รายงานผลงานวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การแยกโปรโตพลาสท์ของมันฝรั่งเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างแคลไล

PROTOPLAST ISOLATION OF POTATO TO STUDY CALLI REGENERATION

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2536

จำนวน 222,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางนลินี รุ่งเรืองศรี

ผู้ร่วมโครงการ นายอุทัย รุ่งเรืองศรี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

วันที่ 16 ตุลาคม 2541

S 1996/49

คำนิยม

(Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2536 การดำเนินงานวิจัยเป็นไปด้วยความล่าช้า เนื่องจากปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมในห้องทดลองแต่ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. อานนท์ เที่ยงตรง ที่ได้อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ในช่วงหลังของการดำเนินงานวิจัยจนได้ข้อมูลมาเสนอเป็นรายงานฉบับนี้ คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณยิ่ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	1
Abstract	1
คำนำ	2
อุปกรณ์และวิธีการ	3
ผลการวิจัย	14
วิจารณ์ผล	22
เอกสารอ้างอิง	24

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักหอสมุด

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	สูตรอาหาร modified Murashige and Skoog สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่ง	5
ตารางที่ 2	สูตรเตรียม Shepard's float solution	8
ตารางที่ 3	สูตรเตรียม Shepard's soak solution	8
ตารางที่ 4	สูตรเตรียม stock solution	9
ตารางที่ 5	สูตรเตรียม enzyme solution	10
ตารางที่ 6	สูตรเตรียม Shepard's rinse solution	11
ตารางที่ 7	สูตรเตรียม Shepard's holding solution	11
ตารางที่ 8	สูตรเตรียมอาหาร cell layer (CL)	12
ตารางที่ 9	ผลผลิตโปรโตพลาสท์ที่แยกได้จาก mesophyll ของมันฝรั่ง ซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro*	15
ตารางที่ 10	Analysis of Variance ของจำนวนโปรโตพลาสท์ (x ล้าน) ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัม จากมันฝรั่ง 7 พันธุ์ที่ได้เพาะเลี้ยงในสภาพ *in vitro*	18

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โปรโตพลาสท์มันฝรั่งที่แยกได้ ภาพจากกล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย 10 x 10	18
ภาพที่ 2	โปรโตพลาสท์มันฝรั่ง ภาพจากกล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย 10 x 40	19
ภาพที่ 3-4	โปรโตพลาสท์มันฝรั่งเริ่มแบ่งตัว หลังจากที่เลี้ยงใน CL medium 1-2 วัน	20
ภาพที่ 5, 6, 7	โปรโตพลาสท์มันฝรั่งมีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์ หลังจากที่เพาะเลี้ยงใน CL mediumประมาณ 1 สัปดาห์	20
ภาพที่ 8	Microcalli ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์มันฝรั่งซึ่งแยกจาก mesophyll ของต้นที่เจริญในสภาพ in vitro ภาพจากกล้อง steroscope กำลังขยายต่ำ	21
ภาพที่ 9-10	Microcalli จากโปรโตพลาสท์มันฝรั่ง อายุประมาณ 4 สัปดาห์ เลี้ยงในอาหารสูตร cell layer ภาพจากกล้อง stereoscope กำลังขยายสูง	21

การแยกโปรโตพลาสท์ของมันฝรั่งเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างแคลไล

PROTOPLAST ISOLATION OF POTATO TO STUDY CALLI REGENERATION

นลินี รุ่งเรืองศรี
ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

อุทัย รุ่งเรืองศรี
ภาควิชาอารักขาพืช
คณะผลิตกรรมการเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์พืชจนเป็นแคลไลแล้วชักนำให้เจริญเป็นต้นพืชนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่อาจจะเป็นประโยชน์แก่งานปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค งานวิจัยนี้เป็นงานทดลองแยกโปรโตพลาสท์จาก mesophyll ของมันฝรั่ง 7 พันธุ์ โดยใช้ส่วนใบจากต้นที่ได้เลี้ยงในสภาพ *in vitro* แล้ว 1 เดือน แล้วจึงสังเกตความสามารถในการสร้าง microcalli ซึ่งเป็นสภาพแรกก่อนที่จะ regenerate เป็นต้นพืช ผลการศึกษาแสดงว่าใบของมันฝรั่งทั้ง 7 พันธุ์ แยกเป็นโปรโตพลาสท์ได้ในปริมาณเพียงพอแก่การนำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็น microcalli ปัญหาใหญ่ในงานวิจัยด้านโปรโตพลาสท์คือการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และการรักษาปัจจัยในสภาพแวดล้อมให้คงที่

Abstract

Protoplast cultures for plant regeneration is a novel method for crop improvement, especially for disease resistance. Protoplasts were isolated from leaf mesophylls of severn potato cultivars which had been grown under *in vitro* conditions. Protoplast cultures were initiated to determine the ability to form microcalli of all seven

cultivars. Results showed that protoplast yields were all satisfactory and could be used for microcalli generation under another medium. This initial experience indicates that the *in vitro* working environment must be strictly regulated to prevent contamination if more extensive research on protoplasts is desired.

คำนำ
(Introduction)

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญและมีการปลูกอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากมันฝรั่งมีความอ่อนแอต่อโรคหลายอย่าง ผลผลิตแต่ละปีมักจะถูกทำลายด้วยโรคต่างๆ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมพันธุ์ยิ่งใช้เวลานานและไม่นำไปสู่ความต้านทานโรคที่สำคัญได้เสมอไป นอกจากนี้ยังเป็นการยากที่จะหาลักษณะต้านทานโรคที่แท้จริงมาผสมกับพันธุ์ปลูกซึ่งมีลักษณะพึงประสงค์อื่นๆ การขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์เป็นวิธีการที่ให้โปรโตพลาสท์เดี่ยวแบ่งตัวเป็นแคลไล (calli) ซึ่งจะสามารถเจริญเป็นต้นพืช ในวิธีการนี้อาจจะพบต้นพืชที่ได้กลายพันธุ์ (soma clonal variation) และเกิดลักษณะต้านทานโรคได้

โรคใบไหม้ (late blight) นำโดยเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary มีส่วนสำคัญในการลดปริมาณผลผลิตของมันฝรั่ง เชื้อราตัวนี้ก่อโรคโดยเข้าทำลายส่วนใบและหัวของพืช การศึกษาความต้านทานโรคใบไหม้ในมันฝรั่งโดยใช้โปรโตพลาสท์นั้นได้มีผู้ริเริ่มนานแล้ว (Behneke, 1979, 1980; Shepard, et al, 1980, 1981; Tomiyama, et al, 1974)

ข้อมูลจากงานทดลองด้านปรับปรุงพันธุ์ในแปลงได้ระบุว่ามีความต้านทานโรคใบไหม้นี้ 2 ชนิด ได้แก่ ความต้านทานอย่างจำเพาะซึ่งนำโดย major genes (R genes)ชุดหนึ่งและก่อให้เกิดปฏิกิริยาในพืชที่เรียกว่า hypersensitivity กับอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า general หรือ field resistance ซึ่งควบคุมโดย minor genes (Toxopeus, 1964) ความต้านทานซึ่งนำโดย major genes นั้นจะเป็นรองต่อเชื้อรา *P. infestans* เพราะจะเกิด races ใหม่ ๆ ขึ้น(Gallegly, 1968) แต่ความต้านทานอีกชนิดหนึ่งซึ่งอาจจัดว่าเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative character) นั้นมีผลเพียงลดระดับการเข้าทำลายพืชและคุ้มกันพืชจากเชื้อราทุก race (ความรุนแรงของโรคลด

น้อยลง) เนื่องจากผลจากการศึกษาในแปลงได้ให้ข้อมูลที่เกี่ยวกับลักษณะต้านทานโรคใบไหม้ว่ามีการแสดงออก (expression)ที่แตกต่างกันเป็นสองชนิด การศึกษาในระดับเซลล์หรือโปรโตพลาสท์ของมันฝรั่งอาจจะทำให้เกิดความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับกลไกต้านทานโรคของเซลล์เจ้าบ้าน

การศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกโปรโตพลาสท์จากmesophyll ของมันฝรั่งพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาความสามารถในการสร้างแคลไลของพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งความสามารถในการสร้างแคลไลนี้เป็นขั้นตอนแรกในregenerationเป็นต้นพืช หากวิธีการในการศึกษาครั้งนี้ได้ผลดีก็จะสามารถนำโปรโตพลาสท์หรือแคลไลไปชักนำให้เกิดความต้านทานโรคและอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการใหม่ ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ
(Materials and Methods)

1. **พันธุ์มันฝรั่ง**

มันฝรั่งที่ทำการเพาะเลี้ยงมีพันธุกรรมต่างกันซึ่งบางพันธุ์ได้รับการจำแนกตามยีนควบคุมความต้านทานโรคใบไหม้จากเชื้อรา *Phytophthora infestans* ดังนี้

ชื่อพันธุ์	ยีนต้านทานโรคใบไหม้
B6086 WV 21	$R_1R_2R_3$
Kennebec	R_1
Russet Burbank	r (ไม่ต้านทาน)
Bintje	r (ไม่ต้านทาน)
Pentland Ace	ไม่ทราบ
Norkotah	ไม่ทราบ
Banana	ไม่ทราบ

2. การเพาะเลี้ยงมันฝรั่ง

การเตรียมวัสดุพืชเพื่อการแยกโปรโตพลาสท์จำเป็นต้องมีสภาพปลอดเชื้อ เริ่มจากตัดเฉือนหน่อที่แตกจากหัวพันธุ์ แล้วตัดเป็นชิ้นยาว 1-2 ซม. นำไปล้างน้ำให้สะอาด 20 นาที ตามด้วยการเขย่าในสารละลาย 0.5 % sodium hypochlorite + Tween 20 เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วจุ่มใน 0.5 % sodium hypochlorite 3 นาที แช่ล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำแต่ละ shoot tip ไปเลี้ยงในอาหาร modified MS 15 มล.ในหลอดแก้ว ขนาด 25x150 มม. หลังจากนั้นทำการ subculture ทุกเดือนหรือทุก 6 สัปดาห์ตามความจำเป็นและความพร้อม

ในการขยายพันธุ์ต้นมันฝรั่งในสภาพ *in vitro* ใช้ส่วนยอดหรือตาตามข้อลำต้น ตัดยาวประมาณ 1-2 ซม.เลี้ยงในขวดบ่ากกว้างเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 ซม. สูง 15.5 ซม. ซึ่งมีอาหารเลี้ยง mMS บรรจุอยู่ราว 80 มล. และปิดด้วยจานล่างของ petri dish ขนาดมาตรฐานโดยมีแผ่นพลาสติกใสพันรอบอีกที เมื่อเพาะเลี้ยงมันฝรั่งแต่ละพันธุ์ได้ดีแล้วจึงเก็บส่วนใบเพื่อการแยกโปรโตพลาสท์ หากมีการเจริญปนของเชื้อราจะต้องฆ่าเชื้อและย้ายปลูกในขวดใหม่จนได้พืชที่ปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงมันฝรั่งแบบ *in vitro* ต้องควบคุมสภาพแวดล้อม พืชได้แสงจากหลอดไฟชนิด cool white fluorescent 40 วัตต์ และหลอดไฟชนิด Grolux 40 วัตต์ หลอดไฟทั้งสองชนิดติดอยู่ที่ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยง โดยมีระยะห่างจากขวดเลี้ยงประมาณ 10 ซม. ภายในห้องเพาะเลี้ยงมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 25° ซ

ตารางที่ 1 สูตรอาหาร modified Murashige and Skoog สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่ง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มก./ลิตร)
Ammonium nitrate	1,650.0
Boric Acid	6.2
Calcium chloride .$2H_2O$	880.0
Casein hydrolysate	10.0
Cobalt chloride .$6H_2O$	0.025
Cupric sulfate .$5H_2O$	0.025
Ethylenediaminetetraacetic acid .Na_2	37.3
Ferrous suifate 7.H_2O	27.8
Gibberellic acid (GA_3)	0.25
Glycine	2.0
Magnesium sulfate .$7H_2O$	370.0
Manganese sulfate H_20	16.9
Molybdic acid sodium salt .$2H_20$	0.25
Myo-Inositol	100.0
Nicotinic acid	100.0
Panthothenate calcium	2.0
Potassium iodide	0.83
Potassium nitrate	1,900.0
Potassium phosphate monobasic	340.0
Pyridoxine .HCl	0.5
Sucrose	30,000.0
Thiamine .HCl	180.0
Zinc sulfate .$7H_2O$	8.6
Agar	7,500.0
pH 5.8 ปรับด้วย KOH หรือ HCl ใส่ 80 มล.ของส่วนผสมข้างบนในขวดเพาะเลี้ยง ปิดด้วยฝา petri dish แล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อ	

3. การแยกโปรโตพลาสท์มันฝรั่ง

วิธีการแยกโปรโตพลาสท์ที่ใช้นั้นได้ดัดแปลงจาก Shepard และ Totten (1977), Shepard (1981) และ Haberlach et al (1975)

เมื่อต้นมันฝรั่งมีอายุราว 4 สัปดาห์เก็บส่วนใบเพื่อนำไปแยกเป็นโปรโตพลาสท์ ใช้มีดตัดใบที่สมบูรณ์ ชั่งน้ำหนักใบที่ได้จากแต่ละขวดเพาะเลี้ยง แล้วใส่ลงใน Shepard's float solution (สำหรับpreconditioning)ปริมาณ 100 มล.ในขวดชมพู่ที่มีฝาปิดเป็นเกลียวขนาด 250 มล. ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 2 วันในที่มืด 25°ซ หลังจากนั้นย้ายใบมันฝรั่งลงใน soak solution ทิ้งไว้นาน 1 วันที่ 4°ซ.(soak solution มีส่วนประกอบเป็น mineral saltsที่ความเข้มข้นเป็น □ เท่าของในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ)โดยใช้ flask ขนาด 250 มล.ที่มี evacuation sidearm หลังจากที่แช่ในความเย็นแล้ว ("cold soak")แล้ว รินสารละลายทิ้งแล้วเติม enzyme solution ซึ่งเป็นส่วนผสมของเอ็นไซม์ 2 ชนิด คือ cellulase กับ pectinase ซึ่งมีsucrose เป็น osmoticum สารละลายเอ็นไซม์นี้ใช้เติมในอัตรา 25 มล.ต่อกรัมน้ำหนักใบสด ขั้นตอนนี้เป็นการนำเอ็นไซม์เข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีสุญญากาศจากปั๊มภายนอก (infiltration by suction)เป็นเวลานานหลายนาที จนกระทั่งใบมันฝรั่งเปลี่ยนเป็นสีเขียวแก่อย่างทั่วถึง แล้วจึงปล่อยให้เกิด enzyme digestion ข้ามคืนบนถาดหมุนที่ความเร็ว 45 ร.ต.น.ที่ 25°ซ จากนั้นกรองน้ำเนื้อเยื่อใบลงในขวด babcock ภายใต้สภาพปลอดเชื้อและใช้ membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน เติม Shepard's rinse solution จนถึงคอขวด babcock ที่ขีด 7.5 ปิดขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วจึง centrifuge ที่ความเร็ว 500 ร.ต.น. นาน 10 นาที โปรโตพลาสท์จาก mesophyll จะลอยตัวขึ้นสู่ด้านบนของขวด babcock ปรากฏเป็นชั้นโปรโตพลาสท์อยู่ที่คอขวด ใช้ pasteur pipet ปลอดเชื้อยาว 9 นิ้วดูดเอาโปรโตพลาสท์ใส่ขวด babcock ใหม่ เติม rinse solution จนถึงคอขวดแล้วจึง centrifuge เหมือนครั้งก่อน เมื่อเสร็จขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสท์แล้ววัดปริมาตรของชั้นโปรโตพลาสท์ นับจำนวนโปรโตพลาสท์โดยใช้ hemacytometer แล้วบันทึกผลเป็นจำนวนโปรโตพลาสท์ที่แยกได้ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม

เพาะเลี้ยงมันฝรั่งในสูตรอาหาร modified Murashige and Skoog

↓

เก็บใบใส่ในShepard's float solution ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน 25°ซ

↓

ย้ายใบไปใส่ใน soak solution ในที่มืด เป็นเวลา 1 วัน 4°ซ

↓

ใส่ในสารละลายเอ็นไซม์ ใช้แรงดูดสูญญากาศจากปั๊มภายนอก

↓

ย่อยเซลล์พีซ 16 ชม. บนถาดหมุน ความเร็ว 45 รอบต่อนาที

↓

กรองเนื้อเยื่อใบในสภาพ sterile เก็บส่วนที่กรองได้ในขวด babcock
เติม rinse solution จนถึงขีดที่คอขวด

↓

Centrifuge ขวด babcock ความเร็ว 500 รอบต่อนาที 10 นาที

↓

ดูดโปรโตพลาสท์ใส่ขวด babcock ใหม่ เติม rinse solution
แล้ว centrifuge เหมือนเดิมอีก 1 ครั้ง

↓

เก็บโปรโตพลาสท์ด้วย pasteur pipet จากขวด babcock
สังเกตปริมาณที่ได้ หาจำนวนโปรโตพลาสท์โดยใช้ hemacytometer

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกโปรโตพลาสท์จาก mesophyll ของใบมันฝรั่ง

ตารางที่ 2 สูตรเตรียม Shepard's float solution

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มก./ลิตร)
NH_4NO_3 (1 mM)	80.0
$CaCi_2.2H_2O$ (1 mM)	147.0
Naphthalene acetic acid	2.0
Benzylaminopurine	1.0
เวลาเตรียมใช้ 80 มล.ใส่ลงใน screw-capped flask ขนาด 250 มล. นึ่งอบฆ่าเชื้อ 20 นาที	

ตารางที่ 3 สูตรเตรียม Shepard's soak solution

ส่วนประกอบ	ปริมาณ ต่อลิตร
Major salt stock	23.8 มล.
Organics stock	1.2 มล.
BAP stock	0.5 มล.
NAA stock	1.0 มล
pH 5.6 ปรับด้วย KOH หรือ HCl	
เวลาเตรียม นำ 80 มล.ใส่ใน evacuation flask ขนาด 250 มล. ปิดปาก flask ด้วยจุกยาง สวมท่อยาว 7 ซม.บน sidearm ของ flask (ต้องเป็นชนิดที่ทนความร้อนได้) ใช้สำลีอุดท่อดังกล่าวแล้วจึงนึ่งอบฆ่าเชื้อได้	

ตารางที่ 4 สูตรเตรียม stock solution

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
1. Major Salts Stock	
KNO_3	19.0
$CaCl_2 .2H_20$	4.4
$MgSO_4 . 7H_2O$	3.7
KH_2PO_4	1.7
2. Fe-EDTA Stock	
Na_2EDTA	0.373
$FeSO_4 .7H_2O$	0.278
3. Minor Element Stock I	
H_3BO_4	0.62
$MnCl_2 .4H_2O$	0.025
$CuSO_4 .7H_2O$	0.0025
$CoSO_4 .7H_2O$	0.003
4. Minor Element Stock II	
KI	0.083
$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.025
$CuSO_4 .5H_2O$	0.0025
$CuSO_4 .7H_2O$	0.003
5. Organics	
myo-Inositol	20.0
Thiamine .HCl	0.1
Glycine	0.4
Nicotinic acid	1.0

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
Pyridoxine .HCl	0.1
Folic acid	0.1
Biotin	0.01
หลังจากเตรียมสารละลายแล้ว เก็บ Minor Element Stock II ไว้ในที่มืด เก็บ Organics ไว้ในที่มืดโดยแบ่งแช่แข็งในปริมาณน้อย ๆ เก็บสารละลายอื่น ๆ ไว้ที่ 4°ซ	

ตารางที่ 5 สูตรเตรียม enzyme solution

ส่วนประกอบ	ปริมาณ ต่อ 100 มล.
Celiulysin, cellulase (Calbiochem) Macerase,	0.5 กรัม
pectinase (Calbiochem)	0.1 กรัม
Polyvinylpyrolidone Mol. Wt 10,000 (PVP-10)	1.0 กรัม
Major salts stock	2.5 มล.
2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (0.5 M)	1.0 มล.
Casein hydrolysate	1.0 มล.
Sucrose	10.3 กรัม
pH 5.6 ปรับด้วย KOH หรือ HCl เมื่อเตรียมแล้วกรองให้ปลอดเชื้อด้วย sterile filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.22 ไมครอน	

ตารางที่ 6 สูตรเตรียม Shepard's rinse solution

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Major salt stock	20.0 มล.
Casein hydrolysate	2.0 มก.
Sucrose	20.5 กรัม
เตรียมปริมาณ 200 มล. ปรับ pH 5.6 ด้วย KOH หรือ HCL กรองให้ปลอดเชื้อด้วย sterile filter membrane ขนาดรู 0.22 ไมครอน	

4. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์

เริ่มด้วยการเจือจางโปรโตพลาสท์ที่แยกได้แล้วโดยใช้ Shepard's holding solution ถึงความหนาแน่น 1 ล้านเซลล์ ต่อ 1 มล. ทิ้งโปรโตพลาสท์ไว้ใน holding solution 1 ชม. เพื่อให้มีการปรับตัวเข้ากับสูตรอาหารใหม่ซึ่งมีเกลือเข้มข้น ต่อจากนั้นจึงใส่โปรโตพลาสท์ลงใน petri dish ที่มีอาหารสูตร CL (cell layer) 15 มล. โดยให้มีจำนวนโปรโตพลาสท์ในอัตรา 2.0 x 10^4 /มล. เก็บรักษาจานเพาะเลี้ยงไว้ในสภาพแวดล้อมเดียวกับการเพาะเลี้ยงต้นมันฝรั่ง คอยสังเกตการเกิด microcalli ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและกล้อง stereoscope ภายหลังการเริ่มเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

ตารางที่ 7 สูตรเตรียม Shepard's holding solution

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
½ ความเข้มข้น major salts ในสูตรอาหาร CL Fe, EDTA, และ minor elements ในสูตรอาหาร CL	
Casein hydrolysate	1.0 กรัม
Sucrose	0.5 M
Xylitol, D-mannitol, myo-inositol, และ sorbitol	0.025 M
ปรับ pH 5.6 แล้วกรองให้ปลอดเชื้อ	

ตารางที่ 8 สูตรเตรียมอาหาร cell layer (CL)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ มิลลิกรัม/ลิตร
Major Salts	
KNO_3	7,600
$CaCl_2$ .H_2O	1,700
$MgSO_4$.$7H_2O$	1,400
KH_2PO_4	680
Iron และ Minor Salts	
Na_2 .EDTA	18.5
$FeSO_4$.$7H_2O$	13.9
H_3BO_3	3.1
$MnCl_2$.$4H_2O$	9.9
$ZnSO_4$.$7H_2O$	4.6
KI	0.42
Na_2MoO4 .$2H_2O$	0.13
$CuSO_4$.$5H_2O$	0.013
$COSO_4$.$7H_2O$	0.015
Organics	
Thiamine hydrochloride	0.5
Glycine	2.0
Nicotinic acid	5.0
Pyridoxine hydrochloride	0.5
Folic acid	0.5
Biotin	0.05
Casein hydrolysate	50.0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ มิลลิกรัม/ลิตร
Plant Hormones	
1-Naphthalene acetic acid	1.0
6-Benzylaminopurine	0.4
Osmoticum	
Sucrose	0.200 M
Myo-Inositol	0.025 M
D-Mannitol	0.025 M
Sorbitol	0.025 M
Xylitol	0.025 M
Agarose 0.45 % (Sigma Type VII)	
PH 5.6	
เวลาเตรียมนำสารละลายที่มีส่วนประกอบต่างๆกรองให้ปลอดเชื้อก่อน แล้วจึงผสมรวมกับ agarose ที่หลอมไว้แล้ว	

ผลการวิจัย
(Results)

1. การเพาะเลี้ยงในสภาพ *in vitro* และคุณภาพของใบมันฝรั่งที่ใช้

การเพาะเลี้ยงมันฝรั่งในอาหาร modified Murashige and Skoog (mMS) ภายใต้สภาพ *in vitro* ซึ่งมีการควบคุมแสงและอุณหภูมิให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เมื่อมีปัญหาบ่นเปื่อนในบางครั้งก็แก้ไขได้ แต่ทำให้เสียเวลาเนื่องจากไม่สามารถทำการแยกโปรโตพลาสท์ได้พร้อมกันทุกพันธุ์ เมื่อต้นมันฝรั่งมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ก็ทะยอยเก็บใบเพื่อแยกโปรโตพลาสท์

ใบของมันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro* มีขนาดใบเล็กกว่าที่ปลูกในแปลงมาก ใบของมันฝรั่งทั้ง 7 พันธุ์ใช้แยกโปรโตพลาสท์ได้ดีเหมือนกัน เมื่อผ่านวิธีการแยกโปรโตพลาสท์ไม่พบว่าเกิดสีน้ำตาล (browning) ในขวดทดลอง ซึ่งคงเป็นข้อแตกต่างจากมันฝรั่งที่ปลูกในแปลงหรือเรือนกระจก

2. การแยกโปรโตพลาสท์

การทดลองครั้งนี้สามารถแยกโปรโตพลาสท์จาก mesophyll ของมันฝรั่งได้ทั้งหมดรวม 7 พันธุ์ โดยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Shepard และ Totten (1977), Shepard (1981) และ Haberlach et al (1975) และเนื้อเยื่อใบที่ใช้นั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงต้นมันฝรั่งแบบ *in vitro* ที่มีอายุประมาณ 1 เดือน ตารางต่อไปนี้แสดงผลที่ได้จากใบมันฝรั่งสดที่มีน้ำหนักตั้งแต่ประมาณ 0.3 – 1.0 กรัม

ตารางที่ 9 ผลผลิตโปรโตพลาสท์ที่แยกได้จาก mesophyll ของมันฝรั่งซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro*

พันธุ์มันฝรั่ง	น้ำหนักใบสด (กรัม)	จำนวนโปรโตพลาสท์ที่ได้ (x ล้าน)	จำนวนโปรโตพลาสท์ (x ล้าน) ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม
Kennebec	0.450	1.728	3.840
	0.650	4.704	6.579
	0.591	2.100	3.553
	0.709	4.425	6.241
	0.881	1.900	2.157
	0.958	5.850	6.106
	0.600	10.400	17.333
	0.900	12.000	13.333
	0.755	4.725	6.258
	0 500	2.850	5.700
	0.570	1.047	1.837
	0.517	1.256	2.429
	0.383	5.375	14.034
			ค่าเฉลี่ย 6.108
B6080 WV21	0.858	10.800	12.587
	0.658	3.075	4.673
	0.581	5.025	6.368
	0.427	3.700	11.768
	0.366	4.600	12.568
	0.840	9.900	11.786
	0.905	6.750	7.459
	0.612	4.977	8.132
	0.648	3.441	5.310
	0.467	1.415	3.030

ตารางที่ 9 (ต่อ)

พันธุ์มันฝรั่ง	น้ำหนักใบสด (กรัม)	จำนวนโปรโตพลาสท์ที่ได้ (x ล้าน)	จำนวนโปรโตพลาสท์ (x ล้าน) ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม
	0.317	1.145	3.612
	0.848	0.954	1.125
	0.980	2.250	2.300
			ค่าเฉลี่ย 6.978
Pentland Ace	0.599	6.120	10.217
	0.535	2.650	4.953
	0.686	2.350	3.426
	0.631	3.690	5.849
	0.610	4.275	7.008
	0.873	5.500	6.300
	0.490	4.336	8.849
	0.437	0.640	1.465
	0.359	1.388	3.866
	0.401	1.382	3.446
	0.440	1.890	4.296
	0.900	2.400	2.661
			ค่าเฉลี่ย 5.195
Banana	0.645	10.125	15.698
	0.357	3.300	9.244
	0.600	3.000	5.000
	0.749	5.200	6.943
			ค่าเฉลี่ย 9.221

ตารางที่ 9 (ต่อ)

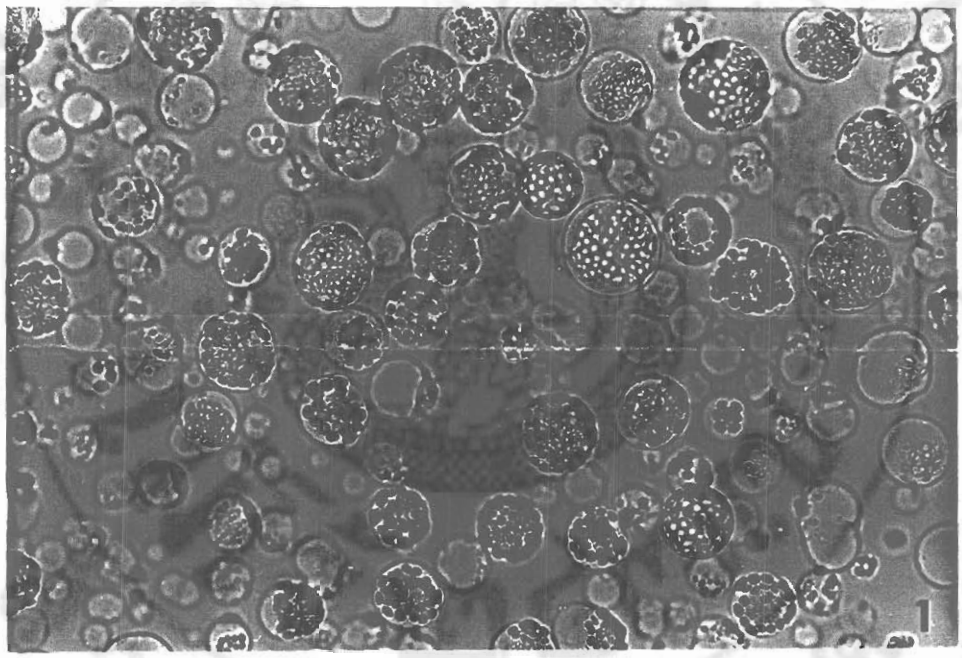
พันธุ์มันฝรั่ง	น้ำหนักใบสด (กรัม)	จำนวนโปรโตพลาสท์ที่ได้ (x ล้าน)	จำนวนโปรโตพลาสท์ (x ล้าน) ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม
Bintje	0.627	6.000	9.569
	0.768	3.750	4.883
	0.900	9.000	10.000
	0.500	4.500	9.000
	0.580	12.125	20.905
	0.600	3.086	5.143
			ค่าเฉลี่ย 9.917
Russet Burbank	0.740	3.675	4.966
	0.300	1.237	4.137
	0.320	1.456	4.550
	0.330	0.990	3.000
			ค่าเฉลี่ย 4.163
Norkotah	0.295	1.976	6.698
	0.540	1.450	2.685
	0.480	1.760	3.672
			ค่าเฉลี่ย 4.352

การวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนโปรโตพลาสท์ (x ล้าน) ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัมทางสถิติได้ทำ analysis of variance โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) ผลการวิเคราะห์ไม่แสดงความแตกต่างในปริมาณโปรโตพลาสท์ที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์

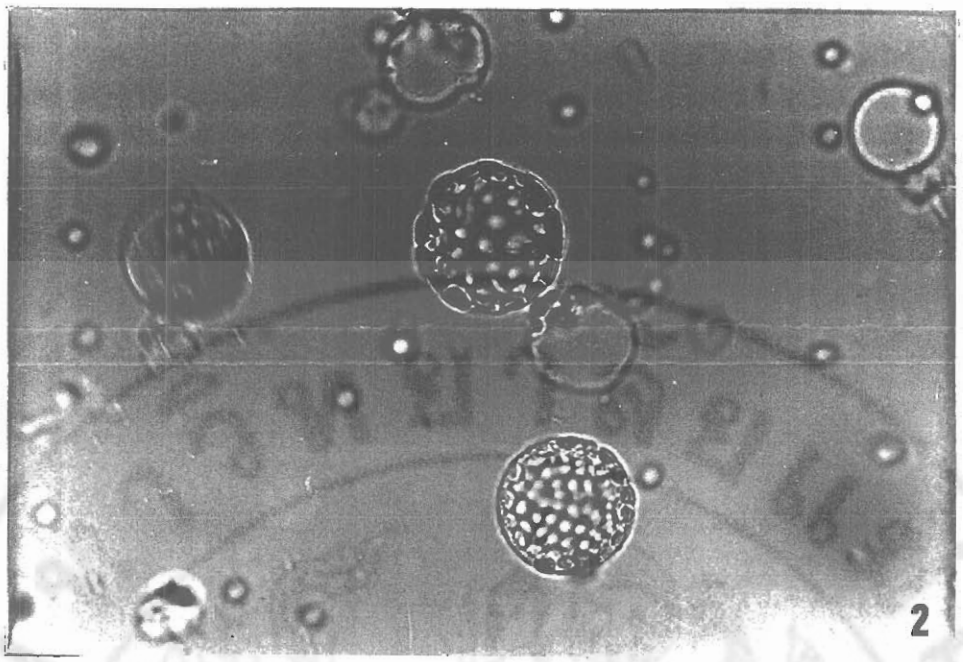
ตารางที่ 10 Analysis of Variance ของจำนวนโปรโตพลาสท์ (x ล้าน) ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัม จากมันฝรั่ง 7 พันธุ์ที่ได้เพาะเลี้ยงในสภาพ *in vitro*

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Pr>F
Model	6	160.7426007	26.7904334	1.69	0.1446
Error	48	762.1501262	15.8781276		
Corrected Total	54	922.8927268			

R-square	c.v.	Root MSE	Protoplast Mean
0.174173	61.12633	3.984737	6.51885455



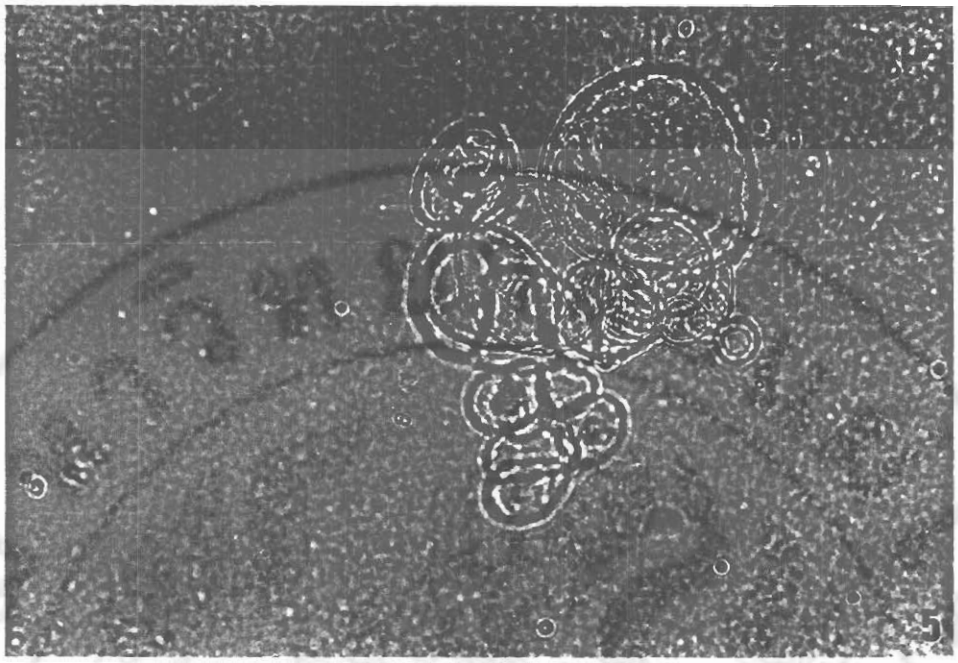
ภาพที่ 1 โปรโตพลาสท์มันฝรั่งที่แยกได้ ภาพจากกล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย 10 x 10

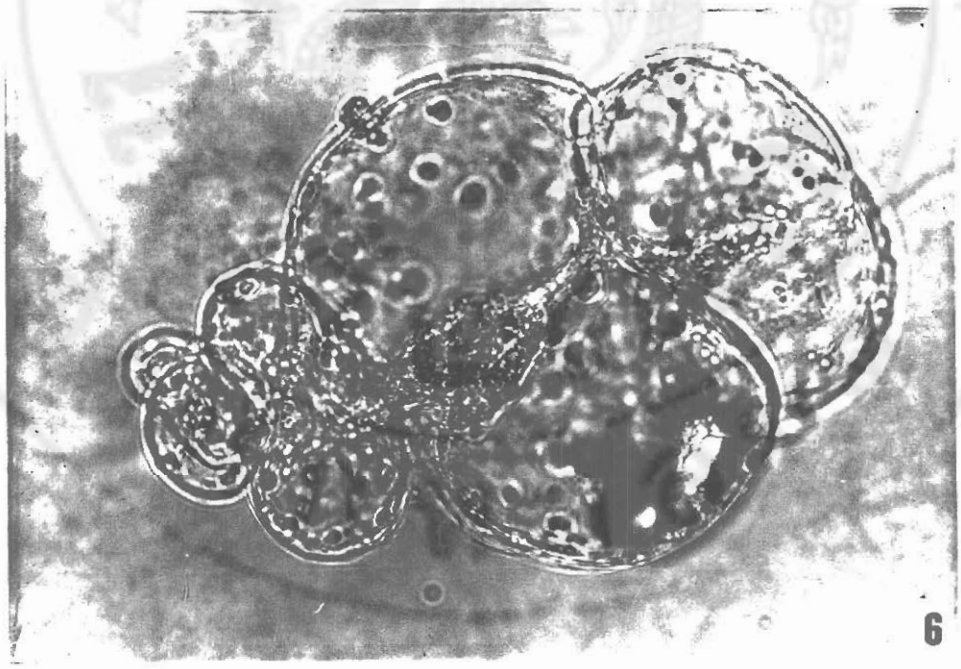


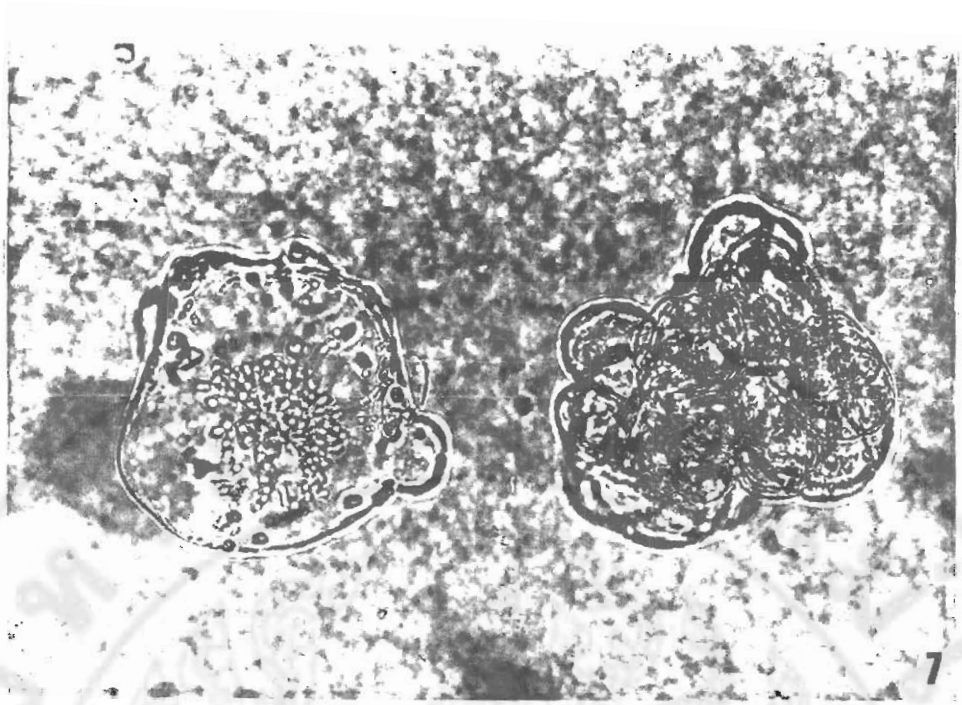
ภาพที่ 2 โปรโตพลาสท์มันฝรั่ง ภาพจากกล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย 10 x 40

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์มันฝรั่งให้เป็น microcalli

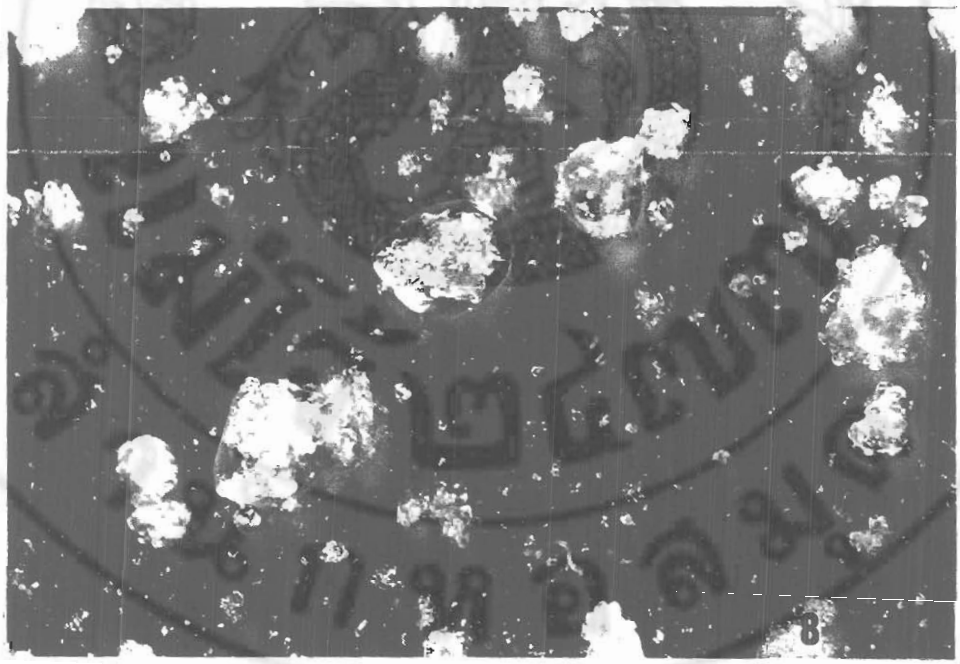
เมื่อนำ protoplast suspension มาเลี้ยงต่อใน petri dish โดยใช้อาหารสูตร CL ซึ่งมีวุ้น (agar) เป็นส่วนประกอบ พบว่ามีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์มาก จึงเป็นเหตุให้งานล่าช้า เพราะต้องเริ่มเพาะเลี้ยงต้นมันฝรั่งใหม่ เพื่อเอาไปแยกโปรโตพลาสท์ ปัญหาการปนเปื้อนดังกล่าวสืบเนื่องมาจากปัจจัยในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การควบคุมอุณหภูมิและการรักษาสภาพปลอดเชื้อในบริเวณทดลองไม่ดีพอสำหรับการเลี้ยงดูโปรโตพลาสท์เป็นเวลานานจนถึงการเกิด microcalli ขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก ได้แก่ การกรอง (filter) แยกเอาโปรโตพลาสท์ออกจากชิ้นส่วนพืชที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ ซึ่งจำเป็นต้องทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ ภายหลังได้ขอเปลี่ยนสถานที่ทำการทดลองเพื่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์ มีการควบคุมแสง อุณหภูมิ และความสะอาดของห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี ผลการทดลองพบว่าโปรโตพลาสท์ที่แยกได้จากมันฝรั่งทั้ง 7 พันธุ์สามารถเจริญเป็น microcalli ได้ภายใต้การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร CL ที่ความหนาแน่น 2 x 10^4/มล. ได้รับแสงตลอด 24 ชม.ที่อุณหภูมิ 25 °ซโดยเฉลี่ย ซึ่ง microcalli เหล่านี้มีการเจริญพอเห็นได้ด้วยตาเปล่าใน 2 สัปดาห์ และหลังจากนั้นประมาณ 2



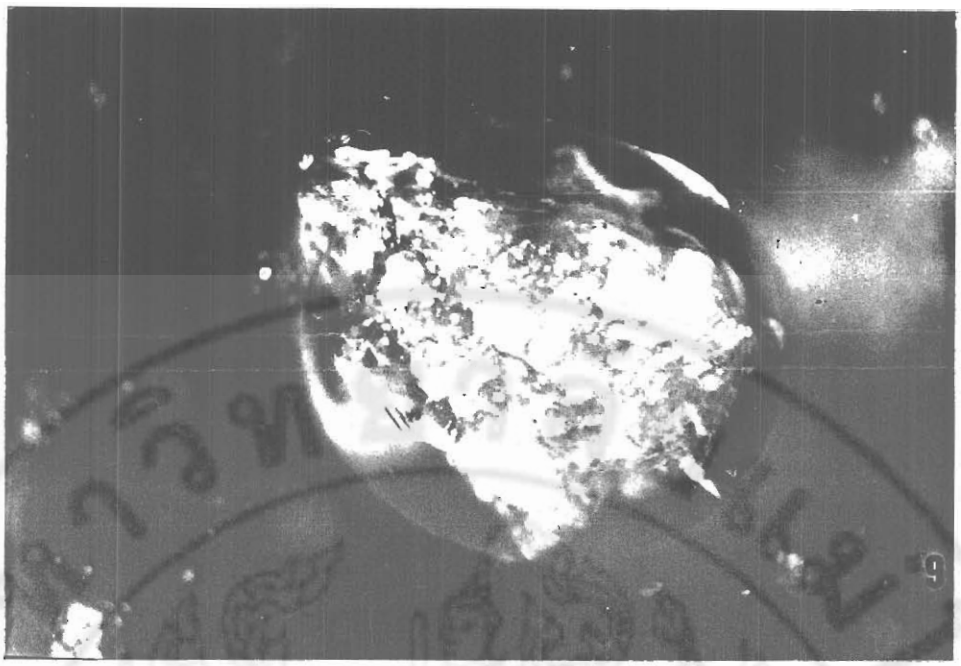


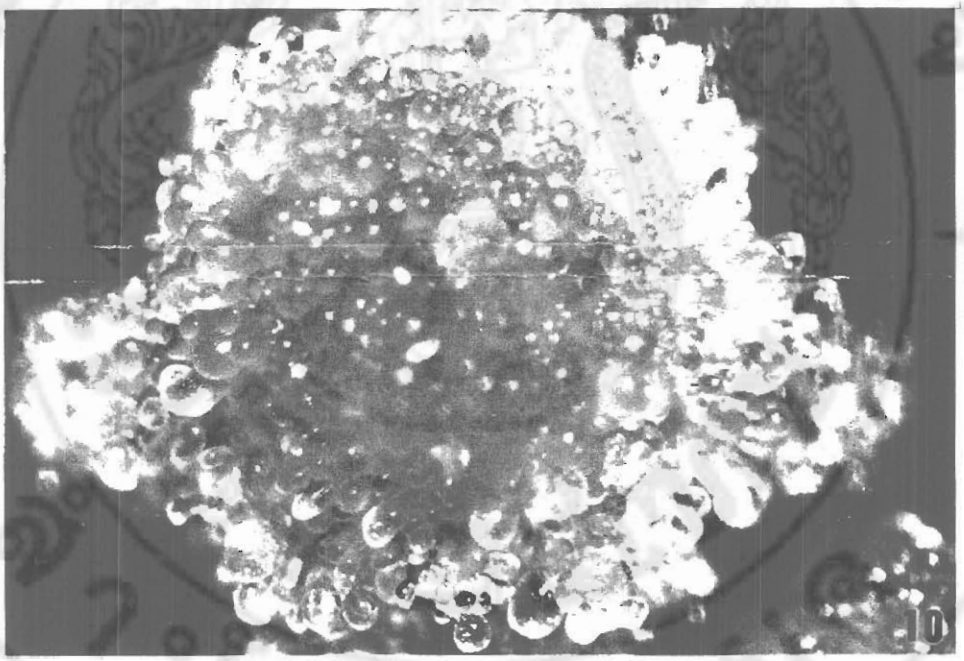


ภาพที่ 5, 6, 7 โปรโตพลาสท์มันฝรั่งมีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์ หลังจากที่เพาะเลี้ยงใน CL medium ประมาณ 1 สัปดาห์



ภาพที่ 8 Microcalli ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสท์มันฝรั่งซึ่งแยกจาก mesophyll ของต้นที่เจริญในสภาพ in vitro ภาพจากกล้อง steroscope กำลังขยายต่ำ





ภาพที่ 9-10 Microcalli จากโปรโตพลาสท์มันฝรั่ง อายุประมาณ 4 สัปดาห์ เลี้ยงในอาหารสูตร cell layer ภาพจากกล้อง stereoscope กำลังขยายสูง

วิจารณ์ผล
(Discussion)

การแยกเซลล์ mesophyll ของใบมันฝรั่งเป็นโปรโตพลาสท์เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วกระตุ้นให้งอกเป็นต้นพืชได้นั้นเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์แก่งานวิจัยในอนาคต มักพบว่าพืชที่ได้มาโดยวิธีนี้มีการกลายพันธุ์ชนิดที่เรียกว่า somaclonal variation ซึ่งเคยมีรายงานว่าพบลักษณะต้านทานโรค ผู้วิจัยอาจจะลองใช้เทคนิคขั้นสูงต่อ เช่น ทำ protoplast fusion หรือใส่ยีนหน่วยใหม่เข้าไปโดยวิธี microinjection ทว่าวิธีการตอนเริ่มต้นที่ต้องทำการเพาะเลี้ยงพืชจากเซลล์เดี่ยวๆแบบนี้ต้องอาศัยประสบการณ์และสภาพห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม มิฉะนั้นจะพบปัญหาการปนเปื้อนอย่างต่อเนื่อง

การดำเนินงานของงานวิจัยนี้เป็นไปอย่างล่าช้าเนื่องจากต้องคอยแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนตลอดเวลา เป็นสาเหตุที่ต้องกลับไปเริ่มการเพาะเลี้ยงต้นมันฝรั่งใหม่หลายครั้งก่อนที่จะแยกโปรโตพลาสท์ เมื่อแก้ปัญหาโดยเปลี่ยนสถานที่ทดลองสำหรับงาน *in vitro* แล้วก็พบปัญหาในขั้นตอนการกรองโปรโตพลาสท์หลังแยกเสร็จแล้ว และปัญหาในช่วงหลังได้แก่การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสท์ (CL medium) เนื่องจากมีความจำเป็นต้องใช้แผ่นกรองที่มีคุณภาพเหมาะสมเพื่อกรองส่วนผสมของสูตรอาหาร เพราะต้องรักษาคุณสมบัติของฮอร์โมนและองค์ประกอบอื่น ๆ ไว้โดยไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ งานในขั้นนี้ได้ผลดีเมื่อใช้ filter membrane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.2 ไมครอนชนิดที่เป็นไนลอน ส่วนชนิดที่ทำด้วยเซลลูโลสไนเตรทนั้นไม่สามารถขจัดการปนเปื้อนของอาหาร แม้ว่าจะใช้สองแผ่นซ้อนกันก็ตาม อย่างไรก็ตามโดยสรุปแล้วผู้วิจัยสามารถทำการเพาะเลี้ยงมันฝรั่งในสภาพ *in vitro* แล้วทำการแยกโปรโตพลาสท์จากเซลล์ mesophyll นำโปรโตพลาสท์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงเป็น microcalli หรือ calli อายุกว่า 4 สัปดาห์ได้เป็นผลสำเร็จภายใต้ข้อจำกัดต่าง ๆ ของสถานที่ที่ทำการทดลอง งานวิจัยนี้จำเป็นต้องสิ้นสุดลงโดยไม่ได้ลองย้าย microcalli หรือ calli อายุ 4 สัปดาห์ไปเลี้ยงต่อในสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้น differentiation ทั้งนี้ความสามารถในการสร้าง calli เป็นคุณสมบัติทางชีววิทยาซึ่งอาจจะแตกต่างกันระหว่างพืชชนิดเดียวกันตัวอย่างเช่น ข้าวพันธุ์ japonica สร้าง microcalli ได้ดีกว่าพันธุ์ indica เป็นต้น

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองทำกับมันฝรั่ง 7 พันธุ์ ซึ่งบางพันธุ์ได้มีการอ้างอิงถึงลักษณะความต้านทานต่อเชื้อรา *P. infestans* เชื้อสาเหตุของโรคใบไหม้ (late blight) ตัวอย่างเช่น พันธุ์ B6080 WV 21 มียีน $R_1R_2R_3$ ซึ่งจะร่วมกันแสดงออกเป็น field resistance ในขณะที่พันธุ์ Kennebec มี major gene, R_1 เพื่อต้านทานโรคใบไหม้ และพันธุ์ Russet Burbank และพันธุ์ Bintje มี gene r คือไม่ต้านทานต่อ *P. infestans* ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์สามารถให้จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัมในระดับที่น่าพอใจ และค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง protoplast yield กับพันธุกรรมในลักษณะความต้านทานต่อเชื้อรา *P. infestans* ในเรื่องนี้ได้มีผู้วิจัย (Rothlisberger et al 1984) เสนอแนวคิดไว้ว่าคุณสมบัติของ cell wall ของมันฝรั่งแตกต่างกัน ผนังเซลล์ของพันธุ์ต้านทานนั้นทนทานต่อการบุกรุกของเชื้อรามากกว่าของพันธุ์อ่อนแอ และพันธุ์ต้านทานน่าที่จะให้ protoplast yield ต่ำกว่าพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งหมายความต่อไปอีกได้ว่าพันธุ์ต้านทานมี cell wall ซึ่งยากต่อการสลายของเอ็นไซม์จากเชื้อโรคพืช (pathogen) หรือ เอ็นไซม์ (cellulase, pectinase) ที่ใช้ในเทคนิคการแยกโปรโตพลาสท์

ในงานวิจัยนี้พืชทดลองได้มาจากการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro* อายุประมาณ 4 สัปดาห์ แต่ Rothlisberger และคณะ ใช้พืชจากแปลงปลูก ซึ่งอาจจะได้รับเชื้อ P. infestans มาบ้างแล้ว หากเป็นดังนี้จริงมันฝรั่งพันธุ์ต้านทานคงถูกกระตุ้นที่ระบบภูมิคุ้มกัน (defense mechanisms) อันเป็นเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในผนังเซลล์ เมื่อนำเซลล์เหล่านี้ไปแยกโปรโตพลาสท์จึงพบว่าได้จำนวนโปรโตพลาสท์ต่ำ นอกจากนี้ Rothlisberger และคณะยังได้สังเกตเห็นการเกิดสีน้ำตาล (browning) ในพืชต้านทานขณะทำการแยกโปรโตพลาสท์ ซึ่งน่าจะเป็นพวก phenolic compounds ที่พันธุ์ต้านทานปล่อยออกมา ในอนาคตหากต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติของ cell wall กับเชื้อราตัวนี้สิ่งที่ทดลองเพิ่มเติมได้ คือ การ challenge ระบบภูมิคุ้มกันของพืชในระยะที่เลี้ยงแบบ *in vitro* ในขวดแก้วเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลง แล้วสังเกตความแตกต่างระหว่างมันฝรั่งพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอ แต่เนื่องจาก *P. infestans* เลี้ยงยาก คือต้องใช้อาหารและสภาพการเพาะเลี้ยงเป็นพิเศษจึงจะมีเชื้อราพอเพียงแก่การวิจัย ต่อ ความยากในการเลี้ยง *P. infestans* บริสุทธิ์จึงเป็นอุปสรรคประการหนึ่ง

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Toxopeus, H. J. 1964. Treasure-digging for blight resistance in potatoes. Euphytica 13: 206-222.

Tomiyama, K., H. S. Lee, and N. Doke. 1974. Effect of homogenates of Phytophthora infestans on the potato-tuber protoplasts. Annals of Phytopathological Society of Japan 40: 70-72.

Yamada, Y., Z. Q. Yang, and D. T. Tang. 1986. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports 4: 85-88.