



การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการรวมโพรโทพลาสต์แฝก (*Vetiveria zizanioides*) Optimization of Protoplast Fusion Conditions of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*)

คชาภรณ์ ทองดอนยอด และสุมนา เหลืองจิติกัญญา*
Khachapohn Thongdonyod and Sumana Leangthitikanchna*

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000
Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Muang, Phayao
56000, Thailand

*Corresponding author, e-mail: sumana.le@up.ac.th

(Received: Mar 27, 2020; Revised: Jun 18, 2020; Accepted: Jun 29, 2020)

บทคัดย่อ

แฝก (*Vetiveria zizanioides*) เป็นพืชตระกูลหญ้าที่ถูกนำมาใช้ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ การปรับปรุงพันธุ์แฝกด้วยวิธีปกติยังมีข้อจำกัด เนื่องจากดอกของแฝกมีลักษณะเป็นหมัน ซึ่งการนำเทคโนโลยีการรวมโพรโทพลาสต์มาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์แฝกจะช่วยลดข้อจำกัดดังกล่าวได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการรวมโพรโทพลาสต์ระหว่างแฝกลุ่ม สายพันธุ์กำแพงเพชร 2 และแฝกดอน สายพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ โดยใช้สายละลาย Polyethylene glycol (PEG) เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมโพรโทพลาสต์ เมื่อนำโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบของแฝกทั้งสองสายพันธุ์มาบ่มร่วมกับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 10, 20 และ 30% เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที วางแผนการทดลองแบบ 4×3 แฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (4×3 Factorial in CRD) จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าการใช้สารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 10% ร่วมกับระยะเวลาในการชักนำ 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์แฝกแบบ Binary fusion และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์สูงสุด เท่ากับ 43.45 และ 89.63% ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างโพรโทพลาสต์แฝกผสมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์แฝกต่อไป

คำสำคัญ : แฝก การรวมโพรโทพลาสต์ ลูกผสมคู่ โพลีเอทิลีนไกลคอล

Abstract

Vetiver (*Vetiveria zizanioides*) belongs to Poaceae family which is used for soil and water conservation. The improvement of this grass through the conventional breeding is very limited due to male sterility. Protoplast fusion technology is a useful technique that can be solved this limitation in vetiver improvement. Therefore, this study aimed to optimize the protoplast fusion conditions for somatic hybridization between two vetiver grass varieties, including Kamphaeng Phet 2 (*Vetiveria zizanioides* Nash) and Prachuap Khiri Khan (*Vetiveria nemoralis* A. Camus) by polyethylene glycol (PEG)-mediated method. The mesophyll protoplasts of both varieties were incubated with various combination between concentrations of PEG 6000 (10, 20 or 30%) and incubation periods (10, 20 or 30 min). The experimental design is 4×3 completely randomized factorial design (4×3 factorial in CRD) with 3 replications. The results showed that the highest percentage of binary fusion (43.45%) and the viability of protoplasts (89.63%)

were obtained from 10% PEG 6000 with 30 min incubation period. This research is the preliminary study which is useful to produce somatic hybridization for vetiver improvement in the future.

Keywords: Vetiver grass, Protoplast fusion, Binary fusion, Polyethylene glycol

บทนำ

แฝก (*Vetiveria zizanioides*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลหญ้า ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ เนื่องจากมีระบบรากลึกและสานกันแน่นแผ่กระจายไปในดิน ในประเทศไทยแบ่งแฝกออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แฝกตอนและแฝกลุ่ม โดยแฝกตอน เช่น สายพันธุ์กำแพงเพชร 1 ประจวบคีรีขันธ์ และปางกว้าง เป็นต้น มีระบบรากลึกและแผ่กระจายตรงลงไปในดินตามแนวดิ่ง รากเป็นกระจุกเหมือนใยพองน้ำ ดูดซับน้ำและป้องกันการพังทลายของหน้าดินได้ดี ต้นสูง 100-150 เซนติเมตร แต่แฝกตอนไม่เป็นที่นิยมในการนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีข้อเสียคือส่วนของใบแหลมคม เมื่อสัมผัสใบอาจทำให้เกิดบาดแผลได้ และทำให้การจัดการค่อนข้างยากเมื่อเปรียบเทียบกับแฝกลุ่ม เช่น สายพันธุ์กำแพงเพชร 2 ศรีลังกา และพระราชทาน เป็นต้น ซึ่งใบของแฝกลุ่มนั้นจะยาวตั้งตรง ใบมีไขเคลือบไม่สากคาย ทำให้ไม่เกิดบาดแผลเมื่อสัมผัส ต้นสูง 150-200 เซนติเมตร จากลักษณะของลำต้นที่สูงนั้นทำให้เกิดการแข่งขันกันในการเจริญเติบโตระหว่างลำต้นกับราก ทำให้รากแฝกลุ่มเจริญไม่เป็นกอดีเท่ากับแฝกตอน (Hayeehateng & Keawnok, 2014, pp. 22-26; Sivaarthikul, 2015, pp. 13-14) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์แฝกตอนให้มีลักษณะลำต้นและใบเหมือนแฝกลุ่ม และยังคงลักษณะรากของแฝกตอนไว้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้เกิดการใช้ประโยชน์จากแฝกตอนเพิ่มมากขึ้น แต่การปรับปรุงพันธุ์แฝกด้วยวิธีมาตรฐานยังมีข้อจำกัด เนื่องจากดอกแฝกมีลักษณะเป็นหมัน การขยายพันธุ์แฝกส่วนใหญ่จึงเป็นแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแยกหน่อและนำไปเพาะชำ (Hayeehateng & Keawnok, 2014, pp. 15-31) การนำเทคโนโลยีการรวมโปรโทพลาสต์ (Protoplast fusion) มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แฝก จึงเป็นวิธีการที่ช่วยลดข้อจำกัดดังกล่าวได้ โดยสามารถส่งสารพันธุกรรมหรือออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เข้าไปในโปรโทพลาสต์พืชได้โดยตรง ทำให้ได้พืชที่มีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป (Kativat, 2011, pp. 2-3)

โปรโทพลาสต์เป็นเซลล์พืชที่ผ่านกระบวนการย่อยเอาผนังเซลล์ออกด้วยเอนไซม์ มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบองค์ประกอบภายในไว้ โดยผนังเซลล์พืชมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบและแต่ละเซลล์เชื่อมติดกันด้วยชั้นที่เรียกว่า มิดเดิลลามেলা ซึ่งมีเพคตินเป็นองค์ประกอบ (Keegstra, 2013, pp. 483-484; Gu & Catchmark, 2013, pp. 1613-1615) ดังนั้นจึงต้องใช้เอนไซม์ในกลุ่ม Cellulase เช่น Cellulase Onuzuka R-10 ในการย่อยเซลลูโลส และ Pectinase เช่น Mazerozyme R-10 ในการย่อยเพคติน เพื่อแยกโปรโทพลาสต์เดี่ยว ๆ ก่อน จากนั้นจึงนำโปรโทพลาสต์ที่แยกได้มารวมกันโดยใช้กระแสไฟฟ้าหรือสารเคมี วิธีที่นิยม ได้แก่ การใช้สารละลาย Polyethylene glycol (PEG) เนื่องจากทำได้ง่ายให้อัตราการรวมกันของโปรโทพลาสต์สูง ราคาไม่แพง มีความเป็นพิษต่ำ และมีผลต่อความมีชีวิตของโปรโทพลาสต์น้อย (Badr-Elden *et al.*, 2010, p. 53) โดยทั่วไปนิยมใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1500-6000 ความเข้มข้นที่ใช้ 25-40% ร่วมกับระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการรวมโปรโทพลาสต์ 10-40 นาที (Shalsh *et al.*, 2016, p. 14) โดยเฉพาะการใช้ PEG 6000 สามารถชักนำให้เกิดการรวมโปรโทพลาสต์ได้ดี และประสบผลสำเร็จในการสร้างลูกผสมในพืชหลายชนิด เช่น ละหุ่ง และสบู่ดำ (Tudses *et al.*, 2015, pp. 50-56) ใช้ PEG 6000 เข้มข้น 30% ที่ระยะเวลา 10 นาที, ชิง (Guan *et al.*, 2010, pp. 279-284) ใช้ PEG 6000 เข้มข้น 30% ที่ระยะเวลา 15 นาที, สัมโอ และสัมเขียวหวาน (Wulandar *et al.*, 2018, pp. 233-241) ใช้ PEG 6000 เข้มข้น 40% ที่ระยะเวลา 10 นาที เป็นต้น

ความสำเร็จในการรวมโปรโทพลาสต์นั้นขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ความเข้มข้นและองค์ประกอบของสารละลาย PEG ระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการรวมโปรโทพลาสต์ และชนิดของพืชและพันธุ์ เป็นต้น (Tudses *et al.*, 2015, p. 51; Shalsh *et al.*, 2016, pp. 14-17) ดังนั้นการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการรวม

โพรโทพลาสต์ระหว่างแฟลกุ่มและแฟกตอน โดยการใช้สารละลาย PEG จึงมีความสำคัญ เพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการสร้างแฟลกุ่มผสมและการปรับปรุงพันธุ์แฟกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย PEG ร่วมกับระยะเวลาในการชักนำการรวมโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสมต่อการสร้างโพรโทพลาสต์แฟลกุ่มผสม และควมมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์แฟก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแฟกในสภาพปลอดเชื้อ

นำหน่อแฟลกุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์กำแพงเพชร 2 และแฟกตอน ได้แก่ สายพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ ที่มีอายุ 4 เดือน นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ลอกกาบใบ 2-3 ชั้น ตัดให้เหลือหน่อขนาดยาว 5 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox เข้มข้น 15% และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแต่งชิ้นส่วนของหน่อให้มีตายอดหรือตาข้างติดอยู่มีขนาด 1.5-2.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962, pp. 473-497) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตร และปรับ pH 5.6-5.8 เติมน้ำ 7 กรัมต่อลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงภายในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อนของแฟกในสภาพปลอดเชื้อ

2. การแยกโพรโทพลาสต์แฟก

นำใบแฟกทั้ง 2 สายพันธุ์ อายุ 2 เดือน จากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 1 ก และ ข) โดยใช้ใบทั้งหมด ชั่งน้ำหนักให้ได้ จำนวน 0.5 กรัม มาหั่นตามขวาง เติมสารละลายล้างโพรโทพลาสต์ (Protoplast washing solution; PWS) ที่ประกอบด้วย Mannitol 0.5 M และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM ที่ pH 5.6 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นาน 20 นาที เพื่อปรับสภาพเซลล์ให้มีความพร้อมก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์ เมื่อครบเวลาดูด PWS ออก จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์โดยสายพันธุ์กำแพงเพชร 2 ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 0.5% (w/v) (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), Macerozyme R-10 0.5% (w/v) (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), Mannitol 0.5 M และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM ที่ pH 5.6 และสายพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ ใช้สารละลายเอนไซม์ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1% (w/v), Macerozyme R-10 0.4% (w/v), Mannitol 0.5 M และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM ที่ pH 5.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที กรองโพรโทพลาสต์ด้วยตะแกรงกรองขนาด 40 mesh ผ่านไปยังหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge (Bio-Active Co., Ltd.) ที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดเก็บเอนไซม์และล้างตะกอนโพรโทพลาสต์ด้วย PWS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำสารละลายโพรโทพลาสต์ลอยบนสารละลายซูโครส 20% เพื่อแยกโพรโทพลาสต์ให้บริสุทธิ์ โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที และดูดเก็บสารละลายโพรโทพลาสต์ที่อยู่บนผิวของสารละลายซูโครส แล้วล้างด้วย PWS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นหยดสารละลายโพรโทพลาสต์ลงบน Haemocytometer เพื่อนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการรวมโพรโทพลาสต์แฟก

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย PEG 6000 และระยะเวลาการรวมโพรโทพลาสต์ โดยนำสารละลายโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบแฟกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาปรับความหนาแน่นเท่ากับ 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 หยด ในหลอด Microcentrifuge เติมสารละลาย PEG 6000 เข้มข้น 10, 20 และ 30% ร่วมกับ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5 M, KH_2PO_4 0.7 mM และ Glucose 0.1 M ที่ pH 5.6 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มไว้ 10 นาที เติม Washing medium

(High Ca^{++} /High pH) ที่ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 M, Mannitol 0.1 M และ Glycine 0.1 M ที่ pH 10.5 จากนั้น บ่มร่วมกันเพื่อชักนำให้เกิดการรวมโพรโทพลาสต์ระหว่างแฟก 2 สายพันธุ์ เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าวตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์ ด้วย Haemocytometer โดยนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่รวมกัน และจำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์ โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่เกิดการรวม} \times 100}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}}$$

และตรวจสอบความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์ ด้วย Trypan blue 0.4% (Sigma, USA) ดัดแปลงจากวิธีของ Tuds et al. (2014, pp. 221-230) โดยดูดสารละลายโพรโทพลาสต์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ร่วมกับ Trypan blue 0.4% ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มไว้นาน 10 นาที หยดลงบน Haemocytometer และนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิต ซึ่งจะไม่ติดสีของ Trypan blue (ภาพที่ 2 ก) จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในขณะที่โพรโทพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงินของ Trypan blue (ภาพที่ 2 ข) เนื่องจากการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่ไม่ติดสีของ} \times 100}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}}$$

4. สถิติและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 4×3 แฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (4×3 Factorial in CRD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนแบบ One-Way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

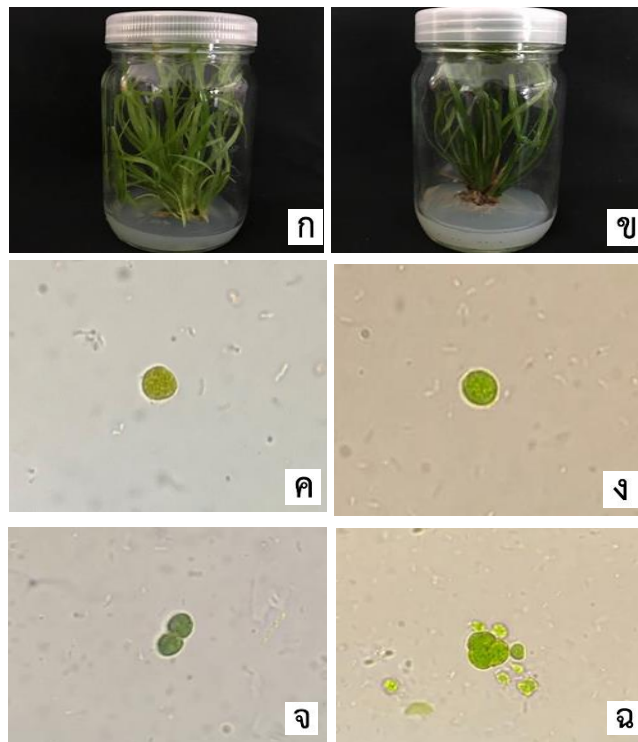
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกโพรโทพลาสต์จากใบแฟกสายพันธุ์กำแพงเพชร 2 และประจวบคีรีขันธ์ ด้วยสารละลายเอนไซม์ Cellulase Onozuka R-10 และ Macerozyme R-10 พบว่าสามารถแยกโพรโทพลาสต์แฟกทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้จำนวน 10.65×10^5 และ 13.47×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์ เท่ากับ 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำโพรโทพลาสต์แฟกสายพันธุ์กำแพงเพชร 2 (ภาพที่ 1ค) และประจวบคีรีขันธ์ (ภาพที่ 1ง) ที่ปรับความหนาแน่นแล้วมาชักนำให้เกิดการรวมกันด้วยสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 10, 20 และ 30% ร่วมกับเวลาการรวมโพรโทพลาสต์ 10, 20 และ 30 นาที พบว่าการใช้ PEG 6000 ทุกความเข้มข้น ร่วมกับเวลาการรวม มีผลต่อประสิทธิภาพการรวมโพรโทพลาสต์แฟก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม PEG (ตารางที่ 1) โดยการบ่มโพรโทพลาสต์แฟกทั้ง 2 สายพันธุ์ ใน PEG 6000 เข้มข้น 10% นาน 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์แฟกแบบ Binary fusion และความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์สูงสุด เท่ากับ 43.45 และ 89.63 ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ การบ่มโพรโทพลาสต์ใน PEG 6000 เข้มข้น 20% นาน 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์แฟกแบบ Binary fusion เท่ากับ 32.62 และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์ เท่ากับ 84.92 (ตารางที่ 1) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการรวมแบบ Binary fusion นั้นเป็นการรวมระหว่าง 2 โพรโทพลาสต์เท่านั้น ซึ่งเป็นรูปแบบที่ทำให้มีโอกาสเกิดโพรโทพลาสต์ลูกผสมได้ (ภาพที่ 1จ) ในขณะที่การบ่มโพรโทพลาสต์แฟกร่วมกันใน PEG 6000 เข้มข้น 30% นาน 10, 20 และ 30 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์แฟกแบบ Binary fusion และความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PEG 6000 เข้มข้น 10% นาน 30 นาที (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังพบการรวมโพรโทพลาสต์แฟกแบบ Multi fusion ซึ่งเป็นการรวมโพรโทพลาสต์ มากกว่า 2 โพรโทพลาสต์ขึ้นไป (ภาพที่ 1ฉ) แต่ไม่เป็นที่ต้องการในการสร้างโพรโทพลาสต์ลูกผสมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ โดยพบว่าการบ่มโพรโทพลาสต์แฟก

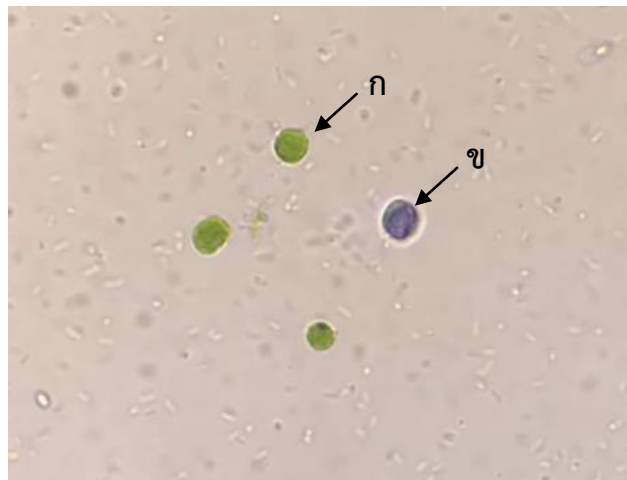
ใน PEG 6000 ทุกความเข้มข้น ทุกระยะเวลา เกิดการรวมโพรโทพลาสต์แฝกในรูปแบบ Multi fusion (ตารางที่ 1)

ทั้งนี้การรวมกันของโพรโทพลาสต์แฝกที่เกิดขึ้น ทั้งในรูปแบบ Binary fusion และ Multi fusion นั้น เป็นผลจากคุณสมบัติของ PEG ที่เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีขั้วทางไฟฟ้าเช่นเดียวกับฟอสโฟลิปิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์พืช ดังนั้นการเติม PEG ร่วมกับสารละลาย High Ca^{++} /High pH จึงส่งผลให้เกิดการลดความแตกต่างของประจุไฟฟ้า (Zeta potential) หรือผลรวมของประจุไฟฟ้าที่ผิวโพรโทพลาสต์ลงได้ ทำให้โพรโทพลาสต์เคลื่อนที่เข้ามาใกล้และอยู่ติดกัน โดยบริเวณที่เยื่อหุ้มเซลล์สัมผัสกันจะมีการสร้าง Interpolymer complex ระหว่างสายพอลิเมอร์ของ PEG กับสายโพลีแซคคาไรด์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่จับกับโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจน จนทำให้เกิดการรวมตัวกันของไซโตพลาสซึม ออร์แกเนลล์ต่าง ๆ และนิวเคลียสได้ (Kativat, 2017, p. 19; Tomar & Dantu, 2010, pp. 881-882; Badr-Elden *et al.*, 2010, p.56)

ในงานวิจัยนี้พบว่าการใช้ PEG 6000 ที่ความเข้มข้นต่ำ (10%) ร่วมกับเวลาการรวมโพรโทพลาสต์ที่นานขึ้น (30 นาที) ให้เปอร์เซ็นต์การรวมโพรโทพลาสต์แฝกแบบ Binary fusion และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์สูงที่สุด ในขณะที่การใช้ PEG 6000 ที่ความเข้มข้นสูง (30%) ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์ที่ลดลง ให้ผลในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Guan *et al.* (2010, pp. 279-284) ซึ่งได้ศึกษาการรวมโพรโทพลาสต์ซึ่ง ด้วย PEG 4000 และ 6000 ที่ความเข้มข้น 15 และ 30% เป็นเวลา 15 และ 30 นาที พบว่าการใช้ PEG 6000 มีประสิทธิภาพมากกว่า และเมื่อใช้ PEG 6000 ที่ความเข้มข้นต่ำ (15%) เป็นเวลานานขึ้น (30 นาที) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทพลาสต์ซึ่งลูกผสมที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PEG 6000 เข้มข้น 30% นาน 30 นาที



ภาพที่ 1 แฝกสายพันธุ์กุ่มกำแพงเพชร 2 (ก) และประจวบคีรีขันธ์ (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน โดยโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบแฝกสายพันธุ์กุ่มกำแพงเพชร 2 (ค) และประจวบคีรีขันธ์ (ง) ด้วยสารละลายเอนไซม์ ที่ประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 และ Macerozyme R-10 บ่มร่วมกันนาน 24 ชั่วโมง ถูกนำมาชักนำให้เกิดการรวมกันด้วย PEG 6000 เข้มข้น 10% เป็นเวลา 30 นาที สามารถชักนำให้เกิดการรวมโพรโทพลาสต์แฝกแบบ Binary fusion (จ) และ Multi fusion (ฉ) ได้; Bar = 50 ไมโครเมตร



ภาพที่ 2 ลักษณะของโปรโทพลาสต์แฟกที่มีชีวิต ซึ่งไม่ติดสีย้อม (ก) และโปรโทพลาสต์แฟกที่ไม่มีชีวิต ซึ่งจะติดสีน้ำเงินของสีย้อม (ข) เมื่อตรวจสอบด้วย Trypan blue 0.4% และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์; Bar = 50 ไมโครเมตร

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรวมโปรโทพลาสต์ในรูปแบบ Binary fusion และ Multi fusion และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโปรโทพลาสต์ ระหว่างแฟกสายพันธุ์กำแพงเพชร 2 และประจวบคีรีขันธ์ เมื่อบ่มร่วมกันในสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น และเวลาการรวมต่าง ๆ

ความเข้มข้น PEG 6000 (%)	เวลาการรวม (นาที)	เปอร์เซ็นต์การรวมโปรโทพลาสต์แฟก (%)		ความมีชีวิตหลัง การรวม โปรโทพลาสต์ (%)
		Binary fusion	Multi fusion	
0	10	4.17±4.16 ^c	3.03±3.03 ^c	94.10±3.02 ^a
	20	6.27±3.28 ^c	2.56±2.56 ^c	95.05±2.47 ^a
	30	7.20±3.73 ^c	3.03±3.03 ^c	94.66±2.67 ^a
10	10	22.54±5.62 ^b	23.10±4.63 ^{ab}	85.61±1.68 ^{bc}
	20	26.68±0.34 ^b	25.90±3.08 ^{ab}	83.57±2.71 ^{bcd}
	30	43.45±3.61 ^a	29.37±10.40 ^{ab}	89.63±0.37 ^{ab}
20	10	31.25±2.43 ^b	21.36±3.43 ^{ab}	85.56±3.90 ^{bc}
	20	23.28±3.00 ^b	18.33±1.73 ^{ab}	80.09±3.78 ^{cd}
	30	32.62±4.55 ^{ab}	25.61±6.35 ^{ab}	84.92±0.79 ^{bc}

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ความเข้มข้น PEG 6000 (%)	เวลาการรวม (นาท)	เปอร์เซ็นต์การรวมโพทิโพลัสต์แฟก (%)		ความมีชีวิตหลัง การรวม โพทิโพลัสต์ (%)
		Binary fusion	Multi fusion	
	10	25.20±6.50 ^b	16.87±3.03 ^{bc}	72.14±1.48 ^e
30	20	28.85±4.13 ^b	33.19±2.30 ^a	76.36±1.82 ^{de}
	30	26.59±2.38 ^b	22.30±5.06 ^{ab}	65.87±0.79 ^f
F-test		*	*	*
C.V. (%)		55.51	65.17	11.33

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง และเครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้ Parihar *et al.* (2015, pp. 62-72) ได้ทำการศึกษาการรวมโพทิโพลัสต์ถั่วมะแฮ (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) ระหว่างพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า โดยใช้ PEG 6000 เข้มข้น 28, 35 และ 40% เป็นเวลา 5-15 นาที พบว่าการใช้ PEG 6000 เข้มข้น 28% ให้เปอร์เซ็นต์การรวมโพทิโพลัสต์แบบ Binary fusion สูงที่สุด และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น (35 และ 40%) เนื่องจากการใช้ PEG ที่ความเข้มข้นสูง ๆ นั้น จะทำให้เกิดความหนืด ส่งผลให้การเคลื่อนที่มาชิดติดกันของโพทิโพลัสต์ลดลง และความเข้มข้นของ PEG ที่สูงเกินไปอาจมีความเป็นพิษต่อโพทิโพลัสต์ ทำให้โพทิโพลัสต์ใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวและปรับสภาพ และส่งผลต่อความมีชีวิตของโพทิโพลัสต์ได้ (Kao *et al.*, 1974, pp. 215-226; Kativat & Tantasawat, 2017, p. 1908) ดังนั้นการใช้ PEG ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด นอกจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการรวมโพทิโพลัสต์แล้ว ยังสามารถช่วยรักษาอัตราความมีชีวิตของโพทิโพลัสต์หลังการรวมได้ ซึ่งในแฟกพบว่า การใช้ PEG ความเข้มข้นต่ำ ร่วมกับเวลาการรวมที่นานขึ้น เป็นสภาวะที่เหมาะสม สามารถเพิ่มโอกาสให้โพทิโพลัสต์แฟกเกิดการรวมได้มากขึ้น ระยะเวลาในการรวมมีบทบาทที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการรวมโพทิโพลัสต์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มโพทิโพลัสต์ โดยเพิ่มโอกาสในการเกิดคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ในการยอมให้สารบางชนิดเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกเซลล์ได้ (Permeability) (Mansour, 2013, p. 5) จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนของไฮโดรพลาสซึม ออร์แกเนลล์ต่าง ๆ และสารพันธุกรรมระหว่างโพทิโพลัสต์ที่อยู่ติดกันได้ (Shalsh *et al.*, 2016, p. 15) อย่างไรก็ตามหากมีการใช้สารละลาย PEG ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ควรลดระยะเวลาในการรวมโพทิโพลัสต์ลง เพราะระยะเวลานานเกินไปส่งผลให้ความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ของโพทิโพลัสต์ที่รวมกันแล้ว ความมีชีวิต การแบ่งเซลล์ และการเกิดไมโครโคโลนีของโพทิโพลัสต์ลดลงได้ (Tudses *et al.*, 2015, p. 54)

งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของ PEG 6000 ร่วมกับเวลาการรวมที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดการรวมโพทิโพลัสต์แฟกแบบ Binary fusion ได้สูงสุด ซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสให้เกิดโพทิโพลัสต์แฟกผสมได้ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าโพทิโพลัสต์ที่เกิดการรวมนั้น เป็นการรวมของโพทิโพลัสต์แฟกสายพันธุ์เดียวกัน (Homokaryon) หรือเป็นการรวมระหว่างโพทิโพลัสต์แฟกต่างสายพันธุ์ (Heterokaryon) เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการเกิด Heterokaryon นั้นเป็นรูปแบบที่ต้องการสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนั้นสิ่งสำคัญที่ต้องศึกษาต่อไป

คือ วิธีการคัดเลือกโพรโทพลาสต์ลูกผสมที่แท้จริง ซึ่งมีหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การตรวจปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ หรือการใช้สีย้อมที่ไม่มีความเป็นพิษต่อโพรโทพลาสต์ เช่น สี Fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ สี Rhododamine isothiocyanate (RITC) มาย้อมก่อนการรวมโพรโทพลาสต์ เป็นต้น (Chakraborty, 2016, pp. 48-49) ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้ยังไม่สามารถคัดเลือกแฝกลูกผสมที่ต้องการได้ แต่ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดการรวมของโพรโทพลาสต์ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในแฝกลูกผสมให้ได้จำนวนสูงสุด จากนั้นนำลูกผสมที่ได้ไปเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และนำไปสู่การใช้ประโยชน์จากแฝกเพิ่มมากขึ้นได้

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการรวมโพรโทพลาสต์ระหว่างแฝกลูกผสมสายพันธุ์กำแพงเพชร 2 และแฝกดอน สายพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งพบว่าการใช้ PEG 6000 เข้มข้น 10% ร่วมกับระยะเวลาการชักนำ 30 นาที สามารถชักนำให้เกิดการรวมของโพรโทพลาสต์แฝกแบบ Binary fusion ได้ดีที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตหลังการรวมโพรโทพลาสต์สูงสุด จึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรวมโพรโทพลาสต์ เพื่อสร้างโพรโทพลาสต์แฝกลูกผสมให้ได้จำนวนสูงสุด จากนั้นนำลูกผสมที่ได้ไปเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (กปร.)

เอกสารอ้างอิง

- Badr-Elden, A. M., Nower, A. A., Nasr, M. I. & Ibrahim, A. I. (2010). Isolation and Fusion of Protoplasts in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Sugar Tech*, 12(1), 53-58.
- Chakraborty, S. (2016). Protoplast Culture and Somatic Hybridization, A Promising Frontier of Plant Biotechnology. *A Peer Reviewed Multidisciplinary Research Journal*, 2(1), 46-54.
- Guan, Q., Guo, Y., Wei, Y., Meng, F. & Zhang, Z. (2010). Regeneration of Somatic Hybrids of Ginger via Chemical Protoplast Fusion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102, 279-284.
- Gu, J. & Catchmark, J. M. (2013). The Impact of Cellulose Structure on Binding Interactions with Hemicellulose and Pectin. *Springer Science and Business Media*, 20, 1613-1617.
- Hayeehateng, A. & Kaewnok, B. (2014). *Campaign to Encourage of Vetiver Grass Cultivation for Soil and Water Conservation Under the Royal Initiative of His Majesty the King, Yala Province*. Phatthalung: Land Development Department. Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)
- Kao, K. N., Constabel, F., Michayluk, M. R. & Gamborg, O. L. (1974). Protoplast Fusion and Growth of Intergeneric Hybrid Cells. *Plant Biology*, 115, 215-227.
- Kativat, C. (2014). *Protoplast Culture and Development of Sunflower Maintainer Line via Protoplast Fusion*. Master's Thesis. Suranaree University of Technology. (in Thai)
- Kativat, C. & Tantasawat, P. A. (2017). PEG-mediated Symmetric and Asymmetric Protoplast Fusion in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 49(5), 1903-1910.
- Keegstra, K. (2013). Plant Cell Walls. *Plant Physiology Journal*, 154, 483-486.

- Mansour, M. M. F. (2013). Plasma Membrane Permeability as An Indicator of Salt Tolerance in Plants. *Biologia Plantarum*, 57(1), 1-10.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology Journal*, 15, 473-497.
- Parihar, A., Pachchigar, K. & Zaman, M. S. (2015). Protoplast Isolation and Fusion in Cultivated *Cajanus cajan* (L.) Millsp. and Wild Species of Pigeonpea. *Research Journal of Biotechnology*, 10(3), 62-72.
- Shalsh, F. J., Ibrahim, N. A., Arifullah, M. & Hussin, A. S. M. (2016). Optimization of the Protoplast Fusion Conditions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* for Improvement of Bioethanol Production from Biomass. *Asian Journal of Biological Sciences*, 9(1-2), 10-18.
- Sivaarthikul, K. (2015). *Sustainable Management of Vetiver Utilization*. Bangkok: Land Development Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)
- Tomar, U.K. & Dantu, P.K. (2010). Protoplast Culture and Somatic Hybridization. In Tripathi, G. Cellular and Biochemical Sciences. I.K. *International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi*, 876-891.
- Tudses, N., Premjet, S. & Premjet, D. (2014). Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations of *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 14(3), 221-230
- Tudses, N., Premjet, S. & Premjet, D. (2015). Establishment of Method for Protoplast Fusion with PEG-Mediated between *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 4(1), 50-56.
- Wulandari, D. R., Purwito, A., Susanto, S., Husni, A. & Ermayanti, T. M. (2018). Protoplast Fusion between Indonesian *Citrus maxima* (Burm.) Merr. and *Citrus reticulata* L.: A Preliminary Report. *Agrivita Journal of Agricultural Science*, 40(2), 233-241.