การแยกโพรโทพลาสต์จากใบในสภาพปลอดเชื้อของสับปะรดพันธุ์ภูแล

Protoplast Isolation from *In Vitro* Leaf of Pineapple (*Ananas comosus*) cv. Phulae

วุฒิชัย จิตดิลกธรรม, เยาวพา จิระเกียรติกุล*

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ธราธร ทีรฆฐิติ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

Wuttichai Jitdiloktham, Yaowapha Jirakiattikul*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

Tharathorn Teerakathiti

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park

Received: February 24, 2021 ; Accepted: July 10, 2021

บทคัดย่อ

การแยกโพรโทพลาสต์ เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการรวมโพรโทพลาสต์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สับปะรด ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบของสับปะรดพันธุ์ภูแลที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยศึกษาแมนนิทอลความเข้มข้น 0.1 – 0.5 โมลาร์ เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 1 – 2.5% (w/v) เอนไซม์มาเซอโรไซม์ความเข้มข้น 0.5 – 2% (w/v) ระยะเวลาแช่เอนไซม์ 4 – 6 ชั่วโมง และความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงที่ 700 – 1000 รอบต่อนาที ผลการทดลอง พบว่า การใช้น้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2% (w/v) และเอนไซม์มาเซอโรไซม์ความเข้มข้น 1% (w/v) ใช้เวลาแช่เอนไซม์ผสมนาน 6 ชั่วโมง และใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 800 รอบต่อนาที สามารถแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ภูแลได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนโพรโทพลาสต์เท่ากับ 3.82 ± 0.02 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

คำสำคัญ : แมนนิทอล; เซลลูเลส; มาเซอโรไซม์; หมุนเหวี่ยง

Abstract

Protoplast isolation is one of the important steps for protoplast fusion in pineapple breeding program. Conditions for protoplast isolation are different in each plant species. The objective of this

**Corresponding author: yjirakia@tu.ac.th*

study was to establish appropriate conditions for protoplast isolation from *in vitro* leaf of Pineapple cv. Plulae. Mannitol concentrations (0.1 – 0.5 M), cellulase concentrations (Cellulase Onuzuga R-10, 1 – 2.5% (w/v)), macerozyme concentrations (Macerozyme Onozuga R-10, 0.5 – 2% (w/v)), digestion time (4 – 6 h) and centrifugation speeds (700 – 1000 rpm) were investigated. The results showed that 0.4 M mannitol, 2% (w/v) cellulase, 1% (w/v) macerozyme, 6 h digestion time and centrifugation speed at 800 rpm were the appropriate condition for protoplast isolation from *in vitro* leaf of Pineapple cv. Plulae. The protoplast yield was 3.82 ± 0.02 x10^6 protoplasts/ g FW.

Keywords: mannitol; cellulase; macerozyme; centrifuge

1. บทนำ

สับปะรด (Pineapple) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* (L.) Merr อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่พบได้ในเขตร้อน และกึ่งเขตร้อนของโลก ปลูกมากในทวีปอเมริกากลาง ทวีปเอเชีย และแอฟริกาใต้ จัดว่าเป็นผลไม้ที่มีการผลิตเป็นอันดับ 3 ของโลกรองจากกล้วย และส้ม (Joy and Anjana, 2016) ในประเทศไทย สับปะรดจัดเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญ โดยผลสามารถนำมาแปรรูปเป็นสับปะรดอบแห้ง แช่แข็ง และใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานกระป๋อง อีกทั้งผลยังนิยมนำมารับประทานสด เนื่องจากมีสารอาหารหลายชนิด เช่น วิตามินเอ บี และ ซี เหล็กแคลเซียม และฟอสฟอรัส (Chaudhary *et al*., 2019; Zulkarnain *et al*., 2018) สายพันธุ์สับปะรดที่ผลิตเป็นการค้าของโลกสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ Cayenne หรือ Smooth Cayenne, Queen, Spanish, Abacaxis และ Maipure ส่วนสายพันธุ์สับปะรดที่ผลิตเป็นการค้าและตลาดต้องการในประเทศไทยมี 2 กลุ่ม คือ Smooth Cayenne และ Queen (Joy and Anjana, 2016) ภูแลเป็นสับปะรดพันธุ์หนึ่งในกลุ่ม Queen ซึ่งในประเทศไทยนิยมนำมารับประทานเป็นผลสด เนื่องจากผลมีขนาดเล็ก เนื้อสีทอง และมีกลิ่นหอม เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเนื่องจากขายได้ในราคาสูง (Sanputawong, 2015; Phonyiam et al., 2016) แต่มักพบปัญหาโรคและแมลงที่ติดมาจากต้นพันธุ์เดิม เช่น โรคสีชมพู โรครากเน่าโคนเน่า โรคแอนแทรกซ์ ไส้เดือนฝอย ไร และด้วง เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายกับผลผลิต (Diab, 2009) ดังนั้นเพื่อให้มีพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะและคุณภาพที่ดี ทนต่อโรคและศัตรูพืช จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์สับปะรด การผสมเกสรเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ แต่สับปะรดเป็นพืชที่ไม่สามารถผสมตัวเองได้ หรือที่เรียกว่า self-incompatibility (Farahani, 2014) และมักพบปัญหาเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำเมื่อผสมข้ามสายพันธุ์ (Wongwirattana *et al*., 2016) จากปัญหาดังกล่าว จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์มาใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์สับปะรด

ในการนำเซลล์โพรโทพลาสต์มาใช้ประโยชน์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์นั้น จำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์ออกจากชิ้นส่วนพืช เพื่อป้องกันไม่ให้โพรโทพลาสต์แตก ทั้งนี้เนื่องจากโพรโทพลาสต์เป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) (Kanchanapoom, 2002; Tomar and Danntu, 2010) การแยกโพรโทพลาสต์ของสับปะรดได้มีรายงานการศึกษาบ้างแล้วในพันธุ์ Tainong 11, MD2 และ Tainong 21 (Priyadarshani *et al*., 2018) และพันธุ์ Josapine (Zhao *et al*., 2011) ซึ่งสภาวะ

ในการแยกโพรโทพลาสต์ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ สภาวะออสโมติก ระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสม และความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งข้อมูลดังกล่าวของสับปะรดโดยเฉพาะในกลุ่ม Queen ยังมีอย่างจำกัด รวมถึงยังไม่มีรายงานการแยกโพรโทพลาสต์ของสับปะรดพันธุ์ภูแล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสภาวะการแยกโพรโทพลาสต์ที่เหมาะสมจากใบที่ปลอดเชื้อของสับปะรดพันธุ์ภูแล ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการแยกโพรโทพลาสต์ของสับปะรดพันธุ์อื่นๆ เพื่อใช้ในการรวมโพรโทพลาสต์ของสับปะรดต่างสายพันธุ์ต่อไป

2. วิธีการ

2.1 ความเข้มข้นของแมนนิทอล (mannitol)

นำยอดสับปะรดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 4 สัปดาห์และมีใบจำนวน 4-5 ใบ ตัดใบที่ 3 และ 4 นับจากยอด นำไปชั่งให้มีน้ำหนัก 1.0 กรัม ตัดใบให้เป็นชิ้นเล็กๆ มีขนาด 0.5-1.0 x 0.5-1.0 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 โมลาร์ (M) เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายออก และเติมสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase Onozuga R-10) ความเข้มข้น 2% (w/v) ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์ (Macerozyme Onozuga R-10) ความเข้มข้น 2% (w/v) และสารละลายแมนนิทอลตามความเข้มข้นที่ได้รับก่อนหน้า pH ของสารละลายเอนไซม์ผสมเท่ากับ 5.6-5.8 และกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน (µm) เติมสารละลายเอนไซม์ผสมลงบนตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 1 ซ้ำ แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา กรองสารละลายเอนไซม์ผสมที่มีโพรโทพลาสต์แขวนลอยผ่านเมมเบรนขนาด 50 ไมครอน เพื่อแยกเศษชิ้นส่วนออก นำสารละลายเอนไซม์ผสมไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นล้างโพรโทพลาสต์ด้วย washing solution และนำหมุนเหวี่ยงเพื่อแยก washing solution ที่ความเร็วรอบ 1000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 5 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ บันทึกจำนวนโพรโทพลาสต์ โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (heamocytometer) และความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ ด้วยการย้อมสี fluorescein diatate (FDA) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่เรืองแสงภายใต้กล้องสเตอริโอ แล้วนำมาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{(จำนวนโพรโทพลาสต์ที่เรืองแสง x 100)}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}}$$

2.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase Onuzuga R-10)

เตรียมชิ้นส่วนใบ และแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก 2.1 เติมสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 1 1.5 2 และ 2.5% (w/v) ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์ความเข้มข้น 2% (w/v) และแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก 2.1 ทำการแยกโพรโทพลาสต์ และบันทึกผลเช่นเดียวกับ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ

2.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์ (Macerozyme Onozuga R-10)

เตรียมชิ้นส่วนใบ และแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลายแมนนิทอลที่เหมาะสมจาก 2.1 เติมสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก 2.2 ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์ ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2% (w/v) และแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก 2.1 ทำการแยกโพรโทพลาสต์ และบันทึกผลเช่นเดียวกับ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ

2.4. ระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสม

เตรียมชิ้นส่วนใบ และแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลายแมนนิทอลที่เหมาะสมจาก 2.1 เติมสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์มาเซอโรไซม์ และแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.1-2.3 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 6 และ 8 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลากรองสารละลายเอนไซม์ผสม แยกโพรโทพลาสต์ และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ

2.5 ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง

เตรียมชิ้นส่วนใบ และแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลายแมนนิทอลที่เหมาะสมจาก 2.1 เติมสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์มาเซอโรไซม์ และแมนนิทอลความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก 2.1-2.3 แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจาก 2.4 เมื่อครบระยะเวลา กรองสารละลายเอนไซม์ผสมและนำสารละลายเอนไซม์ผสมไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 700 800 900 และ 1000 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ทำการแยกโพรโทพลาสต์ และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 3 ซ้ำ

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ความเข้มข้นของแมนนิทอล

จากการทดลอง พบว่า จำนวนและความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของแมนนิทอล โดยแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้สูงสุดเท่ากับ $2.87 \pm 0.18 \times 10^6$ โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (รูปที่ 1A) และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 69.64 ± 2.10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.1 B) ซึ่งจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อใช้แมนนิทอลความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ($2.70 \pm 0.14 \times 10^6$ โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด) แต่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์น้อยกว่าเท่ากับ 46.24 ± 2.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแยกโพรโทพลาสต์ด้วยแมนนิทอลความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้จำนวนโพรโท-พลาสต์น้อยที่สุด $1.48 \pm 0.23 \times 10^6$ โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีชีวิต เมื่อใช้แมนนิทอลความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ในการแยกโพรโทพลาสต์จากชิ้นส่วนพืชให้ออกมาอยู่ในสารละลายอาหารนั้นมักพบว่า เซลล์พืชจะแตกได้ง่ายเนื่องจากไม่มีผนังเซลล์ จึงจำเป็นต้องมีแรงดันออสโมติกที่ทำให้เกิดสมดุลระหว่างแรงดันภายใน

และภายนอกเซลล์ สารที่ใช้ควบคุมสภาวะออสโมติกนี้เรียกว่า สาร osmolyticum และแมนนิทอลเป็นสาร osmolyticum ที่นิยมใช้มากที่สุดในการใช้แยกโพรโทพลาสต์ เพราะพืชสามารถดูดซึมแมนนิทอลได้น้อย ความเข้มข้นของแมนนิทอลที่นิยมใช้ประมาณ 0.23 – 0.90 โมลาร์ (Kanchanapoom, 2002; Suwanno, 2010) จากการทดลองนี้พบว่าแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์เหมาะสมต่อการสกัดแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ภูแล ทำให้ได้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด และมีลักษณะที่สมบูรณ์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Priyadarshani et al. (2018) ที่ใช้แมนนิทอลความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ Tainong 11, MD2 และ Tainong 21 ส่วน Zhao et al. (2011) ใช้แมนนิทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ Josapine จากการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้แมนนิทอลที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่า แต่ให้จำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติกับที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

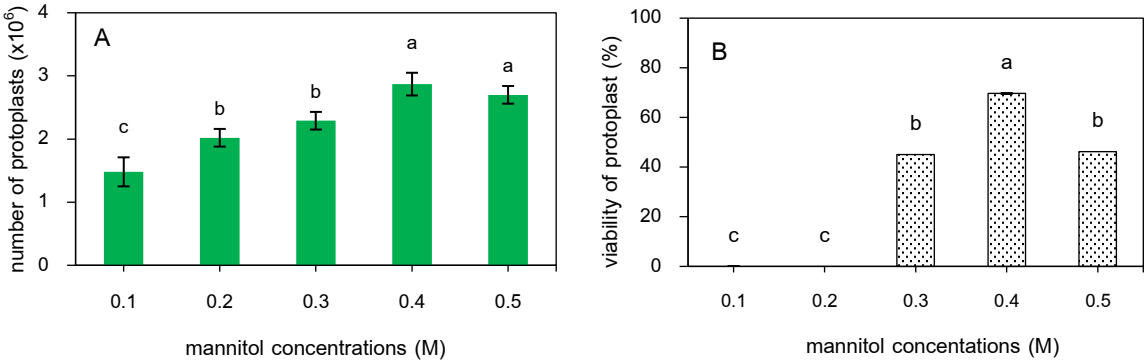

Figure 1 A) number of protoplasts and B) viability of protoplasts under different concentrations of mannitol

3.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลอง พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2% (w/v) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุดเท่ากับ 3.44 ± 0.06 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (รูปที่ 2A) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 1 1.5 และ 2.5% (w/v) ที่สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้เท่ากับ 2.15 ± 0.03 x10^6 2.56 ± 0.16 x10^6 และ 3.00 ± 0.09 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้โพรโทพลาสต์มีความมีชีวิตสูงสุด เท่ากับ 61.30 ± 0.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวที่แยกด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (58.70 ± 2.12 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 2B) จากการที่ผนังเซลล์ของพืชประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และผนังเชื่อมระหว่างเซลล์ (middle lamella) ซึ่งเป็นสารจำพวกเพคทิน (pectin) ดังนั้น ในการแยกโพรโทพลาสต์จึงต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันเพื่อย่อยผนังเซลล์ (Chamani *et al*. 2012; Mastuti and Rosyidah, 2018) โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยเซลลูโลสของ

ผนังเซลล์พืช ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในการแยกโพรโทพลาสต์นั้นจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมในการแยก โพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ภูแลคือ 2% (w/v) ในขณะที่ Zhao *et al*. (2011) และ Priyadarshani *et al*. (2018) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 1.5% (w/v) เท่ากันทั้ง 2 รายงานในการแยกโพรโทพลาสต์ของใบสับปะรดต่างสายพันธุ์ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น นอกจากนี้ในพืชชนิดอื่นๆ ก็พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไป เช่น Li *et al*. (2018) ศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์จากใบกล้วยไม้ฟาแลนน็อปซิส พบว่า ความเข้มข้น 1.5% (w/v) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด และที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ แยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนน้อยที่สุด และ Kang *et al*. (2020) ศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์จากใบพิทูเนีย โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 1 – 2.5% (w/v) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2% (w/v) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้น 1% (w/v) แยกโพรโทพลาสต์จากใบพิทูเนียได้จำนวนน้อยที่สุด

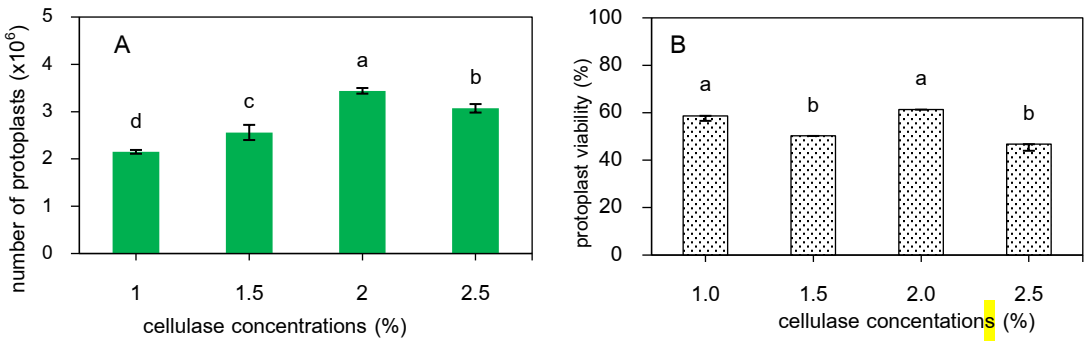

Figure 2 A) number of protoplasts and B) viability of protoplasts when using 1- 2.5% cellulase (w/v)

3.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์

จำนวนและความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์ โดยเอนไซม์มาเซอโรไซม์ความเข้มข้น 1% (w/v) สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.47 ± 0.08 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (รูปที่ 3A) และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 68.51 ± 1.13 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3B) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ และความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์เมื่อใช้เอนไซม์มาเซอร์โรไซม์ความเข้มข้น 0.5 1.5 และ 2% (w/v) ที่สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้ เท่ากับ 3.02 ± 0.09 x10^6 3.18 ± 0.06 x10^6 และ 3.08 ± 0.13 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 54.33 ± 0.81 55.65 ± 1.50 และ 55.54 ± 0.68 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เอนไซม์มาเซอโรไซม์มีความสำคัญในการช่วยทำลายโครงสร้างของเพกทินในผนังเซลล์ของพืช (Kanchanapoom, 2002) ซึ่งต้องใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นโดยเฉพาะเอนไซม์เซลลูเลส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์มีผลต่อจำนวนของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ โดยความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยก

โพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ภูแล คือ 1% (w/v) ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดนี้ก็จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด หรือแม้แต่ต่างสายพันธุ์ ดังรายงานของ Zhao *et al*. (2011) พบว่า เอนไซม์มาเซอโรไซม์ที่ความเข้มข้น 1.5% (w/v) เหมาะสมต่อการแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ Josapine ส่วน Priyadarshani *et al*. (2018) พบว่า เอนไซม์มาเซอโรไซม์ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) เหมาะสมต่อการแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ Tainong 11, MD2 และ Tainong 21 นอกจากนี้ Li *et al*. (2018) พบว่า เอนไซม์มาเซอโรไซม์ความเข้มข้น 0.7 % (w/v) เหมาะสมต่อการแยกโพรโทพลาสต์จากใบกล้วยไม้ฟาแลนน็อปซิส

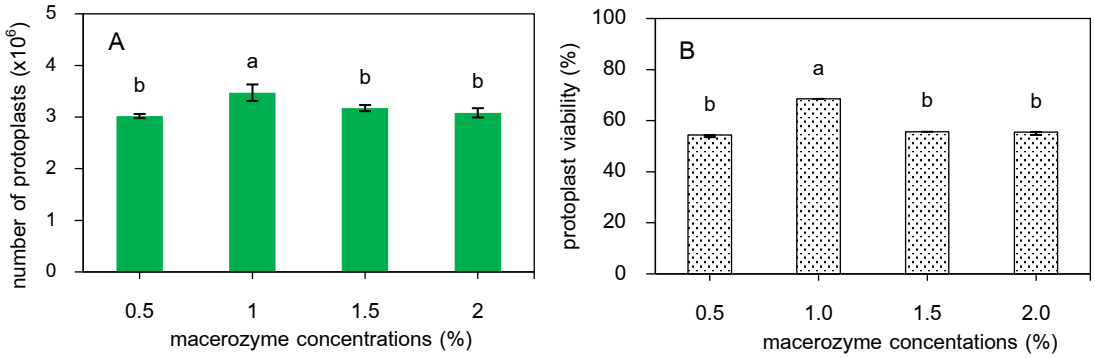

Figure 3 A) number of protoplasts and B) viability of protoplasts when using 0.5- 2.0% macerozyme (w/v)

3.4 ระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสม

จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมนาน 6 ชั่วโมง สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด เท่ากับ 3.62 ± 0.02 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้ระยะเวลาในการแยกนาน 4 ชั่วโมง (3.56 ± 0.02 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมที่ 4 และ 6 ชั่วโมง โดยมีความมีชีวิตเท่ากับ 98.87 ± 0.55 เปอร์เซ็นต์ และ 98.87 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4A และ 4B) ส่วนระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมนาน 8 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนโพรโทพลาสต์ และความมีชีวิตน้อยที่สุดเท่ากับ 2.06 ± 0.08 x 10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 21.36 ± 2.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมมีผลต่อจำนวนของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่เอนไซม์ผสมเพื่อแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ภูแล คือ ที่ระยะเวลา 4 และ 6 ชั่วโมง โดยที่ระยะเวลาในการแช่นานเกินไป คือ 8 ชั่วโมง ส่งผลทำให้โพรโทพลาสต์เกิดความเสียหายได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่เติมลงไปนอกจากจะทำลายผนังเซลล์ของพืชแล้ว ยังสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชได้ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ระยะเวลาแช่ที่สั้นเกินไปก็จะไม่สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ (Jia *et al*. 2016) ซึ่งระยะเวลาแช่เอนไซม์นั้นก็จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ผลการทดลองนี้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Jia *et a*l. (2016) ที่ศึกษาระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมเพื่อแยกโพรโทพลาสต์จากใบข้าวสาลีเป็นระยะเวลานาน 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาแช่นาน 4 ชั่วโมงสามารถ

แยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด แต่ที่ระยะเวลานาน 8 ชั่วโมงสามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนน้อยที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Priyadarshani *et al*. (2018) ศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ Tainong 11, MD2 และ Tainong 21 โดยใช้ระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมนาน 2 – 6 ชั่วโมง พบว่า ที่ระยะเวลานาน 3 – 6 ชั่วโมง สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ รวมถึงรายงานของ Kang *et al.* (2020) ที่ศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์จากใบพิทูเนีย โดยใช้ระยะเวลาแช่เอนไซม์ผสมนาน 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่า ที่ระยะเวลานาน 6 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุด

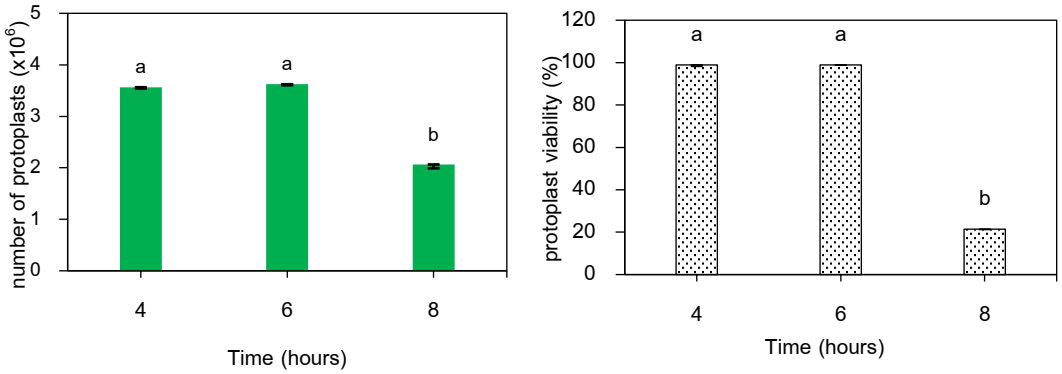

Figure 4 A) number of protoplasts and B) viability of protoplasts after using different of digestion times

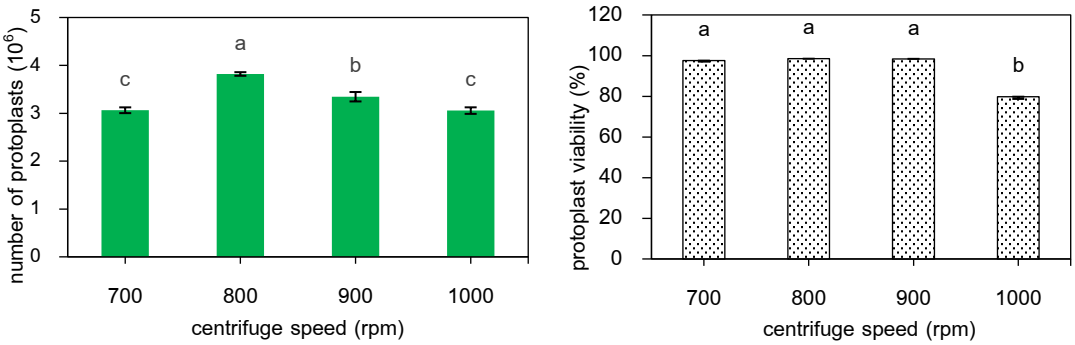

Figure 5 A) number of protoplasts and B) viability of protoplasts after using different of centrifugation

3.5 ความเร็วรอบในการหมุนหวี่ยง

จากการทดลอง พบว่า จำนวนและความมีชีวิตโพรโทพลาสต์ที่แยกได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงที่ต่างกัน (รูปที่ 1E) โดยความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงที่ 800 รอบต่อนาที สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด เท่ากับ 3.82 ± 0.02 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับจำนวน โพรโทพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงที่ 700 900 และ 1000 รอบต่อนาที สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้ 3.06 ± 0.02 x10^6 3.35 ± 0.08 x10^6 และ 3.06 ± 0.08 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (รูปที่

5A) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่ความเร็วรอบการหมุนเหวี่ยง 700 800 และ 900 รอบต่อนาที พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วง 97.50 ± 0.47 ถึง 98.47 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเร็วรอบการหมุนเหวี่ยง 1,000 รอบต่อนาที พบว่า ความมีชีวิตมีค่าน้อยที่สุด เท่ากับ 79.79 ± 1.08 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 5B) ลักษณะของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงนั้นมีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้ เนื่องจากความเร็วรอบที่น้อยเกินไปจะทำให้โพรโทพลาสต์ยังแขวนลอยไม่แยกชั้น แต่หากใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงที่มากเกินไป จะทำให้โพรโทพลาสต์เกิดความเสียหายได้ ซึ่งความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงนี้จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

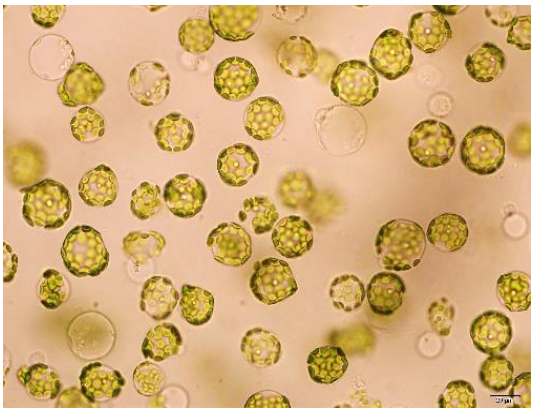

Figure 6 pineapple protoplasts after isolation with 2% (w/v) cellulase, 1% (w/v) macerozyme, 0.4 M mannitol, 6 h of digestion time and 800 rpm. scale = 20 μm

ดังที่ได้มีรายงานในการสกัดโพรโทพลาสต์จากใบสับปะรดพันธุ์ Smoth Cauun ของ Hagagy *et al*. (2007) โดยศึกษาความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 500 1000 และ 1500 รอบต่อนาที พบว่า ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 1000 รอบต่อนาที สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด และ Jia *et al*. (2016) ศึกษาความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 500 - 2000 รอบต่อนาที ในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบข้าวสาลี พบว่า ที่ 1000 รอบต่อนาที สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนสูงสุด

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงสภาวะในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบของสับปะรดพันธุ์ภูแล ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบ หรือส่วนอื่นๆ ของสับปะรดพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

4. สรุป

สภาวะการแยกโพรโทพลาสต์จากใบของสับปะรดพันธุ์ภูแลที่เหมาะสม คือ ใช้แมนนิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2% (w/v) และเอนไซม์มาเซอโรไซม์ความเข้มข้น 1% (w/v) ใช้เวลาแช่เอนไซม์ผสมนาน 6 ชั่วโมง และใช้ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 800 รอบต่อนาที สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้ 3.82 ± 0.02 x10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรทีมวิจัยนวัตกรรมโรงงานผลิตพืชสมุนไพร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คุณวิชิต แพพูล ที่ได้ให้คำแนะนำการวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ คุณภัทรพร ศุภปัญญาพงศ์ ที่อนุเคราะห์ยอดสับปะรดภูแลในสภาพปลอดเชื้อ และคุณทิวา เทพมุณี ที่แนะนำเทคนิคต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงบุคลากรในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบ้านวิทยาศาสตร์สิรินธร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

(สวทช.) ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

5. References

Chaudhary, V., Kumar, V., Sunil, Vaishali, Kavindra, S., Kumar, R. and Kumar, V., 2019, Pineapple (*Ananas cosmosus*) product processing: A review, J. Pharmacogn. Phytochem. 8(3): 4642-4652.

Chamani, E. Tahami, S. K., Zare, N., Zakaria, R. A., Mohebodini, M. and Joyce, D., 2012, Effect of different cellulase and pectinase enzyme treatments on protoplast isolation and viability in *Lilium ledebeourii* Bioss, Not. Bot. Horti. Agrobot Cluj- Napoca. 40(2): 123-128.

Diab, S. M. A. M., 2009, *In Vitro* Rooting and Acclimatization of Pineapple (*Ananas comos*us L. Merr.) “Smooth Cayenne” cultivar, M.Sc. Thesis, University of Khartoum, Sudan, 138 p.

Farahani, F., 2014, Micropropagation and growth of *in vitro* pineapple (*Ananas cosmosus* L. Merr) in Iran, Plant Arch. 14 (1): 337-341.

Hagagy, N. A. A., Mohamed, G. E. A., Mougheith, M. G. E. A., Saleh, M. A. E, Gendiah, H. M., Mohamed, S. K. and Hassan, S. A. M., 2007, Isolation and culture of pineapple (*Ananas comnosus*) protoplast, 2 (1): 97 -103. In Proceedings of the Second International Conference on The Role of Genetics and Biotechnology in Conservation of Natural Resources, 9-11 July 2007, Ismailia, Egypt.

Jia, X., Zang, X., Qu, J. and Han, R., 2016, Optimization conditions of wheat mesophyll protoplast isolation, Agricultural Sciences. 7: 850-858.

Joy, P. P and Anjana, R., 2016, Evolution of pineapple, pp. 263-296, In Peter, K. V. (Ed.) , The Genesis and Evolution of Horticultural Crops, Kruger Brentt Publishers, UK.

Kang, H. H., Naing, A. H. and Kim, C. K., 2020, Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived callus of *Petunia hybrida* cv. Mirage Rose, Biology. 9: 228 doi: 10.3390/biology9080228.

Kanchanapoom, K., 2002, Plant Protoplast Technology, Chulalongkorn University Printing House, Bangkok, 116 p. (in Thai)

Li, J., Liao, X., Zhou, S., Liu, S., Jiang, L. and Wang, G., 2018, Efficient protoplast isolation and transient gene expression system for *Phalaenopsis* hybrid cultivar ‘Ruili Beauty’, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 54: 87–93.

Mastuti, R. and Rosyidah, M., 2018, *In vitro* enzymatic isolation of protoplasts from tissues of the medicinal plant *Physalis angulata* L, AIP Conference Proceedings 2019, 020002 (2018). https://doi.org/10.1063/1.5061838.

Phonyiam, O., Kongsuwan, A. and Setha, S., 2016, Effect of short-term anoxic treatment on internal browning and

antioxidant ability in pineapple cv. Phulae, Int. Food Res. J. 23(2): 521-527.

Priyadarshani, S. V. G. N., Hu, B., Li, W., Ali, H., Jia, H., Zhao, L., Peter, S., Syed, O., Azam, M., Xiong, J., Yan, M., Rahman, Z., Wu, Q. and Qin, Y., 2018, Simple protoplast isolation system for gene expression and protein interaction studies in pineapple (*Ananas comosus* L.), Plant Methods. 14: 95.

Sanputawong, S., 2015, Influence of culture media and concentrations of BA on shoot multiplication of pineapple cv. Phulae. Wichcha Journal. 34(1): 77-83. (in Thai)

Suwanno, S., 2010, Isolation and Culture of Protoplasts from Cell Suspension Culture of Oil Palm cv. Tenera. Master Thesis, Prince of Songkla University.

Tomar, U. K. and Dantu, P.K., 2010, Protoplast culture and somatic hybridization, pp. 876-891, In Tripathi G. (Ed). Cellular and Biochemical Science. I.K. International PVT Ltd, New Delhi.

Wongwirattana, S. , laksanalamai, V., Teerakathiti, T. and Leelapon, O., 2016, *In vitro* embryo culture in pineapple hybrids. The 6th STOU National Research Conference. 25 November 2016. Nonthaburi, Thailand.

Zulkarnain, Z., Neliyati, N., and Eliyanti, E., 2018, Plantlets regeneration from crown bud slicing of pineapple (*Ananas comosus*). Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education 10(3): 484-490.

Zhao, W., Yang, W., Wei, C. and Sun, G., 2011, A simple and efficient method for isolation of pineapple protoplasts. Biotechnol. & Biotechnol Eq. 25(3): 2464–2467.