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(4) : 411-420

Isolation of protoplasts was carried out from vitro-grown leaves of Somkhag at different ages of culture. Various concentrations of cellulase Onozuka R-10 and macerozyme R-10 were tested. A sample of leaves was incubated in a mixture solution of the two enzymes on a gyratory shaker at 40 rpm under darkness for 12 hours. Various densities of released protoplasts were adjusted and cultured with different kinds and concentrations of growth regulator. Leaves at 3 months of culture incubated in 2 % cellulase Onozuka R-10 and 1 % macerozyme R-10 gave released protoplasts at $1.25x10^7$/g.fr.wt. Viability of protoplasts was the highest (91.19 %). Culturing of the protoplasts embedded in MS with 0.2 % Phytagel, 3 % sucrose, 0.7 M manitol, 0.5 mg/l dicamba and 1 mg/l benzyladenine (BA) promoted the best result in division of protoplasts. Age of leaves and culture density play important roles in development of the protoplasts. Protoplasts from leaves after one month of culture at density of $1.5x10^5$/ml underwent microcolony formation after 4 weeks of culture.

Key words : Somkhag, *Garcinia atroviridis* Griff., protoplast

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

[1]วท.บ. (เกษตรศาสตร์) นักศึกษาปริญญาโท, [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

Corresponding e-mail : tesompon@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 8 มีนาคม 2543 รับลงพิมพ์ 7 มิถุนายน 2543

บทคัดย่อ

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และ สมปอง เตชะโต

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(4) : 411-420

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนส้มแขกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้นบนอาหารสองชั้น เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ตัดใบตามแนวขวางเป็นเส้นขนาดเล็กจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka R-10 และ macerozyme R-10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มล บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 40 รอบ/นาที ในที่มืด หลังจากอินคิวเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาแยกโปรโตพลาสต์ นับจำนวนเปรียบเทียบกัน ปรับความหนาแน่นและเลี้ยงในอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การใช้ใบที่มีอายุ 3 เดือนหลังเติมอาหารเหลว อินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % และ macerozyme R-10 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูง 1.25×10^7/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.19 % การเลี้ยงแบบฝังในอาหารสูตร MS เติม Phytagel 0.2 % น้ำตาลซูโครส 3 % แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ dicamba 0.5 มก/ล และ BA 1 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุด อายุของใบและความหนาแน่นในการเลี้ยงเริ่มต้นมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ คือเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบที่มีอายุ 1 เดือน ด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5/มล ในอาหารดังกล่าวส่งเสริมการสร้างโคโลนีขนาดเล็กได้หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) อยู่ในตระกูล Guttiferae เช่นเดียวกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น มังคุด (*G. mangostana*) พะวา (*G. speciosa* Wall.) ชะมวง (*G. cowa* Roxb.) และมะพูด (*G. dulcis* Kurz.) ส้มแขกปลูกกันมากในภาคใต้ของประเทศไทย เช่น ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ผลของส้มแขกทั้งสดและแห้งนำมาประกอบอาหารได้ และผลมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ hydroxy acetic acid มีการนำมาผลิตเป็นสารลดน้ำหนักได้ (Te-chato, 1997) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์และโปรโตพลาสต์ของพืชในสกุลนี้น้อยมาก มีรายงานความสำเร็จในการชักนำแคลลัสและพืชต้นใหม่ โดยการเพาะเลี้ยงใบของต้นกล้าในหลอดทดลองในมังคุด (Te-chato, *et al.*, 1995a, b and c) การเพาะเลี้ยงใบ (Goh, *et al.*, 1988, 1994) การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากข้อและลำต้นและปลายยอด (Goh, *et al.*, 1988; ธิดารัตน์, 2533) โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ผ่านการย่อยเอาผนังเซลล์ออกโดยวิธีกลหรือการใช้เอนไซม์ สามารถแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชและชิ้นส่วนที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์คือใบและเซลล์ซัสเพนชัน เนื่องจากให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการชักนำเซลซัสเพนชันในพืชสกุลนี้การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ชิ้นส่วนใบเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ มีรายงานการเพาะเลี้ยงใบอ่อนส้มแขกจากหลอดทดลองและพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็กได้ (Te-chato, 1997) และรายงานการชักนำการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสีแดงของมังคุด (Te-chato, 1998) การศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อชักนำการสร้างแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ในส้มแขก ได้มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ของมังคุด ซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้และประเทศเนื่องจากโปรโตพลาสต์ของส้มแขกมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์ค่อนข้างสูง (Te-chato, 1997) การใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ของพืชสองชนิดนี้อาจมีการส่งเสริมกันทำให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ได้ นอกจากนี้อาจใช้โปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือในการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญ เช่น ยีนทนแล้ง ทนเค็ม ต้านทานโรคและแมลง สู่มังคุดได้ ในบทความนี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่สำคัญต่อการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยศึกษาชนิดและความของเอนไซม์ อายุใบที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ และศึกษาถึงความหนาแน่นเริ่มต้นของโปรโตพลาสต์ในการเลี้ยง วิธีการเพาะเลี้ยง ชนิดและความของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขก ซึ่งมีการพัฒนาของ

โปรโตพลาสต์ในระดับโคโลนีขนาดเล็กเท่านั้นการพัฒนาเป็นแคลลัสหรือชักนำพืชต้นใหม่อาจมีการศึกษาต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ใบส้มแขกจากยอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงลำต้นบนอาหารสูตร WPM (woody plant medium) เติม BA 0.1 มก/ล TU (thiourea) 0.1 มก/ล PVP 500 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3 % เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความขององ์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA 0.06 มก/ล และ BA 0.03 มก/ล PVP 500 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3 % ปริมาตร 7.5 มล วางเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 1, 2, 3 และ 4 เดือน แล้วตัดใบมาแยกโปรโตพลาสต์

วิธีการ

1. วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

หลังจากอินคิวเบทแล้วนำชิ้นส่วนใบในสารละลายเอนไซม์มากรองด้วยผ้ากรองมิราครอทฆ่าเชื้อ ขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ซม ผ่านไปยังหลอดปั่นขนาด 15 มล นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 800 รอบ/นาที นาน 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง ปริมาตร 5 มล ค่อย ๆ ดูดเบ่าให้เข้ากัน แล้วลอยบนสารละลายซูโครส 21 % เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์ โดยปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากตอนกลางระหว่างแมนนิทอลและซูโครส แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2-3 ครั้ง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ และตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ปรับความหนาด้วยอาหารเลี้ยงเพื่อเลี้ยงต่อไป

2. การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

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

3. ผลของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2, 3 และ 4 % แต่ละความใช้ร่วมกับ macerozyme R-10 1 % และหรือเอนไซม์ pectolyase Y-23 0.1 % ปรับความดันออสโมติกของเอนไซม์ทุกชนิดด้วยแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ แยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 3 เดือนหลังเติมอาหารเหลว อินคิวเบทใบโดยใช้เอนไซม์ 10 มล ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็วรอบ 40 รอบ/นาที ในที่มืด อุณหภูมิ 26±1°C นาน 12 ชั่วโมง จึงนำไปแยกและตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละความของเอนไซม์

4. ผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % ร่วมกับ macerozyme R-10 1 % แยกใบส้มแขกที่ดูแลในอาหารสองชั้นเป็นเวลาต่างๆ คือ 1, 2, 3 และ 4 เดือน หลังจากอินคิวเบทเป็นเวลา 12 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็วรอบ 40 รอบ/นาที ในที่มืดอุณหภูมิ 26±1°C นำไปแยกโปรโตพลาสต์ นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิต เปรียบเทียบกันในแต่ละอายุใบ

5. ผลของอายุใบและความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้หลังจากแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกที่มีอายุต่าง ๆ แล้วเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบที่มีอายุ 1, 2 และ 3 เดือน (โปรโตพลาสต์จากใบอายุ 4 เดือนไม่เลี้ยงเนื่องจากจำนวนและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำ) ปรับความหนาแน่นในการเลี้ยงเป็น 3 ระดับ คือ 0.5×10^5, 1×10^5 และ 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล เลี้ยงแบบฝังเลี้ยงใน Phytagel 0.2 % ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 5 มก/ล และสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ลดความของออสโมติคัมทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ ในทุกความหนาแน่นที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ความแมนนิทอลในสัปดาห์ที่สองเป็น 0.5 โมลาร์) ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26±1°C บันทึกการสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อ เปรียบ

เทียบกันในแต่ละอายุและความหนาแน่นที่เลี้ยง

6. ผลของวิธีการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์หรือพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอายุ 1 เดือน ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % ร่วมกับ macerozyme R-10 1 % ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล ในอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D 0.5 มก/ล และ BA 5 มก/ล แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 3 มล ในจานพลาสติกปิดด้วยพาราฟิล์ม

2 การเพาะเลี้ยงแบบอากาโรสบีด (ใช้วุ้นอากาโรส 0.6 %)

3 การเพาะเลี้ยงแบบหยดแขวน

4 การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวโดยใช้ วุ้น Phytagel 0.2

การเพาะเลี้ยง ทั้ง 4 วิธี ทำในที่มืด อุณหภูมิ 26± 1°C เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นบันทึกการแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อ เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเลี้ยง

7. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล ในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มก/ล แต่ละความใช้ร่วมกับ BA 1.0 มก/ล (Table 1) และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ dicamba 0.5 และ 1.0 มก/ล ร่วมกับ BA 1.0, 2.0 และ 3.0 มก/ล อาหารทุกสูตรเติม Phytagel 0.2 % หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกผลการแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อ เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ผล

1. ผลของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกอายุ 3 เดือน หลังเติมอาหารเหลว โดยใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 ร่วมกับ macerozyme R-10 ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 4 % ร่วมกับ macerozyme R-10 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ สูงสุด 14.6×10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักใบสด 1 กรัม ความมีชีวิต 62.13 % ส่วนเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % ร่วมกับ macerozyme R-10 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกันและให้ความมีชีวิตสูงสุด 91.19 % และการใช้เอนไซม์ pectolyase Y-23 แยกโปรโตพลาสต์ ได้จำนวนน้อยมาก (Table 1) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % ร่วมกับ macerozyme R-10 1 %

Table 1. Effect of enzyme concentrations on yield and viability of protoplasts isolated from leaves of Somkhag at 3 months of culture

Enzyme concentration (%)			Yield of protoplasts/g.fr.wt ($\times 10^6$)	Viability (%)
CR-10	MR-10	PY-23		
2	1	0	12.5 ± 2.28	91.19 ± 4.32
3	1	0	13.8 ± 1.98	57.75 ± 8.46
4	1	0	14.6 ± 1.38	62.13 ± 13.52
2	1	0.1	0.01 ± 0.00	-
3	1	0.1	0.025 ± 0.005	-
4	1	0.1	0.045 ± 0.005	-

CR-10 = cellulase Onozuka R- 10 MR-10 = macerozyme R-10
PY-23 = pectolyase Y23 - = not determine

2. ผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์ ใบส้มแขกที่มีอายุหลังการเติมอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % ร่วมกับ macerozyme R-10 1 % บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 40 รอบ/นาที ในที่มืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าใบส้มแขกที่มีอายุ 3 เดือน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ และความมีชีวิตสูงสุด คือ 12.48×10^6 โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด และ 91.19 % ตามลำดับ ส่วนใบที่มีอายุมากหรือน้อยกว่านี้ ให้จำนวนและความมีชีวิตลดลง (Table 2)

3. ผลของอายุใบและความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 1, 2 และ 3 เดือน หลังจากเติมอาหารเหลว เลี้ยงแบบฝังเลี้ยงใน Phytagel 0.2 % ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 5 มก/ล และสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ และลดความของออสโมติคัมทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ ในทุกความหนาแน่นที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 3 เดือน ด้วยความหนาแน่น 0.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล มีการแบ่งเซลล์ที่ปกติสูงสุด 14.51 % การแตกหน่อ 6.76 % การเลี้ยงด้วยความหนาแน่นมากกว่านี้การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อเพิ่มขึ้น (Table 3)

อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพาสต์จากใบอายุ 1 เดือน และเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล มีจำนวน 3 เซลล์ที่ยังคงแบ่งเซลล์ครั้งที่สอง และสามารถแบ่งเซลล์ได้สูงสุดประมาณ 8 เซลล์ (Figure 1) ส่วนโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 3 เดือนหลังเติมอาหารเหลว เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 0.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล มีจำนวนเพียง 1 เซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่สองและไม่พบการแบ่งเซลล์ต่อไป (ไม่แสดงข้อมูล) แต่เมื่อลดความของแมนนิทอล และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าโปรโตพลาสต์ทั้งหมดมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด สำหรับการทดลองศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไปจึงเลือกโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 1 เดือนหลังเติมอาหารเหลว และเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล

4. ผลของวิธีการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์หรือพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

หลังจากนำโปรโตพลาสต์จำนวนเริ่มต้น 1.5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 0.5 มก/ล และ BA 5 มก/ล และสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ โดยวิธีต่าง ๆ ในที่มืดอุณหภูมิ 26±1 °C พบว่าการ

Table 2. Effect of ages of leaves on yield and viability of protoplast of Somkhag.

Ages of leaves (month)	Yield of protoplasts/ g.fr.wt. ($\times 10^6$)	Viability (%)
1	2.31 ± 0.45	76.72 ± 17.22
2	7.68 ± 1.08	78.11 ± 15
3	12.48 ± 2.28	91.19 ± 4.32
4	0.12 ± 0.03	50.83 ± 4.84

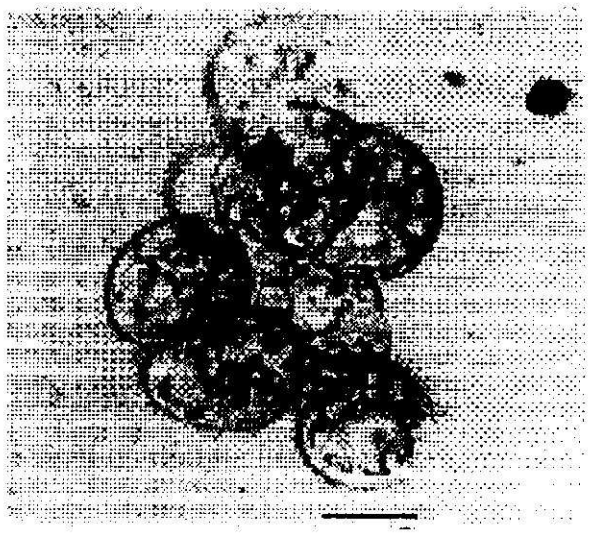


Figure 1. Normal division of protoplast obtained from leaves of Somkhag at 1 month after culture with density of $3x10^5$ /ml in MS medium supplemented with 0.2% Phytagel, 0.5 mg/l 2,4-D and 5 mg/l BA (Bar represents 100 (m).

Table 3. Effect of age of leaves and culture on development of Somkhag.

Density of protoplasts/ml	Age of leaves (month) 1		2		3	
	Division	Budding	Division	Budding	Division	Budding
1×10^5	2.78 ± 3.56	6.67 ± 9.43	11.72 ± 4.53	5.89 ± 0.46	14.51 ± 1.49	6.76 ± 0.59
2×10^5	4.14 ± 3.18	8.71 ± 8.23	10.23 ± 5.45	2.67 ± 0.25	12.76 ± 0.96	11.41 ± 1.54
3×10^5	5.83 ± 2.93	3.93 ± 3.26	8.66 ± 4.45	1.22 ± 0.86	9.47 ± 0.13	12.34 ± 4.56

Table 4. Effect of culture method on development of protoplasts isolated from leaves of Somkhag at 1 month afterculture. (Culture medium is MS supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 5 mg/l BA)

Culture methods	Culture Time (week) 1		2	
	Division (%)	Budding (%)	Division (%)	Budding (%)
Thin layer (3 ml)	0	0	-	-
Agarose bead	0	0	-	-
Hanging drop	0	0	-	-
Semi-solid (0.2 %Phytagel)	2.86	0	5.00	0

- = dead

เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งใน Phytagel 0.2 % ส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด โปรโตพลาสต์เริ่มรีหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และแบ่งเซลล์ให้เห็นครั้งแรกหลังจากเลี้ยงประมาณ 2-3 วัน ในขณะที่วิธีการเลี้ยงแบบอื่น ๆ ไม่มีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการใด ๆ เลย (Table 4)

5. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

จากการเลี้ยงโปรโตพลาสด้วยความหนาแน่น 1.5×10^5/มล แบบฝังเลี้ยงใน Phytagel 0.2 % ในอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าอาหารเติม 2,4-D 2.5 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 2.7 % รองลงมา คือ เติม 2,4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล ให้การแบ่งเซลล์ 2.5 % และไม่มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ส่วนการเติม 2,4-D 1.5 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล ให้พัฒนาการต่ำสุด และมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อสูงสุด (Table 5)

Table 5. Effect of various concentrations of 2,4-D and BA on development of protoplasts of Somkhag after culture for 1 week

Growth regulator (mg/l) 2,4-D	BA	Development of protoplasts Division (%)	Budding (%)
0.5	1	2.5	0
1.0	1	2.1	1.6
1.5	1	1.8	2.1
2.0	1	2.3	2.0
2.5	1	2.7	0

อย่างไรก็ตามการแบ่งเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะยาวไม่สามารถ และหลังจากวางเลี้ยงต่อไป พบว่าโปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนาต่อไป และมีสีน้ำตาล ตายในที่สุด สำหรับสารควบคุมชนิดอื่น ๆ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหาร

เติม dicamba 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 1 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด คือแบ่งเซลล์ได้สูงสุด 10 เซลล์ คิดเป็น 2.44 % ภายใน 3 สัปดาห์ (Table 6) อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จึงเติมอาหารเหลวที่มีผงถ่านความ 0.1 % พร้อมกับลดออสโมติคัมของแมนนิทอลลงทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ สังเกตผลเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ส่วนหนึ่งเปลี่ยนเป็นสีเขียวแต่เมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่าไม่มีการพัฒนาใด ๆ เกิดขึ้น

วิจารณ์

รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์และโปรโตพลาสต์ของส้มแขกหรือพืชในสกุล Garcinia ยังมีน้อย Te-chato และคณะ (1995a,b and c) รายงานการชักนำแคลลัสและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยการเพาะเลี้ยงใบของต้นกล้าในหลอดทดลองในมังคุด Goh และคณะ (1988, 1994) และ ธิดารัตน์ (2533) รายงานการเพาะเลี้ยงใบและชักนำแคลลัสจากข้อ ลำต้น และปลายยอด สำหรับโปรโตพลาสต์นั้น Te-chato (1998) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์ใบอ่อนสีแดงของมังคุดในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka RS 4 % ร่วมกับ marcerozyme R-10 2 % และ petolyase Y-23 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 5×10^4/กรัมน้ำหนักสด และมีรายงานการแยกโปรโตพลาสต์ใบอ่อนส้มแขกในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 1 % ร่วมกับ marcerozyme R-10 2 % ว่าให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 2.6×10^6/กรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้การใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 4 % ร่วมกับ marcerozyme R-10 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 1.46×10^7/กรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 62.13 % ในขณะที่การใช้เอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 2 % ร่วมกับ marcerozyme R-10 1 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ใกล้เคียงกันและให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูงสุด 91.19 % ส่วนการเติมเอนไซม์ pectolyase Y-23 ไม่ส่งเสริมการแยกโปรโตพลาสต์ใบส้มแขก สอดคล้องกับการรายงานของ Te-chato (1997) จากความแตกต่างของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ของพืชทั้งสองชนิดนี้ Te-chato (1998) รายงานว่าเกิดจากความแตกต่างของโครงสร้างใบ คือ ใบมังคุดค่อนข้างเหนียว และมีองค์ประกอบของยางมากทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้ยาก นอกจากนี้ Zhang และคณะ (1998) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนในหลอด

Table 6. Effect of growth regulators on development of protoplasts of Somkhag isolated from leaves at 1 month of culture and culture on MS medium for 3 week

Growth regulator (mg/l)			Division (%)					Budding (%)
dicamba	BA	NAA	2 cells	3 cells	4 cells	8 cells	10 cells	
0.5	1.0	0	9.50	-	2.74	3.13	2.44	2.86
0.5	2.0	0	8.80	-	5.05	2.22	-	1.82
0.5	3.0	0	10.38	-	2.29	1.52	-	6.25
1.0	1.0	0	7.14	-	4.54	-	-	4.08
1.0	2.0	0	5.85	2.70	2.59	-	-	4.68
1.0	3.0	0	7.11	-	3.4	-	-	0
0	1.0	0.5	7.25	-	4.55	-	-	0
0	2.0	0.5	5.8	-	2.78	-	-	0
0	3.0	0.5	8.69	-	3.77	-	-	6.48
0	1.0	1.0	11.02	-	3.28	-	-	0
0	2.0	1.0	9.3	-	0	-	-	6.67
0	3.0	1.0	8.82	-	2.83	-	-	3.13

- Nothing occurred

ทดลอง (ใบที่แตกใหม่ ๆ) ของกีวีฟรุต *Actinidia eriantha* Benth. ด้วยเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 1 % ร่วมกับ marcerozyme R-10 0.5 % และ pectolyase Y-23 0.05 % ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 0.7-1.8 $\times 10^6$/กรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามเอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ หลายประการ เช่น อายุของชิ้นส่วนที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ ในการศึกษานี้พบว่า ใบอายุ 3 เดือน หลังจากเติมอาหารเหลวให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 1.25×10^7/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 91.19 % สำหรับใบที่มีอายุน้อยหรือมากกว่านี้ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง ทำนองเดียวกัน สมปอง (2530) รายงานว่าความอ่อนและความแก่ของใบมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของใบที่มีอายุต่าง ๆ พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบอายุ 3 เดือน และเลี้ยงด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ มีการแบ่งเซลล์สูงสุดเมื่อเทียบกับโปรโตพลาสต์จากใบอายุอื่น ๆ หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ จากใบอายุ 3 เดือน เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1×10^7/มล มีการพัฒนาต่ำกว่าใบอายุ 1 เดือน ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เริ่มต้น 3×10^5/มล ซึ่งอาจเกิดจากโปรโตพลาสต์จากใบแก่กว่ามีกิจกรรมการแบ่งเซลล์ต่ำกว่านั่นเอง Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนมีความสามารถในการเจริญเติบโตและพัฒนาการดีกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบแก่หรือใบจากนอกหลอดทดลอง นอกจากนี้การพัฒนาของโปรโตพลาสต์ยังขึ้นกับความหนาแน่นเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงด้วย Kao และ Michayluk (1975) รายงานว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์มีการแพร่สารเมตาบอไลต์ที่สร้างลงในอาหารเลี้ยง และสารเหล่านี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน Hidano และ Nuzeki (1988) รายงานว่าความที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลว่าอยู่ระหว่าง 1×10^5-1×10^6/มล การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่นมากเกินไปทำให้โปรโตพลาสต์แก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน ในทางตรงข้ามหากน้อยเกินไปโปรโตพลาสต์ก็ไม่สามารถเจริญได้ สำหรับการศึกษานี้ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอายุ 3 เดือน หลังเติมอาหารเหลว เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 0.5×10^5/มล โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 14.51 % หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ Te-chato (1997) ซึ่งรายงานว่า การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบส้มแบบฝังเลี้ยงใน Phytagel 0.2 % ว่าสามารถพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็กได้ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบอายุ 1 เดือนหลังเติมอาหารเหลว และเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น 1.5×10^5/มล ให้การแบ่งเซลล์ครั้งแรกต่ำกว่า (7.25 %) การแบ่งให้กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (7-8 เซลล์) มีเพียง 3 กลุ่มเซลล์ (ไม่แสดงข้อมูล) และเมื่อเลี้ยงต่อไปพร้อมกับการลดออสโมติคัมทุกสัปดาห์ พบว่ากลุ่มเซลล์ขนาดเล็กเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จากการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง 4 วิธี พบว่า โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งโดยใช้ Phytagel 0.2 % เนื่องจากโปรโตพลาสต์ถูกตรึงและกระจายในอาหารวุ้นได้รับสารอาหารที่เหมาะสม ทำให้สามารถสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Te-chato (1997) รายงานว่าการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในวุ้น Phytagel 0.2 % ส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวและการพัฒนาสั้นกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารเติมอากาโรส แม้ว่าส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นวิธีที่โมเลกุลของสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง แต่จากการทดลองนี้เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์แตก มีสีน้ำตาลและตายในที่สุด ทั้งนี้อาจมีการทับถมของโปรโตพลาสต์บริเวณจานเพาะเลี้ยงและคาดว่ามีการปลดปล่อยของเสียซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายหมดในที่สุด อย่างไรก็ตาม Zhang และคณะ (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของกีวีฟรุตในอาหารเหลวว่า ให้ประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์สูงสุด 19.4 % หลังการเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ และสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยไม่เติมอาหารใหม่ จากความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากพืชต่างชนิดกันหรือแหล่งของโปรโตพลาสต์ต่างกัน ส่งผลให้มีการตอบสนองต่ออาหารหรือการเพาะเลี้ยงต่างกัน

ชนิดและความของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติม

ในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ซึ่งโดยทั่วไปอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไปแต่ต้องเติมออสโมติคัมเพื่อควบคุมความดันออสโมติคจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ Te-chato (1998) รายงานว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ความ 0.5 มก/ล เท่ากันส่งเสริมการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแล้วยังส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบของมังคุดอีกด้วย นอกจากนี้ Te-chato (1997) รายงานว่าการเติม 2,4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 5 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ของใบส้มแขกสูงสุด 34.5 % หลังการเลี้ยงนาน 7 วัน สำหรับการศึกษานี้ พบว่า การเติมออกซินในรูป 2,4-D ร่วมกับ BA ไม่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์แบบปกติ โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีการแบ่งเซลล์ในลักษณะยาว (ไม่สมมาตร) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba 0.5 มก/ล ร่วม กับ BA 1 มก/ล ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ดีที่สุด สามารถพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็ก (10 เซลล์) หลังจากเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ โดยไม่ต้องลดออสโมติคัม อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่า โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลใน 4 สัปดาห์ และเมื่อทดลองเติมอาหารเหลวที่มีผงถ่าน 0.1 % พร้อมกับลดออสโมติคัมทุกสัปดาห์ ๆ ละ 0.1 โมลาร์ พบว่าโปรโตพลาสต์บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเขียว แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปไม่มีการพัฒนาใด ๆ Kunitake และคณะ (1995) รายงานความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่ในลิเซียนซีส (*Eustoma grandiflorum*) จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่เติมผงถ่านในการศึกษานี้ไม่ประสบผลสำเร็จจากการเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามการดัดแปลงระยะเวลาในการเติมผงถ่านรวมกับลดออสโมติคัมอาจมีผลส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในระยะต่อไป นอกจากนี้ การเติม antioxidant หรือสารยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลอื่น ๆ เช่น PVP อาจมีผลส่งเสริมการแบ่งเซลล์ และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ไปเป็นแคลลัสได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลในตระกูลส้มและมังคุด ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานงบประมาณแผ่นดินหมวดเงินทุนอุดหนุนโครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2533. การขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2530. การพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอในแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของใบถั่วฝักยาวพันธุ์ มก7. ว. สงขลานครินทร์ 9 : 153-158.

Goh, C. J., Lakshmaman, P. and Loh, C. S. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from exised leaves of mangosteen (*G. mangostana* L.). Plant Science 101 :173-180.

Goh, H. K. L., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*G. mangostana* L.). Annals of Botany 62 : 87-93.

Hidano, Y. and Nuzeki, M. 1988. Protoplast culture of deciduous fruit trees. Scientia Horticulturae 37 : 301-306.

Jumin, H. B. and Nito, N. 1995. Embryogenic protoplast culture of orange jessamine (*Murraya paniculata*) and their regeneration into plants flowering *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41 : 277-279.

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

Kunitake, H., Toshiki, N., Kinya, M., Masanobu, T. and Masahiro, M. 1995. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) by adding activated chacoal into protoplast culture medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43 : 59-65.

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.

Mill, D. and Hammerschlag, F. A. 1994. Isolation of cells and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 99-105.

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 protoplasts

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., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*G. mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 115-120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 129-135.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c. Type of medium and cytokinin in relation with purple leaf and callus formation in mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17 : 121-127.

Theodoropoulos, P. A. and Roubelakis-Angelakis, K. A. 1990. Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20 : 15-23.

Zhang, Y. J., Qian, Y. Q., Mu, X. J., Cai, Q. G., Zhou, Y. L. and Wei, X. P. 1998. Plant regenration from *in vitro*-culture seedling leaf protoplast of *Actinidia eriantha* Benth. Plant Cell Reports 17 : 819-821.

Isolation and Culture of Mesophyll Protoplast of *Garcinia* spp.

Sompong Te-chato, Ludawan Musigapala and Mongkol Lim

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, 90112 Songkhla

Abstract

Young leaves of three species in *Garcinia mangostana* Linn. (mangosteen), *G. atroviridis* Griff. (somkhag) and *G. speciosa* Wall. (pawa) were stripped and digested enzymatically. Isolated protoplasts were cultured in various phytohormone-containing media. The results showed that 1% cellulase Onozuka R10 and 2% macerozyme R10 yielded the highest number of protoplasts ($2.6x10^6$/g fresh weight). In case of mangosteen and pawa, pectolyase Y-23 at concentration of 0.1% and the higher concentration of cellulase (3-4%) were required to produce high yields of protoplasts of mangosteen ($2.5x10^5$/g fresh weight) and pawa ($1.4x10^6$/g fresh weight). The highest frequency of protoplast division (34%) and earliest time for the first division (2 days) and macro-colony formation (3 weeks) was found in somkhag. For development of protoplasts of mangosteen and pawa, a period for the first division was 4-6 days after culture. So far, only first division was obtained both in mangosteen (2%) and pawa (6%) after 4weeks of culture. Further development of the protoplasts did not occur. 2,4-D in combination with BA promoted division of protoplasts of somkhag and pawa while TDZ and BA (only two cytokinins) promoted division of mangosteen protoplasts.

Keywords : mesophyll protoplast, *Garcinia* spp., somkhag, mangosteen, pawa

Introduction

Garcinia spp. belongs to the family Guttiferae including some economically important species e.g. *G. mangostana* Linn. (mangosteen), *Garcinia atroviridis* Griff. (somkhag), *G. speciosa* Wall. (pawa), *G. cowa* Roxb.(chamuang) and *G. dulcis* Kurz (mapood) etc. The trees can grow well under humid conditions and are generally found at the same place as commercially grown mangosteen. These species are distributed widely in the three southernmost provinces of Thailand, Yala, Pattani and Narathiwat. Small numbers are found scattered in other provinces, e.g. Songkhla, Satun, Nakhon Si Thammarat. All non-commercial species in this family are grown as backyard

plants. They also grow well in their natural habitats. Fruits of mangosteen are used for domestic consumption and exported nationally and internationally while both fresh and dried fruits of somkhag are used for cooking. The fruits of somkhag contain an important chemical, hydroxy citric acid (HCA). This chemical can convert saturated fatty acid into unsaturated fatty acid. Pawa fruits can be used for making flavour.

Generally, pawa plants are most tolerant to drought stress, followed by somkhag and mangosteen, repsctviely. Mass propagation of mangosteen by grafting mangosteen scions on rootstocks of the other two species to produce drought tolerant mangosteen is unlikely successful as incompatibility between scions and rootstocks occurs . To transfer drought tolerant traits from tolerant species to mangosteen using protoplast fusion technology could be feasible. Recently, success in tissue culture of these species has been reported (Te-chato, 1997; Suraninphong and Te-chato, 1998; Te-chato *et al.*, 1995b). Steps in the culture was clearly elucidated (Te-chato and Lim, 1996; Te-chato *et al.*, 1995a,b,c). Regeneration of protoplasts and fused protoplasts is possible.

Protoplasts are obtained when cell walls of cells have been digested mechanically or enzymically. They are isolated from various sources of explants. The two most common sources providing large amount of viable protoplast are leaves and suspension, especially, embryogenic suspension. Many perennial fruit crops, such as *Citrus* (Ling *et al.*, 1990), Japanese persimmon (Tamura *et al.*, 1995) have been successfully propagated through protoplasts. In some plants, e.g. oil palm, zygotic embryo was the best explant for generating large number of protoplasts ($9x10^5$/ml) (Sekak *et al.*, 1985). Moreover, protoplasts are a wonderful tool for crop improvement including production of dodecaploid Japanese persimmon plants by colchicine treatment (Tamura *et al.*, 1996). In addition, fusion of protoplasts by electroporation produced commercial hybrid varieties in Japanese persimmon (Tamura *et al.*, 1995). In some *Citrus* species, protoplast technology has also offered a great potential in improving some horticultural values such as disease or drought tolerance, etc. (Deng *et al.*, 1992; Grosser, 1991). Prior to the use of protoplasts as a tool for crop improvement, it is of great importance to know how to isolate and culture mesophyll protoplasts of *Garcinia* spp.

Materials and Methods

Plant material: Seeds of somkhag and pawa were excised and then seed coat and vascular tissue removed. The seeds were surface-sterilized by 20% clorox solution for 20 minutes, followed by successive washing for three times with sterile distilled water. The seeds were then sown on Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose and 5 mg/l benzyl adenine (BA). After a month of culture, shoot tips with one node were dissected and micropropagated on micropropagation medium, a woody plant medium (WPM) supplemented with 3% sucrose, 500 mg/l polyvinylpyrroridone (PVP), 0.1 mg/l BA and 0.1 mg/l thiourea (TU). Two to four weeks after culture, half strength liquid MS containing 500 mg/l PVP, 0.06 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA), 0.03 mg/l BA was added and the tissues cultured for a further 2-4 weeks. The leaves from multiple shoots were cut off and used as plant materials for protoplast isolation and culture. In the case of mangosteen, plantlets from cultured leaves maintained in two phase medium were used. In this case, BA in overlay medium was replaced with thidiazuron (TDZ) at the same concentration. Purple leaves obtained in two-phase medium were excised and used as leaf explant for protoplast isolation.

Preparation of enzyme solution: In this experiment, cellulase Onozuka R10 and RS were used in combination with macerozyme R10 at various concentrations. In some experiments pectolyase Y-23 at various concentrations was added. For all combinations, enzymes were dissolved in 0.7M mannitol in the presence of major and minor salts of MS and 3mM 2-(morpholino)ethanesulfonic acid (MES). The pH of the solution was adjusted to 5.7 by 0.1N KOH. Sterilization of the enzyme solution was carried out by passing through sterilized Millipore filter of pore size 0.45 μ.

Protoplast isolation: One gram leaf tissue was stripped and incubated in 6x1.5cm Petri-plate containing 10 ml of various enzyme combinations. Incubation was carried out under dim illumination on a shaker which was shaken at 50 rpm for 4 hours. At the end of the incubation period, the mixture of enzyme solution and leaf protoplasts was passed through a nylon mesh with pore size 77μ and centrifuged at 800 rpm for 3 minutes. Supernatant (enzyme solution above the pellet) was discarded and the pellet was resuspended in 5 ml of washing solution composed of 0.7M mannitol, major and minor salts of MS. Crude protoplast suspension together with debris was then floated on 5 ml of 21% sucrose acting as purified solution. The two-phase solution was again centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes. Complete protoplasts at the mid phase between sucrose and mannitol were collected by

Pasteur Pipette and transferred to a new centrifuge tube. The protoplasts were washed two times with washing solution and washed once with culture medium. They were then counted and the density adjusted to culture in various methods.

Protoplast culture: After adjusting protoplasts to the desired density, they were cultured in 6x1.5cm Petri-plates containing various types of culture media and plant growth regulators. They were then maintained in the dark at 26°C. After 21 days of culture, one ml of fresh liquid medium containing 0.35M mannitol was added and cultured under the same conditions for 2-3 weeks.

Result

Effect of various combinations of enzymes on yield of protoplasts

Cellulase Onozuka R10 at low concentration of 1% in combination with 1.5 to 2.0% macerozyme R10 was enough to macerate leaf tissue and release mesophyll protoplasts of somkhag (Table 1). Increase in concentration of the cellulase from 1% to 2% did not release a large number of protoplasts whereas macerozyme R10 at higher concentration significantly increased yields of protoplasts. However, 1% cellulase Onozuka R10 in combination with 2% macerozyme R10 gave the highest yield of protoplasts. Pectoylase Y-23 did not give protoplasts of somkhag. An addition of this enzyme to those mixture of enzyme solution gave yield of protoplasts less than 10^5/g fresh weight. For protoplast isolation of mangosteen and pawa, it was clear that all combinations of cellulase and macerozyme in the absence of pectolyase Y-23 did not release protoplasts. An addition of pectolyase Y-23 at low concentration from 0.1 to 0.5% increased yields of protoplasts. Yields of protoplasts from leaves of pawa and mangosteen from this combination of enzyme (2% cellulase Onozuka R10, 1% macerozyme R10 and 0.1% pectolyase Y-23) was the highest, $1.4x10^6$ and $2.5x10^5$/g fresh weight, respectively (Table 1). Increasing concentration of cellulase RS from 2 to 4 and pectolyase Y-23 from 0.1 to 1% gave less protoplasts ($5x10^4$/g fresh weight) than did cellulase R10 ($2.5x10^5$/g fresh weight). Concentration of those enzymes higher than the above concentrations did not give protoplasts (Table 1).

There were different size of mesophyll protoplasts from leaves of various species. The protoplasts of somkhag were the biggest (50 μ), followed by mangosteen (40 μ) and pawa (20 μ), respectively (Table 2). Protoplasts of somkhag and pawa contain mainly chloroplast while mangosteen protoplasts were of two distinct types, anthocyanin-containing and chlorophyll-containing protoplasts (Table 2) and a number of anthocyanin-containing protoplasts was lower.

Effect of plant growth regulators on development of protoplasts.

Types of auxin used in culture of protoplasts played a significant role on division of protoplasts of somkhag. A low concentration of NAA at 0.5 mg/l in combination with BA at all concentrations ranging from 0.5 to 5.0 mg/l promoted division of the protoplasts (Table 3). NAA at concentration of 1.0 mg/l in combination with BA at concentration higher than 0.5 mg/l had an inhibitory effect on division of protoplasts. There was no division of protoplasts from those combinations of NAA with BA. Different results were obtained when auxin in the form of 2,4-D was applied. 2,4-D resulted in greater percentage of protoplastdivision than did NAA at day 7. Optimum concentrations of 2,4-D and BA were 0.5 and 5.0 mg/l, respectively (Table 3). In the medium containing 2,4-D, the first division of protoplasts was observed on day 2 of culture. After culture for 3 days, division of protoplasts was 2% and this greatly increased to 34.5% after one week of culture (Table 3). A high concentration of 2,4-D and BA, division of protoplasts still occurred but percent of division was lower than that at low concentrations.

Division of mesophyll protoplasts of mangosteen cultured in liquid MS medium supplemented with 0.5mg/l BA in combination with 0.5mg/l TDZ was better than that in MS with BA and NAA.. Protoplasts lost their globular shape after culture in that medium for 2-3 days. At 4 days of culture first division of some of the protoplast was observed. Percentage of protoplast division in BA and TDZ containing medium was 1-2% while BA and NAA containing medium gave only 0.1-0.5% (Table 4). In the case of culturing mesophyll protoplasts of mangosteen, it was observed that protoplast division occurred mainly in anthocyanin-containing protoplasts. Division of normal protoplasts was also observed but the division took longer time than did anthocyanin-containing protoplasts. After anthocyanin containing protoplasts started to divide, anthocyanin was gradually degraded. After first division, anthocyanin completely disappeared.

For culturing of mesophyll protoplasts of pawa, first division was observed after 4-6 days of culture (7.4%). Protoplasts were embeded in MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BA. After two weeks of culture, protoplasts burst out leading to s release of chloroplasts and a decrease in number of divided protoplasts (6%). However, at week 4 after culture all protoplasts died completely and there was no further development into micro and macro-colony.

The development of three different species of *Garcinia* in this study was quite different in both time-consume and stage of development. Protoplasts of somkhag divided most rapidly (1-2 days after culture) and could undergo division to produce macro-colony (>50 cells) within 3-4 weeks while protoplasts of mangosteen and pawa could divide only 2-4 cells (Table 5, Figure 1).

Discussion

Tissue culture of *Garcinia* spp. has been developed for at least five years. Most of the techniques focused on micro-propagation using culturing seeds and young leaves have been limited to commercial varieties, i. e. mangosteen. The other wild types of these species have received less attention. However, for future variety improvement of mangosteen by biotechnological methods, it is inevitable that germplasm from wild species would be explored. Even though many researchers have been interested in mangosteen, there were no reports on callus and cell suspension cultures, thus hindering the varietal improvement of this fruit tree using cell culture. Raj Bhansali *et al.* (1991) reported success in cell suspension culture from immature cotyledon of peach. This success opened a wide scope for improvement of the fruit tree by biotechnological methods. For example, protoplast isolation, culture and fusion to produce somatic hybrid have been successful in *Citrus* spp (Grosser, 1991; Deng *et al.*, 1992). So far, many workers reported success in protoplast isolation and culture producing plantlets in citrus (Hidaka and Kajiura, 1988; Kobayashi *et al.*, 1989; Vardi *et al.*, 1975; Vardi *et al.*, 1982). In addition to citrus, there are also reports on protoplast isolation and culture in *Prunus, Pyrus* and *Diospyros*. Sources of protoplasts vary from species to species. In the case of satsuma, embryogenic callus from nucellar embryo proved to be the best source (Ling *et al.*, 1990). However, leaves are a good source of protoplasts, especially when somatic cell fusion is employed. In case of *Garcinia*, so far, leaves appear to be a good source for protoplast isolation. Texture and components of leaves in each species of the same genus are quite different leading to a high degree of difficulty on protoplast isolation. Mangosteen leaves are very tough and composed of a large quantity of yellow gum in comparison with somkhag and pawa leaves. Isolation of protoplasts from the leaves required a long time and a high concentration of enzyme components, especially pectolyase Y-23 (Table 1). The results obtained in mangosteen differed greatly from that in somkhag and pawa. A large number of protoplasts of somkhag ($2x10^6$ protoplasts/g fresh weight) and pawa ($1.4x10^6$ protoplasts/g fresh weight) was isolated from young leaves and cultured *in vitro*. However, development of the protoplasts of somkhag occurred first (Table 5). New wall formation was observed within one day

(24 hour) of culture, followed by first division 24 hour later. In suitable culture medium protoplasts can undergo division to form multi-cellular or macro-colonies at 21 days of culture. However, there was no formation of callus. From the observation on culture, it was clear that the longer the time of culture, the larger the volume of vacuole. This phenomenon is generally observed in culturing protoplasts of perennial tree.

A higher percentage division of mesophyll protoplasts of mangosteen was obtained in the medium supplemented with only BA and TDZ. BA in combination with NAA resulted in a lower percentage of protoplast division (Table 4). The research finding suppotrs previous work that culture of young leaves could be developed into shoots and meristematic nodules obtaining from the medium containing BA or BA in combination with TDZ (Te-chato *et al.*,1995a, b). The phenomenon might provide evidence that young leaves of mangosteen contain a high concentration of auxin. Addition of exogenous auxin produced an inhibitory effect on both callus formation and division of protoplasts.

Anthocyanin pigment produced by epidermal cells was reported to promote cell division leading to callus formation from culturing young purple leaves of mangosteen (Te-chato *et al*, 1995c). Protoplasts containing anthocyanin pigment started to divide earlier than did non-anthocyanin protoplasts. From this finding, if modified culture medium was supplied in larger quantity to purple leaves, the protoplasts isolated form the leaves would then divide and subsequently lead to callus formation. In grape vine cell suspension culture, concentration of sucrose in the medium played an important role in anthocyanin formation. The higher concentration, the higher the number of anthocyanin containing cells. (Decendit and Merillon, 1996). This seems to contrast to our studies in mangosteen. We found that TDZ promoted formation of anthocyanin in the epidermal cell (Te-chato *et al.*,1995c). However, protoplast isolation in this experiment is only a preliminary study. Further experiments on culturing methods, especially embedding technique and concentrations of phytohormones should be undertaken. Moreover, preventing of phenolic compound production by protoplasts using anti-oxidant, e.g. polyvinylpyrroridone or activated charcoal, should be considered.

Acknowledgement

This research is a part of project, isolation and culture protoplasts of *Citrus* and *Garcinia*, sponsored by annual budget. The authors wish to thank Faculty of Graduate School, Prince of Songkla University, Hat Yai, fo finacial support to master degree student during doing her thesis.

References

Decendit, A. and Merillon, J.M. 1996. Condensed tannin and anthocayanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 15:762-765.

Deng, X.X., Grosser, J.W. and Gmitter Jr, F.G. 1992. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplasts fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar Meiwa with *Citrus sinensis* cultivar Valencia. Scientia Horticulturae 49:55-62.

Grosser, J.W. 1991. Hybrid rootstocks from cell fusion offer great potential. Citrus Industry 41-42.

Hidaka, T. and Kajiura, I. 1988 Plantlet differentiation from callus protoplast induced from citrus embryo. Scientia Horticulturae 34:85-92.

Kobayashi, S. and Ohgawara, T. 1988. Production of somatic hybrid plants through protoplast fusion in citrus. J. Agr. Rev. Quart. 22:181-188.

Ling, J., Nito, N., Iwamasa, M. and Kunitake, H. 1990. Plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic callus of satsuma. HortScience 25:970-972.

Suraninphong, P. and Te-chato, S. 1998. Root induction from *in vitro* regenerated shoot of somkhaek (*Garcinia atroviridis*). Khon Kaen Agric. 26:74-84.

Raj Bhansali, R., Driver, J. and Durzan, D.J. 1991. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Prunus persica* (L.). J. of Hort. Sci. 66:601-605.

Sekak, M.A., Hassan, A.H. and Noor, M.R. 1985. Research note on oil palm protoplasts culture. Porim Bulletin 14:1-4.

Tamura, M., Tao, R. and Sugiura, A. 1995. Regeneration of somatic hybrid from electrofused protoplasts of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). Plant Science 108:101-107.

Tamura, M., Tao, R. and Sugiura, A. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by colchicine treatment protoplasts. Plant Cell Reports 15:470-473.

Te-chato, S. 1997. Tissue culture of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.), pawa (*Garcinia speciosa* Wall.) and somkhag (*Garcinia atroviridis* Griff.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 19:147-155.

Te-chato, S. and Lim, M. 1996. Micropropagation of mangosteen through young leaf culture. The 13th Conference on Methodological Techniques in Biological Sciences. 19-20 June, Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:115-120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J.Sci.Technol. 17:129-135.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c. Type of medium and cytokinin in relation with purple leaf and callus formation in mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:121-127.

Vardi, A., Spiegel-Roy, P. and Galun, E. 1975. Citrus cell culture: Isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagenes and regeneration of embryos. Plant Science Letters 4:231-236.

Vardi, A., Spiegel-Roy, P. and Galun, E. 1982. Plant regeneration from citrus protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Applied Genet. 62:171-176.

Table 1 Effect of various enzyme combinations on yield of mesophyll protoplasts from various species of *Garcinia*.

Enzyme(%)				Yield of protoplasts		
Cellulase RS	Cellulase R10	Macerozyme R10	Pectolyase Y23	mangosteen	somkhag	pawa
-	1	1	-	0	$1.45x10^4$	0
-	1	1.5	-	0	$2x10^6$	0
-	1	2	-	0	$2.6x10^6$	0
-	2	1	-	0	$9x10^5$	0
-	2	1	0.1	0	$1x10^4$	$1.4x10^5$
-	2	1.5	-	0	$9.5x10^5$	0
-	2	2	-	0	$2.4x10^6$	0
-	3	1	0.1	$2,5x10^5$	$2.5x10^4$	$3.6x10^5$
-	4	1	0.1	$1.9x10^5$	$4.5x10^4$	ne
2	-	2	0.5	$1x10^4$	0	0
4	-	2	1	$5x10^4$	0	0

ne=no experiment

Table 2 General apparent of mesophyll protoplasts isolated from somkhag, mangosteen and pawa.

Plant Species		Size (μ)	Color
somkhag	(*G. atroviridis*)	50±5	green
mangosteen	(*G. mangostana*)	40±5	green and purple
pawa	(*G. speciosa*)	20±2	green

Table 3 Effect of 2,4-D, NAA and BA at various concentrations on division of protoplasts of somkhage.

Plant growth regulators		Protoplast division (%)	
NAA (mg/l)	BA (mg/l)	day 7	day 14
0.5	0.5	1.0	6.5
	1.0	3.5	8.5
	3.0	1.5	6.5
	5.0	5.5	10.5
1.0	0.5	2.75	7.5
	1.0	0	0
	3.0	0	0
	5.0	0	0
2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)		
0.5	0.5	27.7	nd
	1.0	22.5	nd
	3.0	26.0	nd
	5.0	34.5	nd
1.0	0.5	10.4	nd
	1.0	17.3	nd
	3.0	17.3	nd
	5.0	17.3	nd

nd=not determine

Table 4 Effect of phytohormones on division of protoplasts of mangosteen.

BA	TDZ	NAA	Protoplast division(%)
0.5	0.5	-	+++ (1-2%)
0.5	0	0.1	+ (0.1-0.5%)

+++: fairly good division, +: poor division

Table 5 Time-consumed and developmental stage of mesophyll protoplasts of somkhag, mangosteen and pawa.

Plant species	Time-consume for first division (day)	Stage of final development
Somkhag (*G. atroviridis)*	1	macrocolony
mangosteen (*G. mangostana*)	4	2-4 cells
pawa (*G. speciosa*)	6	2-4 cells

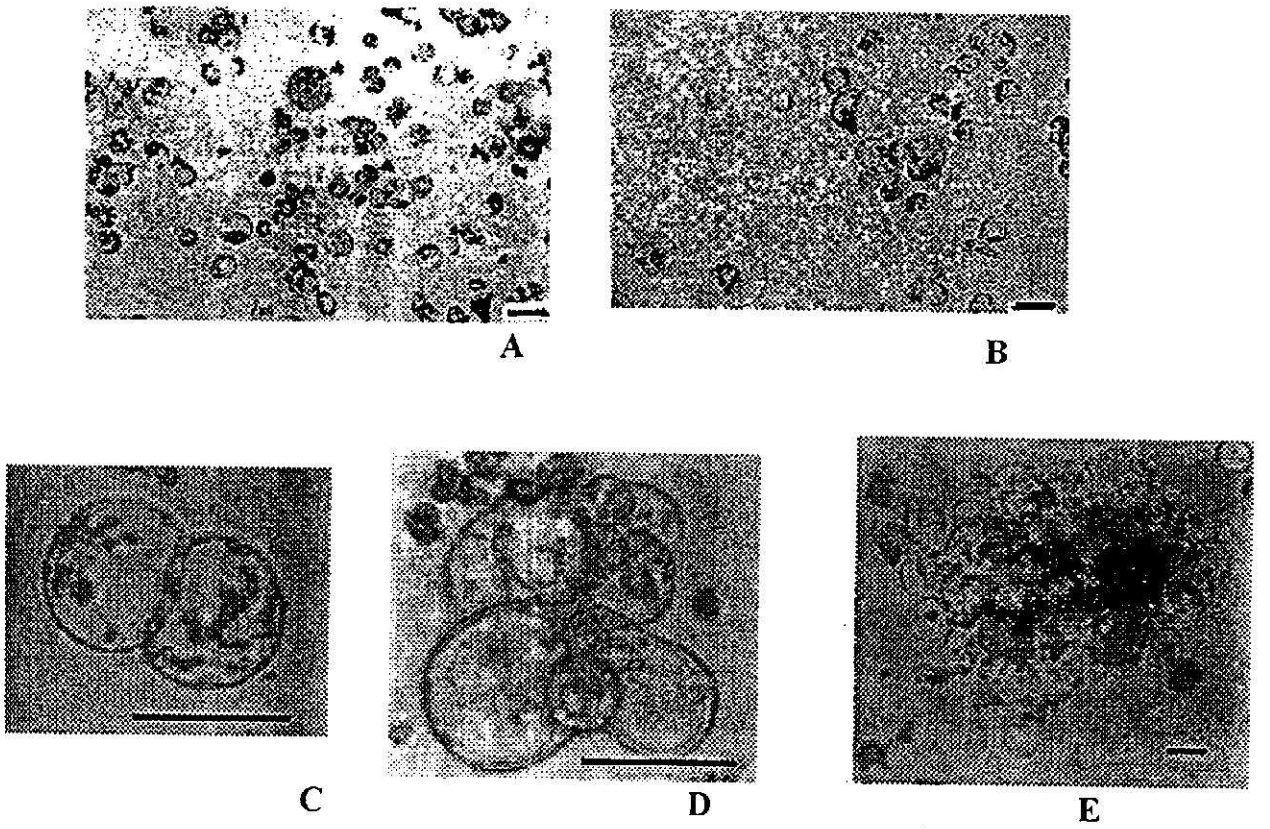


Figure 1 Development of protoplasts of *Garcinia* spp. after culture for diffeent period of times.

(Bar = 50μ)

A: Fresh isolated protoplast of mangosteen.

B: First division of mangosteen protoplast after culture for 4-6 days.

C: First division of somkhag protoplast after 2 days of culture.

D: Second division of somkhag protoplast after 3 days of culture.

E: Macro-colony formation from protoplast of somkhag after 3 week of culture.

ORIGINAL ARTICLE

The isolation, culture and division of protoplasts from Shogun leaves

Sompong Te-chato[1] and Schlida Sriphakdi[2]

Abstract

Te-chato, S. and Sriphakdi, S.
The isolation, culture and division of protoplasts from Shogun leaves
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(2) : 143-151

High yields (6.6 x 10^5 to 1.1x10^6 protoplasts/g.f.wt.) of isolated protoplasts were obtained from seedling leaves of *Citrus sinensis* Blanco cv. "Shogun". Kinds and concentrations of enzyme, pH, physiological ages of the leaves, period of incubation and sources of leaves were important in obtaining high viability of preparations as determined by FDA fluorescence. Seedling leaves at 35 days after emerging or germination incubated in a mixture of enzyme solution composed of 1.5% cellulase (from *Trichoderma viride*) and 1.5% macerozyme R-10 dissolved in 0.7 M mannitol and adjusted pH 5.6 for 3-5 hours gave the highest yield and viability of protoplasts. The culture of mesophyll protoplasts in thin layer of liquid MS medium supplemented with 5 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 mg/l BA (adjusted osmoticum to 0.7M) under dark conditions at 25 ± 2 °C at densities of 2x10^5/ml promoted the highest division and microcolony formation (ca.8-10 cells) at approximately 4%. Adding malt extract to the medium did not improve plating efficiency of the protoplast.

Key words : protoplast isolation, Shogun, plating efficiency

[1]Ph.D. (Plant Cell Technology) Assoc. Prof., [2]M.S. (Plant Science) Master Student, Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.
Received, 22 September 1999 Accepted, 11 January 2000

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต และ ชลิดา ศรีภักดี
การแยก เพาะเลี้ยง และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มโชกุน
ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(2) : 143-151

สามารถแยกโปรโตพลาสต์จำนวนมาก ($6.6x10^5$ ถึง $1.1x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด) ได้จากใบของต้นกล้าส้มโชกุน (*Citrus sinensis* Blanco cv. Shogun) โดยที่ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ อายุของใบ เวลาการอินคูเบชัน และแหล่งของใบที่นำมาใช้แยก มีผลต่อความมีชีวิตเมื่อตรวจสอบด้วยฟลูออเรสเซนไดอะซีเดท ใบจากต้นกล้าอายุ 35 วันหลังจากงอก ให้จำนวนโปรโตพลาสต์และความมีชีวิตสูงสุดเมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส (จากเชื้อ *Trichoderma viride*) เข้มข้น 1.5% ร่วมกับมาเซอโรไซม์ R-10 เข้มข้น 1.5% ซึ่งละลายในแมนนิตอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง การเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นชั้นบาง ๆ ในอาหารเหลวสูตรมูราชิเกะและสกูคเติมกรดแนปธาลีนอะซิติค (NAA) 5 มก./ล. และเบนซิลอะดินีน (BA) 1 มก./ล. (ปรับความดันออสโมติคัมเป็น 0.7 โมลาร์) ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25±2 °C ด้วยความหนาแน่น $2x10^5$ โปรโตพลาสต์/มล. ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้สูงสุด ในอาหารสูตรดังกล่าวสามารถชักนำการสร้างโคโลนีขนาดเล็ก ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวน 8-10 เซลล์ ประมาณ 4% การเติมสารสกัดจากมอลท์ลงไปในอาหารเลี้ยงไม่ช่วยเพิ่มการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

The successful utilisation of protoplasts in research depends upon the ability to isolate large numbers of viable protoplasts. An important factor affecting yield and viability is the first step toward this goal. Physiological age of the leaves and concentrations and pH of the enzymes are important parameters affecting protoplast yields and viability. In the case of citrus, the successful in isolation and culture of protoplasts has been reported in nucellar callus and embryogenic suspension (Wenbin and Zhenghua, 1983; Hidaka and Kajiura, 1988; Ling *et al.*, 1989; Ling *et al.*, 1990; Kunitake *et al.*,1991; Jumin and Nito, 1995; Spiegel-Roy and Vardi, 1984) while mesophyll protoplasts can be isolated at high yield but successful culture is still limited (Grosser and Chandler, 1987). However, cotyledons of Valencia were reported to be the best potential source of protoplasts to achieve high plating efficiency with inherent potential for the regeneration of adventitious organs (Burger and Hackett, 1982).

Plating density has been found to be important in other protoplast systems (Durand, 1979; Nagata and Takebe, 1970; Nehls, 1978; Power *et al.*,1976). Malt extract has also been reported to increase organogenic events in citrus tissue cultures (Kochba and Spiegel-Roy, 1973). In this experiment, we explored factors required for isolating a large number of viable protoplasts and culture methods necessary to achieve high plating efficiency of citrus seedling leaves.

Materials and Methods

Seeds from the fruit of *Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun were used in all experiments. Mature fruit was harvested and the seeds were excised immediately, rinsed under tap water for 15 min and surface sterilised by initial 70% alcohol for 30 sec followed by 1% sodium hypochlorite for 30 min. The seeds were then sown onto hormone-free Murashige and Skoog (MS) (1962) medium. After germination and initial growth phase, seedling leaves were excised and used for protoplast isolation.

Protoplast isolation

The seedling leaves at 35 to 70 days were excised, weighed, sliced into small pieces (less than 2x2 mm) and placed in 60x15 mm plastic Petri-dishes containing 10 ml of various concentrations of cellulase and macerozyme. The Petri-dish containing the leaf pieces and enzyme solution was sealed with Parafilm and rotated at ca. 40 rpm in the dark on a rotary shaker for 3-5 hours. The resulting solution was then passed through a 77-μm nylon mesh to separate protoplasts from cell debris and aggregates. The filtrate containing intact protoplasts was centrifuged at ca. 800 rpm for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 6 ml of MS culture medium. This washing sequence was repeated twice. The final protoplast suspension was purified by floating on 21% sucrose. The complete protoplasts at mid-phase were collected and brought to a known volume and aliquots were taken to measure protoplast yield and viability. The protoplasts were cultured in various methods.

Yield and viability determination

Protoplast counts were made with a hemacytometer. Viability was assessed using fluorescein diacetate (FDA) as a test of membrane integrity and internal diesterase activity. After 5 min in 0.01% (w/v) FDA in culture medium, protoplasts were observed under ultraviolet light using a fluorescein microscope. The percent viability was calculated as the number of protoplasts fluorescing green per total number of intact protoplasts x 100.

Determination of optimum enzyme concentrations and pH

A completely randomized design was designed with cellulase at concentrations of 1.5 and 2% and macerozyme at concentrations of 0.5, 1 and 1.5%. The osmoticum of all the enzyme combinations were adjusted to 0.7 M by mannitol. Leaf segments were exposed to all treatments for a total of 3 hours. Yield and viability measurements were taken at the end of incubation period.

Each pH level (5.4, 5.6, 5.8 and 6.2) tested was used for both yield and viability of the protoplasts. Enzyme concentrations used for isolation were 1.5% cellulase and 1.5% macerozyme R-10.

Plant growth regulators and malt extract effects on dividing protoplasts

Protoplasts were cultured in a thin layer MS medium containing various kinds and concentrations of auxins, cytokinins and gibberellin (GA_3). In the case of malt extract, it was added alone in MT medium or in combination with GA_3. The number of dividing protoplasts was determined by microscopic observation in all cultures.

Methods of culturing and optimum plating density

Three different methods of culturing protoplasts were carried out. These methods were thin layer and embedding in 0.6% agarose and 0.15% Phytagel. Plating efficiency, the percentage of isolated protoplasts undergoing division, was estimated after three weeks in culture. At the time of plating, random fields of protoplasts in agar were marked by etching a circle 1.2 mm in diameter around the area of interest on the plastic petri dish. The number of protoplasts in each field was counted. After three weeks, the number of dividing protoplasts in each field was determined. The plating efficiency was calculated as the number of dividing protoplasts divided by the number of protoplasts plated x 100. The isolated protoplasts, more than 80% viable, were cultured at densities ranging from $1x10^5$/ml to $6x10^5$ in thin layer of ca. 2 ml of MS liquid medium supplemented with 5 mg/l NAA and 1 mg/l BA. The osmoticum of the medium was adjusted by mannitol to 0.7 M.

Physiological ages and time of incubation effects on released protoplasts

Seedling leaves at different ages (30, 35, 45 and 70 days after germination) were collected separately. The leaves were stripped into small pieces and incubated in 1.5% cellulase and 1.5% macerozyme R-10 and this osmoticum adjusted

by mannitol to 0.7M. After incubation under dark conditions on a rotary shaker at 40 rpm at 27±2°C for 3 hours, protoplasts from each age were isolated and their number and viability were compared statistically. In the case of time of incubation, 35-day old leaves were incubated by those combinations of enzyme in the same method as mentioned above. The incubation was carried out with two different times, 3 and 5 hours. At the end of the incubation periods, the number and viability of protoplasts were compared.

Results and Discussion

Determination of optimum enzyme concentrations and pH

Cellulase at 1.5% and macerozyme R-10 1.5% was the best combination for high yield and viability (Table 1). Effects of enzyme concentrations on yield and viability were different. As the concentration of enzymes increased, neither yield nor viability of the protoplasts increased. The critical cellulase concentration with regard to viability was 1.5%. Concentrations higher than this were particularly detrimental to both protoplast yield and viability. Higher concentrations of the two enzymes caused loss of viability and lower concentrations did not liberate sufficient numbers of protoplasts. Commercial enzymes used in the present study might be composed of impure substances, e.g. protease and nuclease. These substances may affect membrane integrity and internal diesterase activity such as reported by Burger and Huckett (1982). However, in their study, Cellulysin was used but the result was nearly the same as the present study in terms of yield or number of the protoplasts.

The pH of the enzyme solution also played a significant role in release of protoplasts. The optimum level of pH in this study was 5.6. At this level large numbers of protoplsts of 1.1×10^6 /g.fr.wt. and viability of about 80% were obtained, significantly greater than the others levels (Figure 1). Increasing the pH to 6.2 produced a harmful effect on both yield and viability of the protoplasts. The effect of pH on isolation of protoplasts has not been widely studied but it is related to H^+ and OH^- released to enzyme solutions leading to integrity and activity of diesterase in internal protplasts.

Table 1. Effect of various combinations of cellulase and macerozyme on yield and viability of protoplasts isolated from seedling leaves of Shogun at 45 days after germination. (the osmoticum of all combinations of the enzyme was adjusted by mannitol to 0.7M)

Cellulase (%)	Macerozyme (%)	Number of protoplasts ($x10^5$/g.fr.wt.)	Viability (%)
1.5	1.5	6.6 a	83.6 a
2.0	0.5	5.0 a	82.1 a
2.0	1.0	5.4 a	69.2 b
2.0	1.5	3.2 a	70.3 b
F-test		*	*
C.V.(%)		37.2	17.1

Means in the column separated by Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

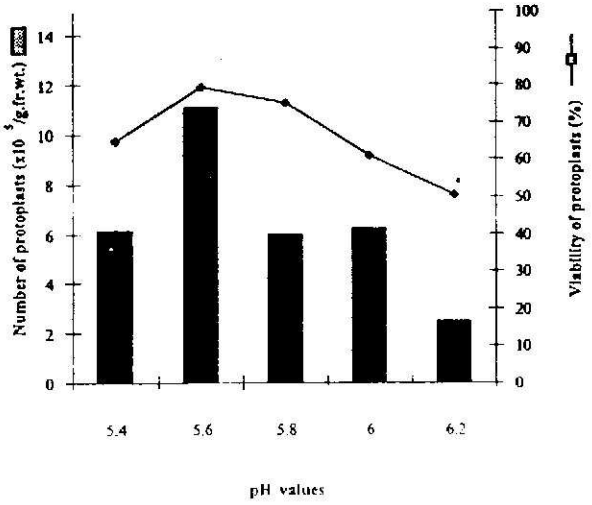


Figure 1 Effect of pH values of the enzymes on yield and viability of protoplasts isolated from 30-day old seedling leaves of Shogun.

Contrary results were obtained in the case of lulo (ma-uk) in which high pH (6.2) provided a high number of released protoplasts (Te-chato, 1988). However, the effect of pH on yield and viability of protoplasts was reported to depend upon plant species. Isolation of some orchid leaves, namely *Aranda*, needed a very low level of pH at 4 (Thongsidum, 1993). In general, pH used for isolation of plant protoplasts might be adjusted to the same pH as the culture medium.

Physiological ages and time of incubation effects on released protoplasts

Thirty five day-old seedling leaves provided the best result in both yield and viability of protoplasts, significantly different from the older leaves (Figure 2). The number of protoplasts obtained from 70-day old seedling leaves was 1/2 that of 35-day old seedling leaves. Generally, older leaves accumulate lignin and suberin or more complex pectin substances that make them very difficult to macerate and digest by macerozyme and wall digest enzymes, respectively. This variation in the number of protoplasts was also reported to depend upon leaf ages and conditions (Grosser and Chandler, 1987).

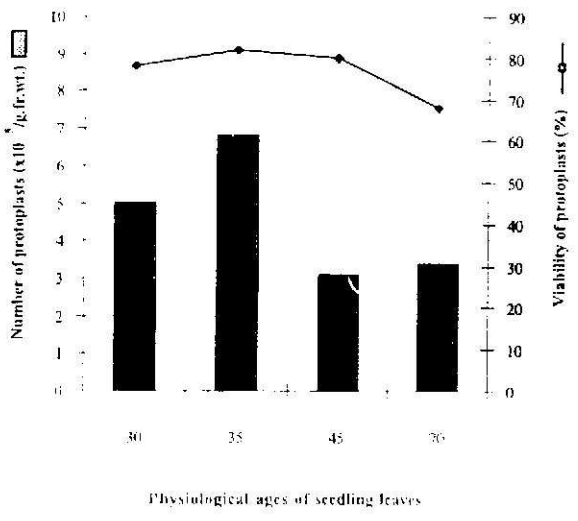


Figure 2 Effect of physiological ages of seedling leaves of Shogun on yields and viability of protoplasts.

Increasing the time of incubation to 5 hours increased the number of protoplasts significantly to $4.5x10^6$/g.fr.wt. the number at 3 hours had been $3.7x10^6$/g.fr.wt.. However, the viability of the protoplasts at longer periods of incubation was inferior (Table 2). In this experiment, incubation at 3 hours is satisfactory for both yield and viability of the protoplasts. Burger and Hackett (1982) reported a high yield and viability of protoplasts isolated from cotyledon of Valecia after incubation under dark conditions for 120-200 min (2-3.3 hours). In many plant species, it was reported that incubating overnight yielded a high number of protoplasts. However, the longer time of incubation of the leaves in the enzyme solution, the less viability of the protoplasts obtained. This is because the protoplasts released earlier were submerged in the enzyme solution and might be damaged by the enzymes and impure substances included in the enzyme solution.

Plant growth regulator and malt extract effects on dividing protoplasts

Protoplast division was increased by increasing the concentration of α-naphthaleneacetic acid (NAA). The best result in division of protoplasts of 4.3% was obtained in the medium containing 3% sugar, 0.7M mannitol, 5 mg/l NAA

Table 2. Effect of incubation time on yield and viability of protoplasts. Seedling leaves at 30-60 days after germination were incubated in 1.5% cellulase and 1.5% macerozyme R-10. Osmoticum adjusted by mannitol to 0.7M.

Time of incubation (hours)	Yield of protoplasts ($x10^5$/g.fr.wt.)	Viability (%)
3	36.6 b	79.2
5	45.3 a	60.0
T-test	*	nd

Means in the column separated by LSD.05
nd: not determined

and 1 mg/l BA. However, the culture medium containing 2 mg/l indole-1-acetic acid (IAA), 2 mg/l zeatin (ZEA) and 2 mg/l GA_3 also gave a high percentage of protoplasts undergoing division (3.2%) (Table 3). Increasing the amount of malt extract from 200 to 600 mg/l to MT medium did not increase the number of dividing protoplasts. The percentage of dividing protoplast, never exceeded 3%. However, increasing the malt extract to 600 mg/l slightly increased the number of dividing protoplasts (Table 4). Contrary to cotyledon protoplasts, supplementing basal MT medium with 1000 mg/l malt extract increased plating efficiency or the number of protoplasts undergoing division (Burger and Hackett, 1982). Kochba and Spiegel-Roy (1973) reported that malt extract included undefined substances that controlled cell wall reformation and cell division and therefore increased protoplast plating efficiency.

Methods of culturing and optimum plating density

Among three methods of culturing, a thin layer of liquid medium provided the best result in dividing protoplasts and prolonged integrity of membranes for more than three weeks, whereas the other two methods resulted in bursting of the protoplasts after a week of culture (Figure 3). Recently, many authors reported a high plating

Table 3. Effect of plant growth regulators contained in MS medium with osmoticum adjusted by 0.7M mannitol used for culturing protoplasts of Shogun seedling leaves.

IAA	ZEA	GA_3	BA	NAA	Divided protoplasts(%)	Degree of budding
		mg/l				
0	0	0	0	0	0	0
0.2	0.2	2.0	0	0	1.0	+
0.2	2.0	0.2	0	0	1.2	+
0.5	0.2	2.0	0	0	1.0	+
1.0	2.0	2.0	0	0	1.6	+
2.0	0.2	2.0	0	0	2.1	+
2.0	2.0	2.0	0	0	3.2	+
0	0	0	0.5	0.5	0.5	+
0	0	0	1.0	0.5	1.0	+
0	0	0	3.0	0.5	1.2	+
0	0	0	5.0	0.5	1.3	+
0	0	0	0.5	1.0	2.0	+
0	0	0	1.0	1.0	1.1	+
0	0	0	3.0	1.0	1.9	+
0	0	0	5.0	1.0	1.5	+
0	0	0	0.5	3.0	1.8	+
0	0	0	1.0	3.0	2.5	+
0	0	0	3.0	3.0	1.2	+
0	0	0	5.0	3.0	1.7	+
0	0	0	0.5	5.0	2.0	+
0	0	0	1.0	5.0	4.3	+
0	0	0	3.0	5.0	3.8	+
0	0	0	5.0	5.0	1.5	+
0	0	0	1.0	10.0	0	0
0	0	0	10.0	1.0	0	0

+ : degree of budding frequency ranging from 0.5 to 1%

Table 4. Effect of GA_3 and malt extract containing MT medium used for culturing mesophyll protoplasts isolated from Shogun seedling leaves.

GA_3 (mg/l)	Malt extract (mg/l)	Degree of cell division	Degree of budding
0	0	0	0
0	200	+	+
0	400	+	+
0	600	++	+
0.1	0	0	0
0.1	200	+	+
0.1	400	+	+
0.1	600	++	+

+ : Degree of cell division or budding ranging from 0.5 to 1%

++: Degree of cell division or budding ranging from 1 to 3%

efficiency of protoplasts by embedding in agarose (agarose bead or disc) even in embryogenic protoplasts of 'Hamlin' sweet orange (Niedz, 1993). However, this method did not improve plating efficiency in citrus (Shogun) in the present study. The maximum percentage of dividing protoplast (ca. 4%) was obtained at $2x10^5$ protoplasts/ml while cotyledon protoplasts of Valecia were obtained at $1x10^5$ protoplasts/ml (Burger and Hackett, 1982). In the case of embryogenic suspension, Vardi *et al.* (1975) also found that 'Shamouti' orange formed colonies at a culture density of ca. $1x10^5$. Hidaka and Kajiura (1988) obtained the best plating efficiency from citrus embryogenic suspension at a culture density ranging from $1x10^5$ to $1x10^6$. So far, there has been no report of success culturing of leaf or mesophyll protoplasts of citrus. In this study, we could induce 8-10 cells or a microcolony from mesophyll protoplasts of

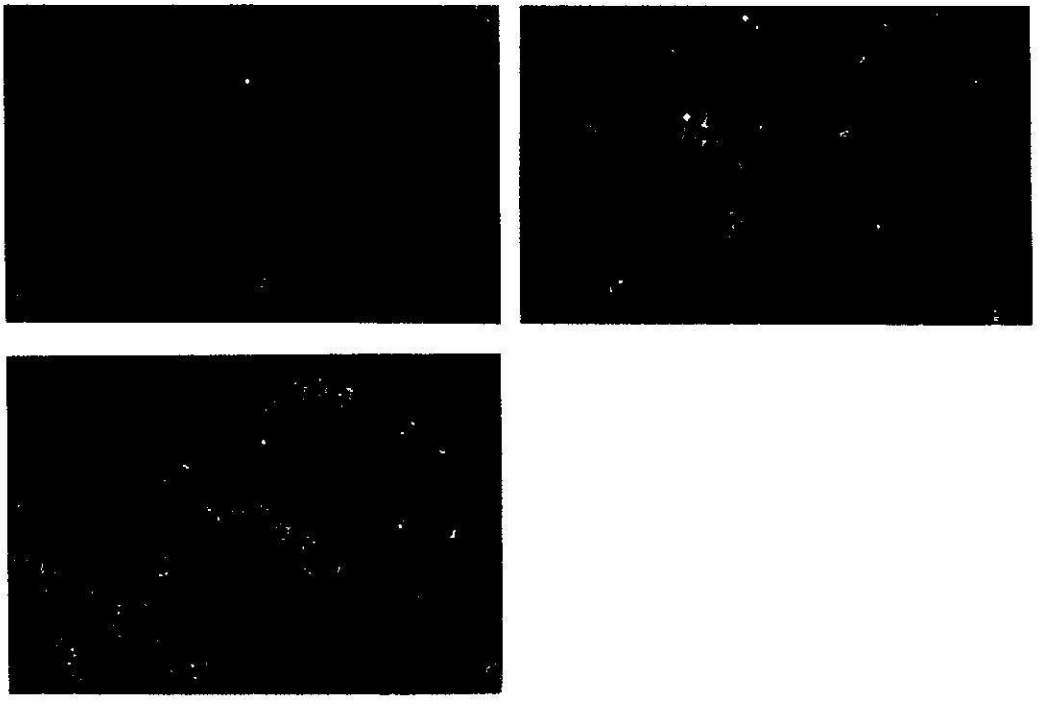


Figure 3 Chracteristics of protoplasts cultured using three different methods. A: Embedded in 0.6% Seaplaque agarose, B: Embedded in 0.15% Phytagel gel and C: Thin layer of liquid MS medium. (Bar=50μm)

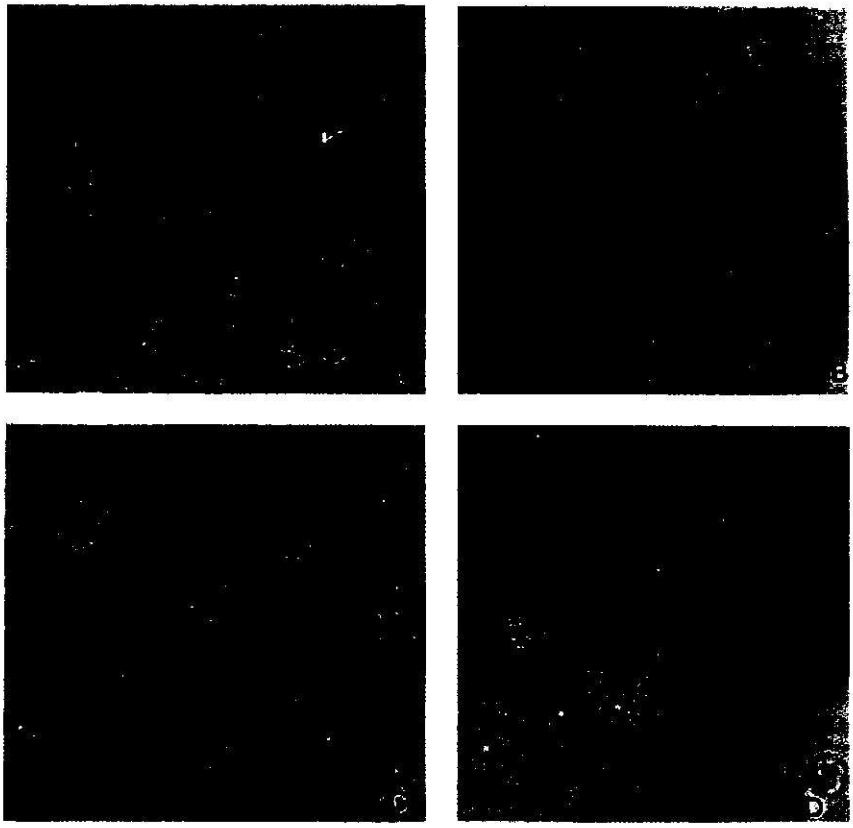


Figure 4 Development of leaf-derived protoplasts of Shogun in thin layer liquid MS medium supplemented with 5 mg/l NAA and 1 mg/l BA and adjusted osmoticum to 0.7M by mannitol (Bar=50μm).
A: Fresh mesophyll protoplasts B: First division (7 days of culture), C: Second division (14 days of culture) and D: microcolony formation (8-10 cells obtained at one month of culture).

Shogun seedling leaves. Development of the protoplasts is shown in Figure 4. Further study should focus on some other plant growth regulators, complex addenda and modified culture media to promote further division of the protoplasts to develop into callus subsequent to organ regeneration.

Acknowledgment

This research is a part of the project, isolation and culture protoplasts of *Citrus* and *Garcinia*, sponsored by annual budget. We also wish to thank Faculty of Grduate School, Prince of Songkla University, Hat Yai, for financial support to master degree student during doing her thesis.

References

Burger, D.W. and Hackett, W.P. 1982. The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons. Physiol. Plant 56:324-328.

Durand, J. 1979. High reproducible plating efficiencies of protoplasts isolated from *in vitro* grown haploid *Nicotiana tabacum* Spegax. et Comes. Z. Pflanzenphysiol. 93:283-295.

Grosser, J. W. and J. L. Chandler. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus x Poncirus* hybrid and *Severinia* for use

in somatic hybridization experiments. Scientia Horticulturae 31 : 253-257.

Hidaka, T. and Kajiura, I. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. Scientia Horticulturae 34:85-92.

Jumin, H. B. and Nito, T. 1995. Embryogenic protoplast cultures of orange jessamine (*Muraya paniculata*) and their regeneration into plants flowering *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41:277-279

Kochba, J. and Spiegel-Roy, P. 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*). Z. Pflanzenzuchtg. 69:156-162.

Kunitake, H., Kagami, H. and Mii, M. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc). Scientia Horticulturae 47:27-33.

Ling, J. T., Nito, N. and Iwamasa, M. 1989. Plant regeneration from protoplasts of calamondian (*Citrus mandurensis* Lour). Scientia Horticulturae 40:325-333.

Ling, J. T., Nito, N., Iwamasa, M. and Kunitake, H. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of satsuma. HortScience 25:970-972.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 15:473-497.

Nagata, T. and Takebe, I. 1970. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99:12-20.

Nehls, R. 1978. Isolation and regeneration of protoplasts from *Solanum nigrum* L. Plant Sci. Lett. 12:183-187.

Niedz, P. R.1993. Culturing embryogenic protoplasts of 'Hamlin' sweet orange in calcium alginate beads. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:19-25.

Power, J.B., Frearson, E.M., George, D., Evans, P.K., Berry, S.F., Hayward, C. and Cocking, E.C. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. Plant Sci. Lett. 7:51-55.

Spiegel-Roy, P. and Vardi, A. 1984. Citrus. **In** Handbook of Plant Cell Culture. (eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, and Y. Yamada) Vol. 3, pp. 355-371 New York:Mcmillan Publishing Company.

Te-chato, S. 1988. Tissue culture of lulo: II Callus induction from mesophyll protoplasts. Songklanakarin J. Sci. Technol. 10:377-384.

Thongsidum, P. 1993. Isolation and culture of Aranda protoplasts. Master thesis in Biological Science. Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla.

Vardi, A., Spiegel-Roy, P. and Galun, E. 1975. Citrus cell culture: Isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens, and regeneration of embryos. Plant Sci. Lett. 4:231-236.

Wenbin, L. and Zhenghua, C. 1983. Protoplast culture and fusion in perennial crops. **In** Handbook of Plant Cell Culture. (eds. Z. Chen, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, and M.R. Sondahl.) Vol. 6, pp. 92-115 New York:McGraw-Hill Publishing Company.

พิมพ์ต้นฉบับ

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*

โสภา ทวีคณะโชติ[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Taweekanachote, S. and Te-chato, S.

Factors affecting isolation of protoplasts of neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) and gene transformation by *Agrobacterium*

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(1) : 15-23

Protoplasts of the neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) were isolated from various sources. One-month-old leaves from all sources were stripped and incubated in various combinations of enzymes for 2, 3 and 4 hours on a reciprocal shaker at 40 rpm. For transformation study, leaf protoplasts were used to co-culture with *Agrobacterium*, at different periods. The results showed that leaves derived from seedling gave the highest number of mesophyll protoplasts (3.07×10^7 protoplasts/g. fr. wt.). However, leaves from cultured epicotyl gave the highest viability of the protoplasts of 89.19%. An optimum enzyme combination for the best result was consisted of 1.5% Cellulase Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23 and 1.0% Macerozyme R-10 dissolved in 0.7 M mannitol. Incubation periods of 3 hours gave the highest yields and viablity of protoplasts of

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

[1]วท.ม. (พืชศาสตร์) นักศึกษา [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

รับต้นฉบับ 7 กันยายน 2542 รับลงพิมพ์ 28 ตุลาคม 2542

9.20x10^6 protoplasts/g fr. wt. and 81.43%, respectively. In comparison of the first with the second pairs of leaves, it was found that the number of viable protoplasts was not significantly different. Transformation study showed that co-cultivation of protoplasts with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) for 5 minutes gave the highest survival rate of 64% at 72 hours of culture. However, division of protoplasts was not seen.

Key words : *Citrus reticulata* Blanco, citrus, protoplasts, transformation, co-culture, *Agrobacterium*

บทคัดย่อ

โสภา ทวีคณะโชติ และ สมปอง เตชะโต

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(1) : 15-23

แยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) จากแหล่งต่าง ๆ โดยนำใบอายุ 1 เดือน มาทั่นฝอยแล้วอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าเป็นไปมาที่ความเร็ว 40 รอบ/นาที สำหรับการปลูกถ่ายยีนทำโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลาต่าง ๆ จากผลการศึกษา พบว่า ใบจริงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 3.07x10^7 โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีความมีชีวิตสูงสุด 89.17% เมื่อแยกด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะ-อาร์เอส เข้มข้น 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1.0% เอนไซม์ดังกล่าวละลายอยู่ในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ การอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด 9.20x10^6 โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด และ 81.43% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 พบว่า ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับการปลูกถ่ายยีนโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) เป็นเวลา 5 นาที ให้ความมีชีวิตรอดมากที่สุด 64% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์

ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) เป็นไม้ผลพื้นเมืองที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้ จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เมื่อโตเต็มที่มีขนาดทรงพุ่มสูง 3-5 เมตร พื้นที่ปลูกส้มจุกมีมากบริเวณจังหวัดสงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และยะลา ผลของส้มจุกต่างจากส้มอื่น ๆ คือ ขั้วผลมีคอ (neck) สูง ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของส้มพันธุ์นี้ จึงเรียกชื่อตามลักษณะผลว่า "ส้มจุก" สำหรับพันธุ์มีเพียงพันธุ์เดียว แต่มี 2 ลักษณะ คือ ชนิดขั้วผลใหญ่ และขั้วผลเล็ก ส้มจุกชนิดที่ขั้วผลใหญ่บนลำต้นมีหนาม ทรงพุ่มแคบ ผลใหญ่ ถุงน้ำหวานใหญ่ เปลือกหนา ให้ผลผลิตน้อย ส่วนชนิดขั้วผลเล็กบนลำต้นไม่มีหนาม หรือหากจะมีบ้างก็เป็นหนามสั้น ๆ ทรงพุ่มกว้าง ให้ผลผลิตมาก (ประสงค์, 2540) ผลส้มจุกมีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5-7.0 ซม. น้ำหนักผล 145-190 กรัม เนื้อผลมีปริมาณน้ำตาล 8% เปลือกหนา 0.3-0.4 ซม. ผิวผลขรุขระ เมื่อสุกแก่มีการเปลี่ยนสีผิวผลเพียงเล็กน้อย มีต่อมน้ำมันใหญ่และถี่ตลอดผล เปลือกหนาล่อน ปอกง่าย มีกลีบประมาณ 9-11 กลีบ ผนังกลีบหนาและเหนียว แยกออกจากกันได้ง่าย ถุงน้ำหวานค่อนข้างบางยาวและฉ่ำน้ำ เนื้อมีสีเหลืองอ่อนและใส รสหวาน หอม อมเปรี้ยวเล็กน้อย เมล็ดประมาณ 4-5 เมล็ด/ผล (มงคล, 2536) การขยายพันธุ์ส้มจุกสามารถทำได้โดยวิธีการติดตา ต่อกิ่ง หรือการตอนซึ่งปัจจุบันกิ่งพันธุ์ส้มจุกที่นำมาปลูกมักประสบปัญหา

กิ่งพันธุ์มีโรคติดมาด้วย ทำให้ต้นส้มเป็นโรค ผลผลิตลดลง และต้นส้มตายในที่สุด โรคที่สำคัญได้แก่ โรคทริสติซา และโรคกรีนนิ่ง ดังนั้นในปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ส้มจุกให้ได้พืชต้นใหม่ที่ปราศจากโรคนับเป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น รวมไปถึงการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast) ก็เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการปรับปรุงพันธุ์ส้มได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ระหว่างพืชต่างสกุลหรือชนิด และยังใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการปลูกถ่ายยีนที่ผ่านการตัดต่อด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนผ่าน *Agrobacterium* ในส้มหลายชนิด (Hidaka *et al.*, 1990; Gmitter *et al.*, 1992; Kaneyoshi *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1992; Pena *et al.*, 1995a, b) หรือการปลูกถ่ายยีนโดยตรงเข้าสู่โปรโตพลาสต์ (Kobayashi and Uchimiya, 1989) โดยการเลี้ยง DNA ร่วมกับโปรโตพลาสต์ซึ่งแยกได้จากเซลล์ซัสเพนชันของส้มพันธุ์ Trovita โดยวิธีการใช้ PEG (polyethylene glycol) โปรโตพลาสต์ที่ปลูกถ่ายยีนพัฒนาให้ 8 โคโลนี บนอาหารคัดเลือก และต่อมา Vardi และคณะ (1990) ปลูกถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของส้มพันธุ์ rough lemon (*Citrus jambhiri*) และชักนำพืชต้นใหม่ที่มีการปลูกถ่ายยีน จำนวน 2 ต้น และเนื่องจากการปลูกส้มจุกในภาคใต้ประสบปัญหาจากไวรัสดังกล่าวแล้วข้างต้น การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงการแยกโปรโตพลาสต์และการปลูกถ่ายยีนผ่านโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มจุกเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ส้มจุกต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุพืช

1.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ด

นำเมล็ดพันธุ์ส้มจุกจากผลที่แก่เต็มที่ มาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2.0% เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3.0% ผงวุ้น (Agar-Agar) 0.6% ซึ่งบรรจุในหลอด ปริมาตร 10 มล. วางเลี้ยงหลอดละ 1 เมล็ด ที่อุณหภูมิ 27±2 °C ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน นำชิ้นส่วนใบ ใบเลี้ยง มาใช้ในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ และนำลำต้นเหนือใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงเพื่อนำใบมาแยกโปรโตพลาสต์และใช้โปรโตพลาสต์ในการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ต่อไป

1.2 การเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ตัดต้นเหนือใบเลี้ยงของส้มจุก ยาว 1 ซม. วางเลี้ยงโดยให้ส่วนโคนสัมผัสอาหาร อาหารที่ใช้เลี้ยง คือ MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% BA 0.5 มก./ล. วุ้น 0.6% เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±2 °C ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน นำใบอายุ 30 วัน หลังจากงอกและจากยอดใหม่ที่สร้างมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ และใช้ปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ต่อไป

2. เชื้อ *Agrobacterium*

ใช้เชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pARK5 มียีนเครื่องหมายต้านทานต่อคานามัยซิน และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งหรือเหลวสูตร YEB (Yeast Extract Broth) เติมคานามัยซิน 50 มก./ล.

3. การแยกโปรโตพลาสต์

หลังทำการอินคิวเบทใบในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลาต่าง ๆ นำสารละลายผสมของโปรโตพลาสต์กับเศษเซลล์มากรองผ่านไนล่อนเมช ขนาดช่อง 77 ไมครอน ใส่หลอดปั่น ขนาด 20 มล. นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายเอนไซม์ตอนบน (supernatant) ออก ล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง แล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 รอบ/นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง จนสารละลายเอนไซม์ถูกกำจัดออกหมด จากนั้นนำซัสเพนชันของโปรโตพลาสต์ไปลอยบนสารละลายน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 20% นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ ซึ่งจะลอยอยู่ตอนกลางระหว่างสารละลายแมนนิทอล และสารละลายซูโครส นำมาล้างอีกครั้งในสารละลายล้าง ปริมาตร 8 มล. ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์บนสไลด์

นับเซลล์อีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล จำนวน ขนาด และรูปร่างโปรโตพลาสต์

4. การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ตรวจสอบความมีชีวิตโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (Fluorescein diacetate, FDA) เข้มข้น 0.1% เติมลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ในอัตราส่วนที่เท่ากันผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหยดบนสไลด์หลุม ปิดด้วยกระจกปิด แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสทำปฏิกิริยากับ FDA แล้ว เรืองแสงสีเขียวเหลืองภายใต้คลื่นอัลตราไวโอเล็ต นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้คือ

$$\% \text{ ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง} \times 100}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

5. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium*

นำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุก ปรับความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายล้าง เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pARK5 ที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหารเหลวสูตร YEB ปรับความหนาแน่นเชื้อ $1x10^6$ เซลล์/มล. ด้วยสารละลายล้างโปรโตพลาสต์และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 นาที หลังการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเชื้อ *Agrobacterium* ที่ความเร็ว 800 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ล้างโปรโตพลาสต์อีกครั้งด้วยอาหารสูตร MS เติม NAA 0.5 มก./ล. และ BA 2.0 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 5.7 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์/มล. ในจานพลาสติคปลอดเชื้อ ขนาด 15x60 มม. ปริมาตร 3 มล. วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26±1 °C

วิธีการศึกษา

1. ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

นำใบเลี้ยง ใบจริงจากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัม มาหั่นฝอย แช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 มล. แล้ววางเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ภายใต้สภาพแสงสลัว ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธีการในข้อ 3 จากนั้นนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ในเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

2. ระยะเวลาการอินคิวเบท

นำใบส้มจุกจากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัม หั่นฝอยแล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ผสม ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% ปริมาตร 10 มล. ปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7 นำไปอินคิวเบท เป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จากนั้นแยก และทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์และตรวจสอบความมีชีวิต เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. ตำแหน่งใบต่อการแยกโปรโตพลาสต์

ตัดใบส้มจุกคู่ที่ 1 และ 2 จากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัม หั่นฝอยแล้วมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ผสม ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% ปริมาตร 10 มล. ปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7 นำไปอินคิวเบท เป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง แยกและทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์และตรวจสอบความมีชีวิตในแต่ละช่วง

เวลาเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium*

นำโปรโตพลาสต์ ซึ่งแยกได้จากใบส้มจุก เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pARK5 โดยใช้โปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์/มล. กับเชื้อ *Agrobacterium* ความหนาแน่น $1x10^6$ เซลล์/มล. (อัตราส่วน 1 : 1) เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อ *Agrobacterium* ออกจากโปรโตพลาสต์ วางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และความสามารถในการปลูกถ่ายยีน จากกิจกรรมของ GUS ในแต่ละเวลาการเลี้ยงร่วม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกันในแต่ละสายเชื้อ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วม

ผลและวิจารณ์

1. ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

เมื่อนำใบเลี้ยง ใบจริงจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 2.0% สามารถแยกได้จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงสูงสุด $1.80x10^7$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ เอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% ให้โปรโตพลาสต์ $1.09x10^7$ / กรัมน้ำหนักสด (Table 1) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาตรวจสอบความมีชีวิต พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยการใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% มีความมีชีวิตสูงสุด 80.90% ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบจริงของต้นกล้าเพาะเมล็ดนั้น พบว่า การใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2.0% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% สามารถแยกได้โปรโตพลาสต์สูงสุด คือ $3.86x10^7$ /กรัมน้ำหนักสด แต่โปรโตพลาสต์จากใบจริงมีความมีชีวิตสูงสุด 85.86% เมื่อแยกด้วยการใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% เพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ดังกล่าวมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $8.48x10^6$ /กรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 89.19% (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากทั้ง 3 ชิ้นส่วน พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีขนาดใหญ่ที่สุด มีคลอโรพลาสต์หนาแน่น (Figure 1A) ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบจริงของต้นกล้าและใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่เล็กกว่าโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง (Figure 1B และ 1C) นอกจากนี้ความหนาแน่นของคลอโรพลาสต์น้อยกว่าด้วย สำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วย FDA แสดงใน Figure 1D

2. ระยะเวลาการอินคิวเบท

จากการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% ร่วมด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่า ช่วงเวลาต่าง ๆ ให้ผลการแยกโปรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P 0.01) การใช้เวลา 4 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $1.52x10^7$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความมีชีวิต พบว่า การอินคิวเบทที่เวลาดังกล่าวให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุด คือ 49.22% เวลาอินคิวเบท 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์รองลงมา คือ $9.20x10^6$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด แต่ให้ความมีชีวิตสูงสุด คือ 81.43% ส่วนการอินคิวเบทใบส้มจุกร่วมกับสารละลายเอนไซม์ข้างต้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำสุด คือ $7.20x10^5$ โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 77.71% (Table 2)

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

Sources of protoplasts	Enzyme (%)			Protoplasts/ g. fr. wt.	Viability (%)
	PY-23	CRS	M R-10		
Cotyledons	0.1	1.0	2.0	$3.60x10^6$bc	68.86
	0.1	1.5	1.0	$1.09x10^7$a	80.90
	0.1	2.0	1.0	$2.80x10^6$c	75.30
	0.1	2.0	2.0	$7.20x10^6$b	77.50
	0.1	1.5	2.0	$1.80x10^7$a	68.18
Average				**$8.50x10^6$**	**74.15**
F-test				**	ns
C.V.(%)				21.96	19.14
Seedling leaves	0.1	1.0	2.0	$2.45x10^7$	68.45
	0.1	1.5	1.0	$3.07x10^7$	85.86
	0.1	2.0	1.0	$3.86x10^7$	68.53
	0.1	2.0	2.0	$3.36x10^7$	64.29
	0.1	1.5	2.0	$3.12x10^7$	64.60
Average				**$3.17x10^7$**	**70.35**
F-test				ns	ns
C.V.(%)				32.98	12.80
Epicotyl-derived leaves	0.1	1.5	1.0	$8.48x10^6$	89.19

** significant difference at P 0.01 ns : non significant difference
Means not having letters in common within columns differ significantly by DMRT
PY-23 = Pectolyase Y-23, CRS = Cellulase Onozuka RS, M R-10 = Macerozyme R-10

3. ตำแหน่งใบต่อการแยกโปรโตพลาสต์

นำใบจริงส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง มาทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5% ร่วมด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1% และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0% ที่ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ อินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3)

4. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium*

จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเหลวสูตร MT เติม NAA 0.5 มก./ล. BA 2.0 มก./ล. พบว่า ภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงทุกระยะเวลาการเลี้ยงร่วม เมื่อศึกษาผลของพลาสมิดภายใน *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนภายหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ที่ทุกระยะเวลาการเลี้ยงร่วมให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 การเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 5 นาที โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดมากที่สุด (Table 4) อย่างไรก็ตามเมื่อวางเลี้ยงต่อไป พบว่าโปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงและตายหมดในที่สุดในทุกหน่วยการทดลอง และจากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออกในโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ทั้งสองพลาสมิดและชุดเปรียบเทียบในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก พบว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ความเข้มข้นต่ำ ให้โปรโตพลาสต์

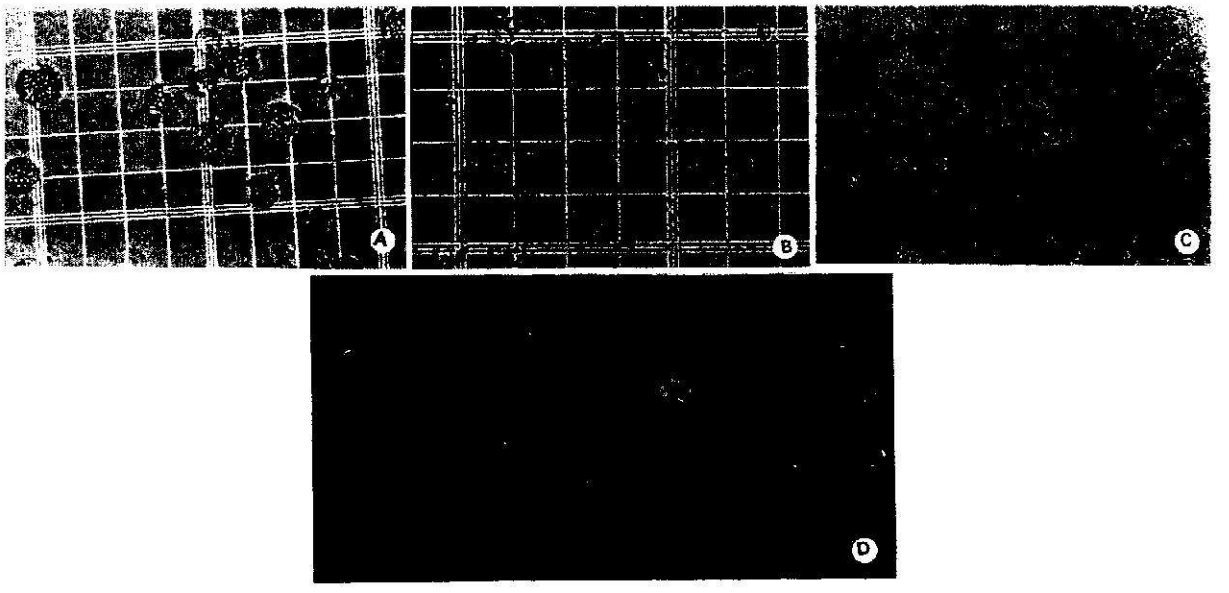


Figure 1. Mesophyll protoplasts derived from different sources and viability of protoplasts from epicotyl-derived leaves.
A. Cotyledon protoplasts (X200) C. Epicotyl-derived leaf protoplasts (X300)
B. Seedling leaf protoplasts (X300) D. Viability of protoplasts from epicotyl-derived leaves (X400)

Table 2. Effect of incubation period on yield and viability of protoplasts.

Incubation period (hour)	Protoplasts/g. fr. wt.	% Viability
2	$7.20x10^5$c	77.71a
3	$9.20x10^6$b	81.43a
4	$1.52x10^7$a	49.22b
Average	**$8.37x10^6$**	**69.45**
F-test	**	**
C.V. (%)	22.23	13.95

** significantly different at P 0.01
Means not having letters in common within columns differ significantly by DMRT

ที่มีชีวิตมากกว่าการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง สมปอง (2530) รายงานว่า การใช้เอนไซม์ดังกล่าวความเข้มข้นสูง ส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจากใบถั่วฝักยาวลดลง ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะในองค์ประกอบของเอนไซม์ดังกล่าวยังมีเอนไซม์โปรทิเอสและนิวคลิเอสซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ด้วย อย่างไรก็ตาม Grosser และ Chandler (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากใบจากแปลงปลูกของส้ม *Citrus aurantium* L. พืชสกุลใกล้เคียงกับส้ม คือ *Severinia buxifolia* Poir. Ten. และ *Poncirus trifoliata* L. Raf. และ

Table 3. Effect of leaf position on yield and viability of protoplasts.

Leaves position	Protoplasts/g. fr. wt.	Viability (%)
First pair	$6.14 x10^6$	88.40
Second pair	$7.50x10^6$	87.65
Average	**$6.82x10^6$**	**88.03**
T-test	ns	ns
C.V. (%)	22.29	9.82

ns : non significant difference

Table 4. Effect of co-cultivation time of mesophyll protoplasts with *Agrobacterium* on viability of protoplasts.

Agrobacterium	Co-cultivation time (minute)	% Viability of protoplasts ± S.E.		
		24	48	72 hours
Control		81.11 ± 2.96	56.37 ± 10.31	50.83 ± 1.39
LBA4404	5	78.18 ± 3.95	67.57 ± 3.05	64.36 ± 4.94
(pBI121)	10	75.22 ± 3.02	67.78 ± 1.39	63.79 ± 2.45
	15	67.50 ± 3.79	58.57 ± 2.35	56.49 ± 2.41
Average		**73.63 ± 3.59**	**64.64 ± 2.26**	**61.55 ± 3.27**
LBA4404	5	76.54 ± 1.34	49.19 ± 4.45	50.03 ± 4.81
(pARK5)	10	65.52 ± 3.45	52.76 ± 4.42	62.17 ± 2.63
	15	72.37 ± 4.78	52.52 ± 3.64	49.02 ± 3.11
Average		**71.48 ± 3.19**	**51.49 ± 4.17**	**53.74 ± 3.31**

S.E. = Standard error

ลูกผสมระหว่างส้มกับพืชสกุลใกล้เคียง คือ *C. paradisi* กับ *P. trifoliata* และลูกผสมระหว่าง *C. sinensis* กับ *P. trifoliata* โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.0% ร่วมกับเพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.2% และมาเซอเรส เข้มข้น 1.0% ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 2-6x10^7 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักสดใบ 1 กรัม Shimizu และคณะ (1985) อ้างโดย Kurl (1988) รายงานว่า การเติมเพคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.01% ร่วมกับเซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อน แต่ในการศึกษานี้ต้องใช้เอนไซม์เพคโตไลเอสวาย-23 ความเข้มข้นสูงกว่า (0.1%) เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก

การทำงานของเอนไซม์จะดีหรือไม่นั้นยังขึ้นกับปัจจัยอื่นอีกหลายประการ เช่น ชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ แม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่นำมาจากแหล่งต่างกัน คุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ก็แตกต่างกัน ในการศึกษานี้ พบว่า ใบจริงที่เพาะเมล็ดให้โปรโตพลาสต์สูงกว่าใบเลี้ยงและใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง นอกจากแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์แล้วระยะเวลาการการอินคิวเบทที่เหมาะสมก็มีผลต่อการจำนวนและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ จากการทดลอง พบว่า การอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เหมาะสำหรับแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก การอินคิวเบทเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สั้นเกินไปทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย ในขณะที่การใช้เวลานานขึ้น (4 ชั่วโมง) ส่งเสริมให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้น แต่จะทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง วิไลลักษณ์ และสุธาทิพย์ (2537) รายงานว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาการอินคิวเบทใบมะเขือเทศนานขึ้น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เริ่มลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาได้มีโอกาสถูกย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ได้นานขึ้น จึงทำให้โปรโตพลาสต์แตกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อายุของใบที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ต่างจากรายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากถั่วฝักยาวพันธุ์ มก. 7 โดย สมปอง (2530) ซึ่งพบว่า ความอ่อนแก่ของใบมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป Kao และ Michayluk (1980) กล่าวว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบคู่ที่ 1 นับจากยอดของอัลฟัลฟ่าให้จำนวน ความมีชีวิต ตลอดจนค่าการเจริญของโปรโต พลาสต์สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบคู่ที่ 2, 3 และ 4

การปลูกถ่ายยีนโดยวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* พบว่า เมื่อวางเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบมีเยื่อหุ้มเซลล์บาง ทำให้แตกง่าย Kobayashi และ Uchimiya (1989) รายงานการประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยตรงเข้าสู่โปรโตพลาสต์ซึ่งแยกได้จากเซลล์ซัสเพนชันของส้มพันธุ์ Trovita ด้วยวิธีการนำโปรโตพลาสต์เลี้ยงร่วมกับ DNA ภายใต้การให้ PEG (polyethylene glycol) แล้วเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้รับ DNA ในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยวิธีเดียวกันนี้ Vardi และคณะ (1990) ปลูกถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของส้มพันธุ์ rough lemon และได้พืชต้นใหม่ที่ผ่านการปลูกถ่ายยีน จำนวน 2 ต้น การปลูกถ่ายยีนกับโปรโตพลาสต์ส้มจุกไม่สามารถใช้วิธีเลี้ยงร่วมกับ PEG (น้ำหนักโมเลกุล 4000 เข้มข้น 20%) ได้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีเยื่อหุ้มเซลล์บาง ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และ PEG มีความหนืดจึงทำให้เป็นอันตรายต่อเซลล์ ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ หรือใช้ *Agrobacterium* ความหนาแน่นต่ำกว่า $1x10^6$ เซลล์/มล. เลี้ยงร่วมกับโปรโตพลาสต์ส้มจุก เพื่อความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนส้มจุกต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลในตระกูลส้มและมังคุด ซึ่งได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากงบประมาณประจำปี สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาแก่นักศึกษาปริญญาโทในครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

ประสงค์ หนุแดง. 2540. ส้มจุกดี ๆ ที่จะนะ. ใน ศาสตร์แห่งส้ม. (บรรณาธิการ พาณิชย์ ยศปัญญา) หน้า 142-145. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มติชน.

มงคล แซ่หลิม. 2536. การผลิตส้ม. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา. 2537. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มะเขือเทศ. ว. แก่นเกษตร 22 : 133-138.

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

Gmitter, F. G., Grosser, J. W. and Moore, G. A. 1992. *Citrus*. **In** Biotechnology of Perennial Fruit Crops (eds. F. A. Hammerschlag and R. E. Litz) pp. 335-369. Wallingford : Cambridge University Press.

Grosser, J. W. and Chandler, J. L. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus* x *Poncirus* hybrid and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. Scientia Horticulturae 31 : 253-257.

Hidaka, T., M. Omura, M. Ukagi, M. Tomiyama, A. Kato, M. Ohshima and F. Motoyoshi. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. Jpn. J. Breed. 40 : 199-207.

Kaneyoshi, H. J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N. and Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). Plant Cell Reports 13 : 541-545.

Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol. 96 : 135-141.

Kobayashi, S. and Uchimiya, H. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. Jpn. J. Genet. 64 : 91-97.

Kurl, W.R. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops : small fruits. Scientia Horticulturae 37 : 231-245.

Moore, G. A., Jacano, C. C., Neidigh, J. L., Lawrence, S. D. and Cline, K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 11 : 238-242.

Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Ortega, C., Pina, J. A., Duran-Vita, N. and Navarro, L. 1995a. High effiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. Plant Science 104 : 183-191.

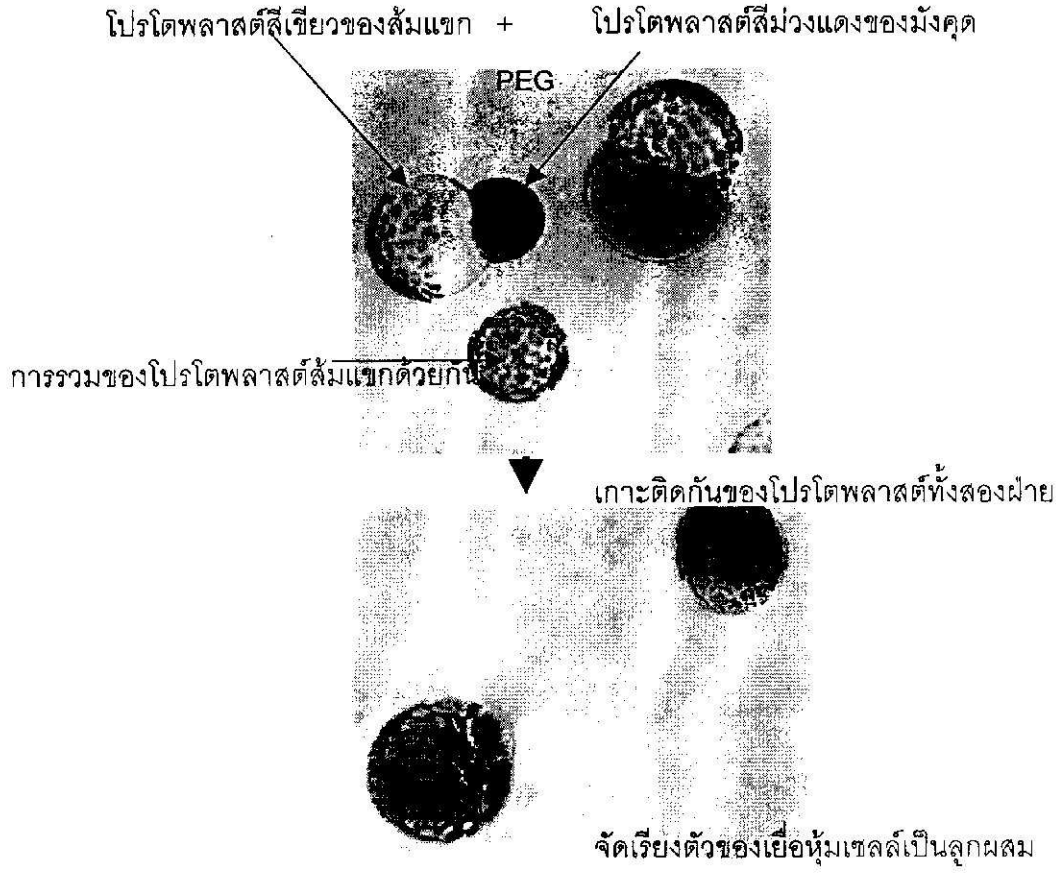
Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Ortega, C., Pina, J. A., Duran-Vita, N. and Navarro, L. 1995b. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 14 : 616-619.

Vardi, A., Bleichman, S. and Aviv, D. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant Science 69 : 199-206.

ผลงานวิจัยเพิ่มเติม

การศึกษาเบื้องต้นถึงการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างมังคุดกับส้มแขก

ในการศึกษานี้รวมโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดซึ่งมีลักษณะเด่นคือมีสีม่วงอันเนื่องมาจากมีรงควัตถุแอนโธไซยานินกับส้มแขกซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาให้โคโลนีขนาดใหญ่ได้ สัดส่วนของความหนาแน่นที่ใช้รวมนั้นใช้โปรโตพลาสต์มังคุด $2x10^5$ ต่อมิลลิลิตร และส้มแขก $1x10^5$ ต่อมิลลิตร (2:1) โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในการรวมครั้งนี้ใช้สารละลาย PEG เข้มข้น 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ทุกความเข้มข้นใช้เวลา 5 นาที เลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมและโปรโตพลาสต์ส้มแขกซึ่งเป็นชุดควบคุมในอาหารเหลวสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โปรโตพลาสต์ทั้งหมดปรับความหนาแน่นในการเลี้ยงเริ่มต้นเป็น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน พบว่า โปรโตพลาสต์ชุดควบคุมและโปรโตพลาสต์ลูกผสมในทุกความเข้มข้นของ PEG ส่วนใหญ่แตก โปรโตพลาสต์บางส่วนที่ไม่แตกยังมีสีเขียวของเม็ดคลอโรพลาสต์และยังไม่เปลี่ยนรูปร่าง (กลม) และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า โปรโตพลาสต์ลูกผสมที่ได้จากการใช้สารละลายรวมทุกความเข้มข้นแตกและตายหมด ส่วนโปรโตพลาสต์ชุดควบคุม (ส้มแขก) ที่ยังไม่แตกเปลี่ยนรูปร่างจากกลมเป็นรีและบางเซลล์เริ่มคอด และมีการแบ่งเซลล์ตามปกติต่อไปได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงต่อไปไม่สามารถชักนำการพัฒนาเป็นแคลลัสได้



ภาพที่ 1 การรวมโปรโตพลาสต์มังคุดและส้มแขกโดยใช้สารละลาย PEG

รายละเอียดผลการวิจัยเพิ่มเติม

ดังได้กล่าวไว้ในตอนต้นแล้วว่าชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นปัจจัยหลัก รองลงมาเป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืช นอกจากนี้ก็ยังรวมถึงอายุ และวิธีการเตรียมชิ้นส่วนพืชก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ข้อมูลดังกล่าวกำลังดำเนินการรวบรวมเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ต่อไป และได้นำมาเสนอไว้ในรายงานการวิจัยฉบับนี้ด้วยเพื่อเป็นข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยท่านอื่นที่สนใจต่อไป

1. การปรับปรุงการแยกโปรโตพลาสต์มังคุด

ในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสีแดงมังคุดโดยใช้กลุ่มยอดที่วางเลี้ยงในอาหารสองชั้น อายุ 7 สัปดาห์หลังเติมอาหารเหลว ใช้ใบสด 1 กรัม อินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบอ่อนสีแดงมังคุด

เอนไซม์ (%)				จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)	ความมีชีวิต (%)
CR-10	CRS	MR-10	PY-23		
1	-	1	0.1	5.0	73.17
2	-	1	0.1	56.0	65.63
2	-	1	0.5	ไม่แยก (เซลล์แตก)	nd
2	-	1	1.0	ไม่แยก (เซลล์แตก)	nd
-	4	2	1	5.5	44

CR-10 = cellulase Onozuka R- 10

CRS = cellulase Onozuka RS

MR-10 = macerozyme R-10

PY-23 = pectolyase Y23

nd = ไม่ตรวจสอบ

- = ไม่เติม

การเตรียมใบอ่อนมังคุดจากกลุ่มยอดที่เลี้ยงบนอาหารสองชั้นที่มีอายุ 10 สัปดาห์ หลังจากเติมอาหารเหลวก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์เช่นเดียวกัน การเตรียมใบโดยการตัดใบแล้วเก็บไว้ในที่มืดก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ช่วยให้การแยกโปรโต

พลาสต์ประสบผลสำเร็จสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการตัดใบและแช่ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของการเตรียมใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ของใบอ่อนมังคุด

วิธีการเตรียมใบ	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)	ความมีชีวิต (%)
ไม่มีการเตรียม	10	80.49
ตัดใบไว้ในที่มืด 24 ชม.	100	91.35
ตัดใบแช่ในแมนนิทอล 24 ชม.	น้อยมากไม่แยก	-

- = ไม่ตรวจสอบ

ในกรณีของอายุใบมังคุดนั้น พบว่าเมื่อนำใบอายุ 1, 2 และ 3 เดือนหลังจากเติมอาหารเหลวมาอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ cellulase Onozuka R- 10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ macerozyme R-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ pectolyase Y23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นับจำนวนและความมีชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่อายุใบได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของอายุใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบมังคุด

อายุใบ (เดือน)	จำนวนโปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักสด ($x10^4$)	ความมีชีวิต (%)
1	2.5	72.97
2	18.5	77.63
3	26.5	68.12

เพื่อส่งเสริมการพัฒนาการของไมโครโคโลนีไปเป็นแคลลัส และพืชต้นใหม่ต่อไปได้มีการศึกษาการใช้ผงถ่านและ PVP ร่วมกับการเพาะเลี้ยงทั้งนี้เพื่อให้สารดังกล่าวช่วยดูดยึด หรือยับยั้งกระบวนการสร้างสารประกอบโพลีฟีโนลที่อาจมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงใน Phytagel เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/

ลิตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2 หรือ 3 สัปดาห์ จึงเติมอาหารเหลวที่มีผงถ่าน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาในการเติมอาหารเหลวที่เติมผงถ่านต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ส้มแขกหลังจากเติม 1 และ 2 สัปดาห์

ระยะเวลาที่เติม	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์	
(สัปดาห์)	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์
1	ส่วนใหญ่แตก , ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ	ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ
2	ส่วนใหญ่แตก , ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ	ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ
3*	ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ขึ้น , ไม่พบการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ	บางเซลล์เริ่มคอด แต่ยังไม่พบการแบ่งเซลล์

* เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ไม่มีการพัฒนาใด ๆ

สำหรับการใช้ PVP เข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแล้วเติมทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 มิลลิลิตร ให้ผลในทำนองเดียวกับการใช้ผงถ่าน หลังจากเติมอาหารที่มี PVP ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 พบว่า ทุกความเข้มข้นของ PVP ที่ใช้ทำให้โปรโต พลาสต์ส่วนใหญ่แตก และไม่มีการแบ่งเซลล์หรือแตกหน่อ อย่างไรก็ตาม PVP 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้โปรโตพลาสต์แตกน้อยที่สุด แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปไม่มีพัฒนาการใด ๆ