

การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์เพาะเลี้ยง
ของถั่วเหลือง (*Glycine max* L.)
Protoplasts Isolation from Cell Culture
of Soybean (*Glycine max* L.)

พงศ์ยุทธ์ นวลบุญเรือง¹ วันชัย ดีเอกนามกุล² และสันห์ พนิชยกุล³
Phongyuth Nualbunruang, Wanchai De-Eknamkul, and Sanha Panichajakul

ABSTARCT

For the protoplasts isolation from callus, only friable callus which was cultured on B5 medium under the presence of 2,4-D and BA could be used as a source. The optimum conditions for protoplasts isolation from callus were demonstrated by using 4% Cellulase, 0.5% Macerozyme in 11 and 13% mannitol at pH 5.6 and at log phase stage. Appropriate incubation time was found at 2 hour in the dark on the rotary shaker. Three percents Cellulase and 0.5% Macerozyme in 10% mannitol at pH 5.2 were found to be the proper combination for the isolation of protoplasts from intact cell growing in liquid culture. BA and 2,4-D were proved to be essential components for the cell lines used in protoplast isolation. Same as callus the appropriate stage was log phase. Cells regeneration from protoplasts started to divide in four days after cultivated in K8P liquid medium without hormone.

Key words : soybean, protoplast

¹ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง จ.ลำปาง

Lampang Agricultural Research and Training Centre, Lampang 52000, Thailand.

² ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

³ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khonkaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

บทคัดย่อ

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์เพาะเลี้ยงถั่วเหลืองซึ่งกระตุ้นจากใบอ่อนคู่แรก พบว่าแคลลัสแบบ friable ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D และ BA เท่านั้นที่สามารถใช้เป็นแหล่งของโปรโตพลาสต์ได้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสคือ ความเข้มข้นของเซลล์ต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 % แมนนิทอล 11 และ 13% และ pH 5.6 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง และการเติบโตของเซลล์อยู่ในช่วง log phase ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยคือ ความเข้มข้นเซลล์ต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 % แมนนิทอล 10% pH 5.2 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง การเติบโตของเซลล์อยู่ในช่วง log phase เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่ไม่ใส่ฮอร์โมนจะสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายใน 4 วัน แต่โปรโตพลาสต์ไม่มีการเจริญเติบโตต่อ

คำนำ

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชชั้นมนุษย์ได้เริ่มสนใจมาตั้งแต่ปี 1892 โดย Klercher แยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีตัดเซลล์แล้วแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงให้โปรโตพลาสต์แยกออกมา จนกระทั่งมีการใช้เอนไซม์ในปี 1960 โดย Cocking จนปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เกี่ยวกับการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดและได้นำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การศึกษาทางด้านชีวเคมี และการหาความสัมพันธ์กับเชื้อสาเหตุของโรคพืช จนปัจจุบันความก้าวหน้าได้มาถึงจุดที่มนุษย์สามารถตัดต่อ DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการใส่เข้าไปในโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้พืชใหม่

ที่มีคุณสมบัติตามที่ผู้ศึกษาต้องการมากที่สุด

สำหรับการศึกษาและวิจัยทางด้านการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองนั้นได้รับความสนใจมากมายเช่นกัน โดย Schwenk *et al.* (1982) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบคู่แรกได้โดยวิธีหั่นใบและแช่ในเอนไซม์ Cellulase R10 และ Pectolyase Y23 ต่อมา Xu *et al.* (1982) สามารถที่จะแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากรากถั่วเหลืองได้และสามารถเลี้ยงจนได้เป็นแคลลัส ต่อมา Gamborg (1983) ได้ทำการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชตระกูล Glycine พบว่า *G. max*, *G. soja* และ *G. tabacina* สามารถที่จะเลี้ยงให้สร้างผนังเซลล์แบ่งเซลล์และเกิดโครงสร้างที่เหมือนกับเอ็มบริโอ (embryo-like structure) ได้ นอกจากนี้ Chowhury and Widholm (1985) ก็สามารถที่จะเลี้ยงให้โปรโตพลาสต์เจริญไปเป็นแคลลัสได้เช่นกัน โดยที่จำนวนโครโมโซมของแคลลัสมีปริมาณปกติ

Neewell and Luu (1985) สามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ *G. canescens* จนเจริญและพัฒนามากลับเป็นต้นได้สำเร็จรวมถึง Wei and Xu (1988) สามารถที่จะแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงอ่อน และพัฒนาให้เจริญเป็นต้นได้โดยใช้อาหาร K8P เสริมด้วย 2,4-D, NAA และ zeatin โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้เป็นจำนวน 4 พันธุ์ จากการทดลอง 6 พันธุ์ ส่วน Myers *et al.* (1989) ได้แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองพันธุ์ป่า 2 พันธุ์ คือ *G. canescens* และ *G. clandestina* โดยใช้อาหาร MSB เสริมด้วย BA zeatin kinetin และ NAA พบว่า โปรโตพลาสต์ของ *G. canescens* สามารถแบ่งตัวได้ 48% และ *G. clandestina* แบ่งได้ประมาณ 11%

ในการศึกษารั้วนี้ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลือง ที่เลี้ยงทั้งในสภาพอาหารแข็งและอาหารเหลว เนื่องจากว่าการแยกโปรโตพลาสต์จาก

ใบของถั่วเหลืองทำได้ยากและการแยกจากเซลล์เพาะเลี้ยงยังมีข้อดี คือตัดปัญหาการปนเปื้อนอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

ทำการเพาะถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ในวุ้น 0.7% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้น 7 วัน จึงนำไปสู่แรกมาฟอกฆ่าเชื้อ ตัดให้ได้ขนาด 0.3×0.3 ซม. นำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. ส่วนเซลล์แขวนลอยนำเอาแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ 2,4-D 1 มก./ล.

การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส

ทำการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสชนิด compact ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. และชนิด friable ที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. โดยใช้ความเข้มข้นของ Cellulase R10 0.2-4% และ Macerozyme R10 0.2-1% บนเครื่อง rotary shaker นับปริมาณโปรโตพลาสต์ด้วย haemocytometer นอกจากนี้ให้นับปริมาณโปรโตพลาสต์ทุกๆ ชั่วโมง แปรผัน pH ของสารละลายเอนไซม์ ตั้งแต่ 5.0 -6.0 ปริมาณแมนนิทอล 8-13% นอกจากนี้ยังหาระยะของการเจริญเติบโต (growth stage) ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ โดยเลี้ยงแคลลัสในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ทุกๆ 7 วัน หาน้ำหนักแห้งและทำการแยกโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

ทำการแยกโปรโตพลาสต์ของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1-2 มก./ล. และ B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ

2,4-D 2 มก./ล. โดยใช้ความเข้มข้นของ Cellulase R10 0.5 - 4% และ Macerozyme R10 0.5% บนเครื่อง rotary shaker แปรผัน pH ของสารละลายเอนไซม์ตั้งแต่ 5.0 - 6.0 ปริมาณแมนนิทอล 8 - 13% นับปริมาณโปรโตพลาสต์ทุกๆ ชั่วโมง นอกจากนี้ยังหาระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์โดยเลี้ยงในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ทุกๆ 7 วัน หาน้ำหนักแห้งและทำการแยกโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ซูโครส 21% และนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว K8P ที่ไม่ใส่ฮอร์โมน โดยให้ปริมาณโปรโตพลาสต์ในอาหารเท่ากับ 10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

ผลและวิจารณ์

จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสชนิด compact และ friable พบว่าแคลลัสแบบ compact ไม่สามารถที่จะแยกโปรโตพลาสต์ได้แม้ว่าจะได้เพิ่มปริมาณมาเซโรไซม์ถึง 2% และ เซลลูเลส 4% ก็ยังแยกไม่ได้ จะได้เฉพาะเป็นกลุ่มเซลล์ที่หลุดออกมาโดยจะเกาะกลุ่มประมาณ 20-30 เซลล์ขึ้นไป ในขณะที่แคลลัสแบบ friable ที่มี 2,4-D เป็นแหล่งของออกซิน สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี ในทำนองเดียวกันเซลล์แขวนลอยชนิดที่ใช้ NAA เป็นแหล่งออกซินเซลล์ส่วนใหญ่จะรวมตัวกันเป็นก้อนทำให้เซลล์เกาะตัวกันแน่นไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่มี 2,4-D เป็นแหล่งออกซินสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี ทั้งนี้เพราะว่า 2,4-D สามารถทำให้เกิดแคลลัสเป็นแบบ friable คือมีลักษณะฉ่ำน้ำ และเซลล์เกาะตัวกันหลวม จึงทำให้เซลล์กระจายตัวได้ดีไม่เกาะกันมากในการเพาะเลี้ยง

แบบเซลล์แขวนลอย (Figure 1, 2)

สำหรับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส คือ ความเข้มข้นของเซลลูเลส ต่อมาเซโรซิมเป็น 4:0.5% และในเซลล์แขวนลอยเป็น 3:0.5% (Figure 3) จัดว่าเป็นการใช้ความเข้มข้นเซลลูเลสในการแยกค่อนข้างสูงโปรโตพลาสต์ที่ได้โดยเฉลี่ยมีขนาดประมาณประมาณ

8-20 ไมครอน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอยู่ในช่วง 60-75% g,เมื่อย้อมดูด้วย Fluorescein Diacetate (Figure 4,5) เมื่อเทียบกับรายงานของ Schwenk *et al.* (1982) ซึ่งใช้เซลลูลูเลสเพียง 0.2% ส่วน Myers *et al.* (1989) และ Chowhury and Widholm(1985) ใช้เพียง 1% อาจจะเนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารกับสภาพของพืชที่นำ



Figure 1 Characteristic of callus;compact callus in B5 supplemented with 1 mg/l BA and 0.15 mg/l NAA(right), and friable callus in B5 supplemented with 2 mg/l BA and 2 mg/l 2,4-D(left).



Figure 2 Characteristic of cell suspension; in B5 supplemented with 0.15 mg/l NAA and 1 mg/l BA(right),and in B5 supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 2 mg/l BA(left).

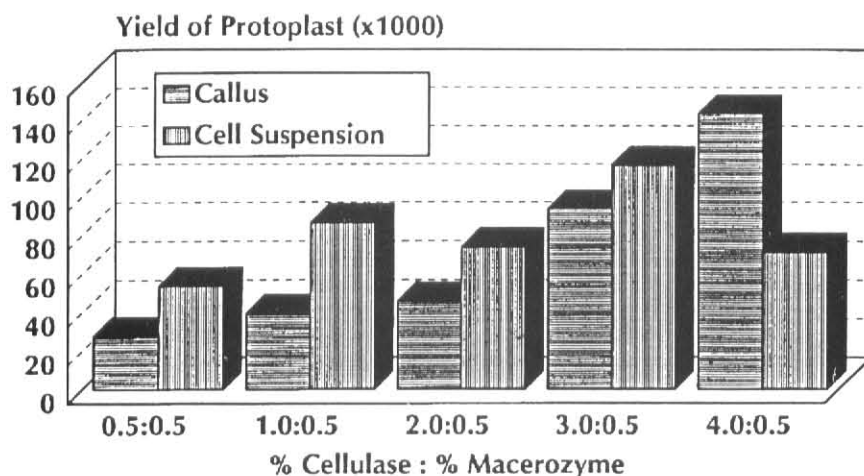


Figure 3 Yield of protoplas isolated from callus at various concentration of cellulase and macerozyme.

มาจากธรรมชาติ จะมีองค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันไป

เวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส และเซลล์แขวนลอยจะเท่ากันคือ 2 ชั่วโมง โดยจะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงสุด (Figure 6) ซึ่งจะเร็วกว่าการแยกจากใบเลี้ยงอ่อนซึ่งใช้เวลา 18 ชั่วโมง (Wei and Xu, 1988) จากรากใช้เวลา 16 ชั่วโมง (Xu *et al.*, 1982) แต่ช้ากว่าใบซึ่งใช้เวลา 1 ชั่วโมง (Schwenk, 1981) และ สอดคล้องกับการแยกในเซลล์แขวนลอยของ Chowhury and Widholm (1985) และ Myers *et al.* (1989) ซึ่งใช้เวลา 2 ชั่วโมง

สำหรับ pH ที่เหมาะสมในการแยกนั้น ถ้าแยกจากแคลลัสใช้ 5.6 และถ้าแยกจากเซลล์แขวนลอยได้ 5.2 (Figure 7) การศึกษาด้าน pH ยังไม่พบรายงานการศึกษา แต่ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ในช่วง 5.5 สำหรับการแยกจากใบ, ใบเลี้ยง (Schwenk, 1981; Wei and Xu 1988) และ 5.5-5.6 สำหรับการแยกจากเซลล์แขวนลอย (Myer *et al.* 1989; Chowhury and Widholm 1985)

สำหรับความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซิสนั้น ในแคลลัสใช้แมนนิทอล ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10 และ 13% ส่วนในเซลล์แขวนลอยใช้

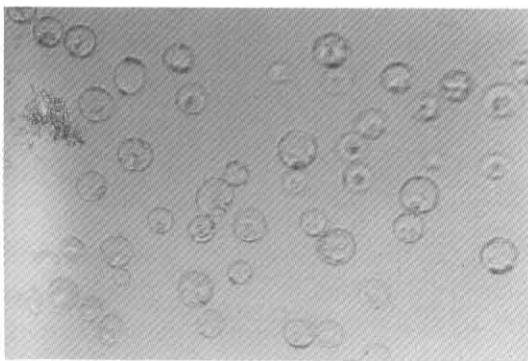


Figure 4 Protoplasts isolated from callus.

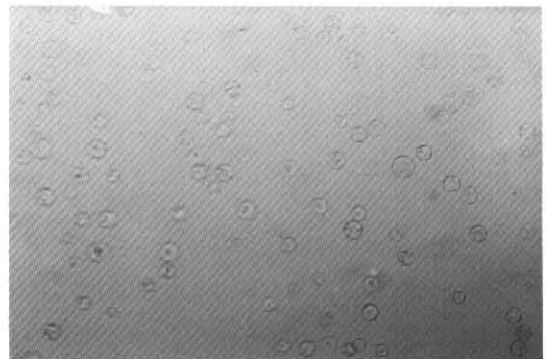


Figure 5 Protoplasts isolated from cell suspension.

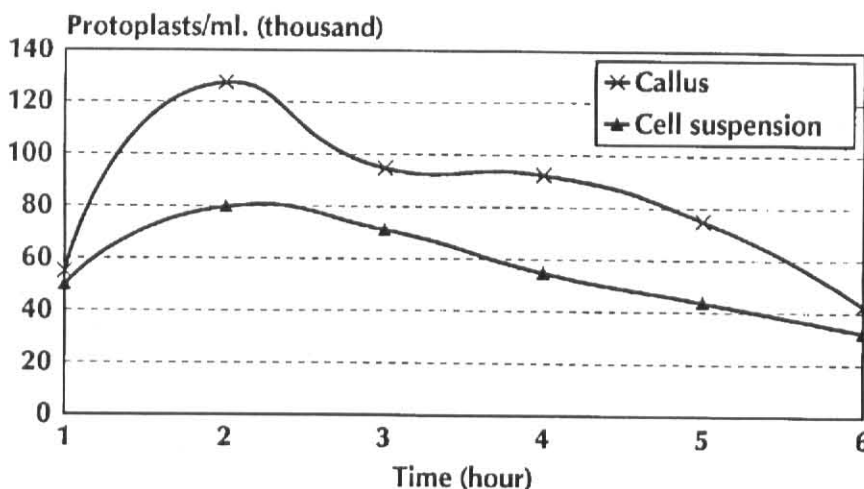


Figure 6 Yield of protoplasts at various hours.

10% (Figure 8) ซึ่งใกล้เคียงกับ Schwenk (1981) ซึ่งใช้ 8% ในขณะที่ Myer *et al.* (1988) ใช้สูงถึง 12.7% และ Xu *et al.* (1982) ใช้ 13%

ส่วนอายุหรือระยะที่เหมาะสมของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยในการแยกโปรโตพลาสต์ ควรจะอยู่

ในระยะ log phase (Figure 9,10) โดยแคลลัสส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึง 6 ส่วนในเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึง 4 เนื่องจากว่าเซลล์ในระยะนี้มีอัตราการแบ่งตัวค่อนข้างสูง การสร้างผนังเซลล์จะถูกสร้างบางๆ มีปริมาณเซลลูโลส

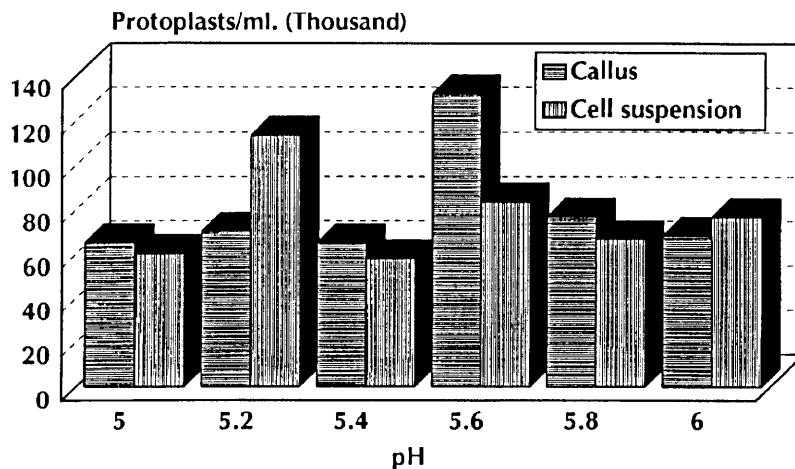


Figure 7 Yield of protoplasts at various pH.

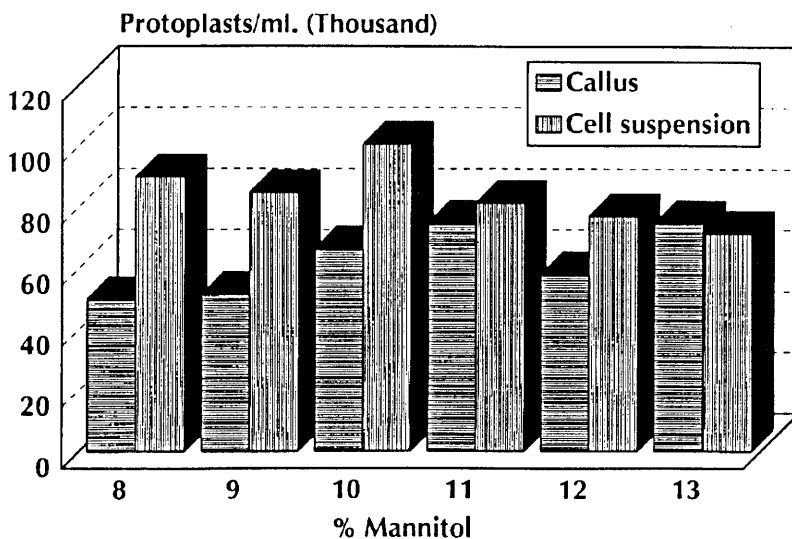


Figure 8 Yield of protoplasts at various concentration of mannitol.

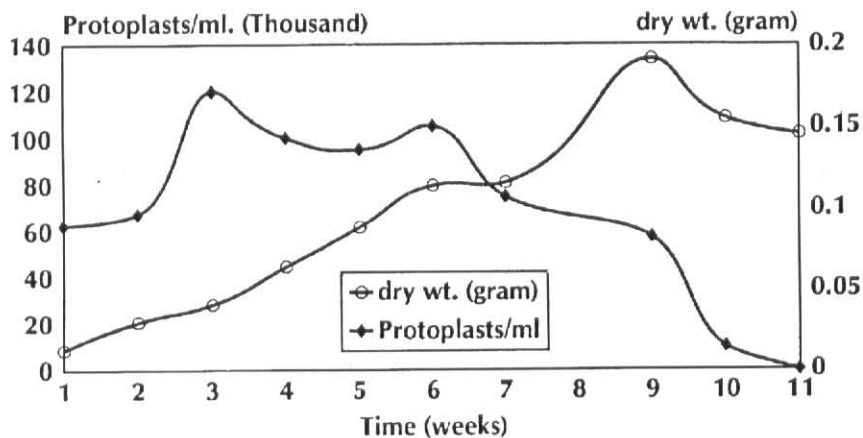


Figure 9 Growth curve and yield of protoplasts of callus.

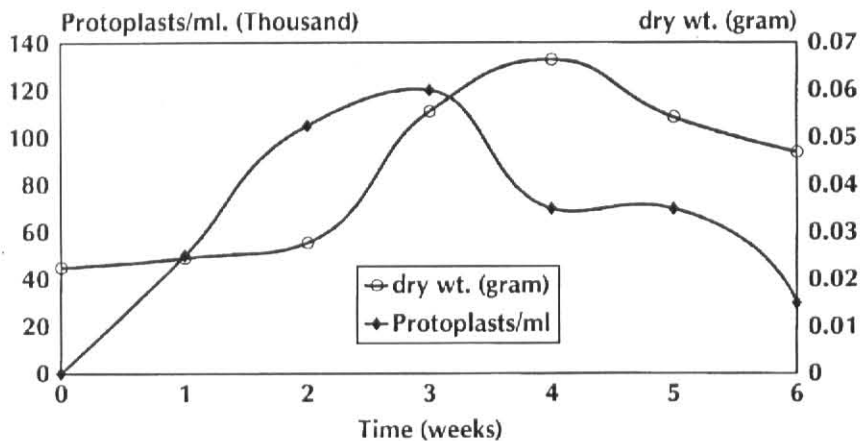


Figure 10 Growth curve and yield of protoplasts of cell suspension.

อยู่น้อย

ส่วนในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้ทั้งจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอย หลังจากที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย ซูโครส 21% แล้ว นำไปเลี้ยงในอาหาร K8P ด้วยความเข้มข้น 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อ มล. พบว่าสามารถแบ่งตัวได้หลังจากเลี้ยงไป 4 วัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื่องจากว่าเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปก็ไม่สามารถที่จะแบ่งตัวต่อไปได้ (Figure 11)



Figure 11 Cell division of protoplast of soybean in K8P medium.

สรุป

จากการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลือง พบว่าชนิดของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเป็นสิ่งสำคัญต่อความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์ที่สุด โดยจะต้องเลือกใช้สารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสมให้ได้ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีกระจายตัวได้ดี ไม่เกาะตัวกันแน่นตลอดจนระยะการเจริญ (growth stage) ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่จะนำมาแยกก็ต้องใช้ระยะการเจริญที่เหมาะสมเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

- Chowhury, V.K. and J.M Widholm . 1985. Callus production from photoautotrophic soybean cell culture protoplasts. Plant Cell Reports. 4: 289-292.
- Gamborg, O.L. 1983. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Glycine* species. Plant Cell Reports. 2: 209 - 212.
- Myers, J.R., P.A. Lazzeri, and G.B. Collins. 1989. Plant regeneration of wild *Glycine* species from suspension culture derived protoplasts. Plant Cell Reports. 8:112-115.
- Neewell C.A. and H.T. Luu . 1985. Protoplast culture and plant regeneration in *Glycine canescens*. Plant Cell Tissue Organ Culture. 4: 145-149.
- Schwenk, F.W., C.A. Pearsan, and M.R. Roth . 1982. Soybean mesophyll protoplasts. Plant Science Letter. 23: 153-155.
- Wei, Z. and Z. Xu. 1988. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). Plant Cell Reports. 7: 348: 351.
- Xu, Z-H., M.K. Davey, and E.C. Cocking . 1982. Callus formation from root protoplasts of *Glycine max*. Plant Science Letter. 24:111-115.